

Bergische Universität-
Gesamthochschule Wuppertal



Fachbereich 9
Analytische Chemie

Entwicklung von MEKC- und HPLC-Methoden zur
Bestimmung von Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxiden und
Hydroxyfettsäuren

Vom Fachbereich Chemie der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte

Dissertation

von

David Melchior

aus Bergisch Gladbach

Januar 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Mai 1998 bis 22. Dezember 2000 im Fachbereich 9, Analytische Chemie, bei Prof. Dr. S. Gäß an der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal angefertigt.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. S. Gäß, für die interessante Themenstellung und die sehr angenehme persönliche Betreuung. Seine motivierenden Gespräche, anregenden Diskussionen und Ratschläge habe ich in dieser Zeit zu schätzen gelernt.

Herrn Prof. Dr. Petz danke ich für die Übernahme des Korreferates.

An dieser Stelle möchte ich allen Dank aussprechen, die durch Aufnahme von Spektren, Hilfestellungen bei der Durchführung von Analysen und ihre Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Im speziellen Herrn Dr. Walter V. Turner und Herrn Dr. Axel Boddenberg für die stete Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen bei der Erstellung von nationalen und internationalen Postern, Vorträgen und Veröffentlichungen.

Frau Ilka Polanz und Herrn Dr. Weisshuhn für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Ralf Günther von der Bayer AG Leverkusen für das Interesse an meiner Arbeit und die dadurch entstandene Möglichkeit, Analysen außerhalb des Fachbereiches durchzuführen. Dr. R. Dörner und seinem Praxisteam sowie dem Klinikum Wuppertal für Ihre Kooperationsbereitschaft.

Herrn Dr. Belder und Herrn Husmann vom MPI Mühlheim und Frau Dr. Jegle von der Firma Hewlett Packard für die Bereitstellung permanent belegter Kapillaren.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Analytische Chemie für das freundliche und angenehme Arbeitsklima. Im besonderen Christian Hingst und Tanja Litzbarski für die beispielhafte Zusammenarbeit und engagierte Mitwirkung und Dr. T. Schwierz für die Unterstützung im Simulationsbereich dieser Arbeit.

*Meinen Eltern
und Regina*

ohne deren Unterstützung diese Arbeit und mein Studium nicht möglich gewesen wären

*Aufsteigt der Strahl und fallend gießt
er voll der Marmorschale Rund,
die, sich verschleiernd, überfließt
in einer zweiten Schale Grund;
die zweite gibt, sie wird zu reich,
der dritten wallend ihre Flut,
und jede nimmt und gibt zugleich
und strömt und ruht*

- Conrad Ferdinand Meyer „Der Römische Brunnen“ (1882) -

Abstract

In this work, MEKC and HPLC methods were developed for determining unsaturated fatty acids and the hydroperoxy and hydroxy fatty acids derived from them. Triglycerides and phospholipids from biological samples were first enzymatically or chemically hydrolysed. The products were quantified by UV/VIS-diode-array or UV/VIS detection or by post-column derivatisation reactions, which increased the sensitivity and selectivity through fluorescence or chemiluminescence.

One focus of the work was the chromatographic and electrophoretic separation. MEKC allowed separation of the isomeric hydroxy and hydroperoxy derivatives of oleic, linoleic, linolenic and arachidonic acids under both reversed-flow and normal-flow conditions. The normal-flow system had significant advantages in the analysis time and the number of theoretical plates (ca. 10^6 m⁻¹). Detection limits of 4 to 100 μ M were achieved routinely by MEKC. The use of bubble-cell detectors led to a further improvement by a factor of 5-7. In addition, a previously developed post-column derivatisation technique for MEKC was applied successfully. In this technique, hydroperoxy fatty acids and p-hydroxyphenyl acetic acid (PES) yield selectively, in the presence of microperoxidase-11 (MP-11), a product for LIF detection ($\lambda_{\text{ex}} = 325$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 415$ nm); the MP-11 for the reaction was immobilised on the wall of a reaction capillary spliced, without the introduction of dead volume, onto the end of the separation capillary (fused silica). Computer simulation of the processes in the reaction capillary made it clear that, to prevent loss of resolution, either the conversion must be very rapid or the fluorescent product must migrate at a rate similar to those of the analytes. It was shown in experiments that under optimal reversed-flow conditions the product from PES indeed migrates with the fatty acid hydroperoxides; PES was found to be the best reagent among a number of commercially available analogues.

RP-HPLC methods with UV detection at 195 or 234 nm were also used for routine analysis of fatty acids and hydroperoxy and hydroxy fatty acids liberated from triglycerides and phospholipids. The use of a fluoroalkyl phase (Fluofix) allowed the partial separation of individual isomers of the oxidised fatty acids. Fast HPLC reduced the analysis time to less than four minutes. The method proved to be linear over several orders of magnitude, from the detection limit of 0.2 to 0.9 μ M up to 1500 μ M. For the determination of hydroperoxy fatty acids in more complex matrices, the sensitivity and selectivity were improved further by the use of post-column derivatisation.

The methods developed were applied to the study of oxidised and non-oxidised lipids in biological samples such as oils and lecithin from soya and egg, and even to samples with more complex matrices such as blood serum, synovia and LDL (low-density lipoprotein). In the hydrolysis of the phosphatidylcholins, it was shown that the lipases degrade part of the hydroperoxides, thereby greatly reducing the recovery, especially when hydroperoxide concentrations are low; for such samples, hydrolysis with sodium hydroxide was more appropriate than enzymatic hydrolysis. MEKC had the advantage over HPLC of separating interfering matrix components from the analytes; thus, important hydroxy fatty acids in native LDL could be successfully analysed by MEKC with UV detection at 234 nm. The concentrations of the hydroxy fatty acids were found to be ca. 18 μ g HODE and 30 μ g HETE per gram LDL and thus some 600 times as great as those of the hydroperoxides. Since the hydroxy fatty acids in biological matrices are apparently only slowly degraded, they are better markers for lipid peroxidation than the hydroperoxides.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Bedeutung der einzelnen Lipidklassen	2
1.1.1	Cholesterin und Cholesterinester	2
1.1.2	Phospholipide	3
1.1.3	Triglyceride	6
1.2	Fettsäuren der Lipide.....	7
1.3	Biologische Membranen.....	10
1.4	Transport der Lipide im Blut.....	12
1.4.1	Aufbau und Funktion der Lipoproteine.....	13
1.4.1.1	Chylomikronen	14
1.4.1.2	VLDL und IDL	14
1.4.1.3	LDL	15
1.4.1.4	HDL	15
1.4.2	Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung der Lipoproteine	16
1.5	Oxidationsprodukte von Lipiden und Lipoproteinen.....	18
1.5.1	Lipidperoxidation als Folge von oxidativem Streß.....	18
1.5.2	Bedeutung der Fettsäurehydroperoxide und ihrer korrespondierenden Hydroxyfettsäuren.....	21
1.6	Bildung von Lipidhydroperoxiden.....	22
1.7	Enzyme	24
1.7.1	Lipasen	24
1.7.2	Phospholipasen	25
1.7.3	Lipoproteinlipasen	26
1.7.4	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	26
1.7.5	Cholesterin-Esterase.....	26
1.8	Methoden der Lipid- und Lipidhydroperoxidanalytik	27
1.8.1	Bestimmung von Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxiden.....	28
1.9	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	30
2	Experimenteller Teil	31
2.1	Synthese der Standardsubstanzen	31

2.1.1	Hydroperoxidstandards der ungesättigten Fettsäuren	32
2.1.2	13S-Hydroperoxide der Linol- und Linolensäure	33
2.1.3	9S-Hydroperoxid der Linolensäure	33
2.1.4	Hydroperoxide des Triolein	33
2.1.5	Hydroperoxide des Diolelylphosphatidylcholin	34
2.1.6	Hydroxyfettsäure-Derivate	34
2.2	Charakterisierung der Standardsubstanzen.....	35
2.2.1	¹³ C{ ¹ H}-NMR-Spektroskopie	35
2.2.2	¹ H-NMR-Spektroskopie	35
2.2.3	Hydroperoxide des Diolelylphosphatidylcholin	36
2.3	Oxidation von Pflanzenölen	37
2.4	Prüfung der thermischen Stabilität von Pflanzenölen	37
2.5	Extraktionsmethoden zur Isolierung der Lipidfraktion aus Vollblut.....	37
2.5.1	Standardmethode	37
2.5.2	Mikromethode.....	38
2.5.3	Isolierung der Lipidfraktion aus Synovia.....	38
2.6	Enzymatische Hydrolyse der Triglyceride	39
2.6.1	Standardmethode	39
2.6.2	Mikromethode.....	39
2.7	Mikromethoden zur enzymatischen Hydrolyse der Phosphatidylcholine....	40
2.7.1	DOPC und HPDOPC	40
2.7.2	Sojalecithin-Rohware	40
2.7.3	Eilecithin-Rohware	41
2.7.4	Humanproben	41
2.8	Alkalische Hydrolyse der Phosphatidylcholine.....	42
2.8.1	DOPC und HPDOPC	42
2.8.2	Humanproben	42
2.9	Immobilisierung von Mikroperoxidase an der fused-silica Kapillarwand...	43
2.9.1	Verwendung kommerzieller Amin-Kapillarsäulen.....	43
2.10	Totvolumenfreie Kopplung von fused-silica Kapillaren.....	44
2.11	Herstellung von Bubble-Cells.....	45
3	Ergebnisse und Diskussion	46

3.1	MEKC-Methoden für Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren.....	46
3.1.1	Reversed-flow MEKC.....	47
3.1.1.1	Optimierung des Phosphatpuffersystems	48
3.1.1.2	Verwendung organischer Modifier	52
3.1.1.3	Verwendung oberflächenmodifizierter Kapillaren	55
3.1.1.4	Konditionierung der Kapillaren	57
3.1.1.5	Einfache Bestimmung des elektroosmotischen Flusses	58
3.1.2	Normal-flow MEKC	59
3.1.2.1	Verwendung eines Boraxpuffers	60
3.1.2.2	Verwendung eines Megluminpuffers.....	62
3.1.2.3	Verwendung oberflächenmodifizierter Kapillaren	65
3.1.3	Ausgewählte normal-flow MEKC-Trennungen	67
3.1.3.1	Hydroperoxide und Hydroxyfettsäuren der Öl-, Linol- und Linolensäure	67
3.1.3.2	Hydroperoxide und Hydroxyfettsäuren der Arachidonsäure	69
3.1.3.3	Hydroperoxide der γ -Linolensäure	72
3.1.4	UV-Diodenarray-Detektion.....	75
3.1.4.1	Verwendung von Bubble-Cells.....	75
3.1.5	LIF-Detektion	77
3.1.5.1	Immobilisierung von MP-11 an der fused-silica Kapillarwand	79
3.1.5.2	Totvolumenfreie Kopplung von Trenn- und Reaktionskapillare.....	80
3.1.5.3	pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz und Umsatzrate der Derivatisierungsreaktion	81
3.1.5.4	Optimierung unter reversed-flow MEKC-Bedingungen.....	83
3.1.5.5	Optimierung unter normal-flow MEKC-Bedingungen.....	87
3.1.5.6	Theoretische Grundlagen und Simulation der Nachsäulen-derivatisierung	88
3.1.6	Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenzen.....	94
3.2	HPLC-Methoden für Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren.....	97
3.2.1	RP-HPLC-Trennung an einer Fluoralkylphase (Fluofix).....	97
3.2.1.1	Optimierung der Gradientenelution	99
3.2.2	Fast HPLC-Trennung an einer RP-18-Phase.....	101

3.2.3	Fluoreszenzdetektion.....	104
3.2.4	Chemilumineszenzdetektion.....	104
3.2.5	Nachweisgrenzen	105
3.3	Hydrolyse von nichtoxidierten und oxidierten Lipiden	107
3.3.1	Enzymatische Hydrolyse	107
3.3.2	Alkalische Hydrolyse	109
3.3.3	Vergleich der alkalischen und enzymatischen Hydrolyse von HPDOPC	110
3.4	Anwendungsbeispiele.....	114
3.4.1	Untersuchung von Ölen.....	114
3.4.1.1	Bestimmung von α - und γ -Linolensäure in Hanfsamen	114
3.4.1.2	Bestimmung der Oxidationsprodukte nach thermischer Belastung.....	116
3.4.2	Photosensibilisierte Oxidation von Soja- und Eilecithin-Rohware	119
3.4.3	Untersuchung von Synovia und Serum.....	123
3.4.3.1	Bestimmung von oxidierten Fettsäuren in Lipiden der Synovialflüssigkeit.....	123
3.4.3.2	Bestimmung von oxidierten Fettsäuren in Serumlipiden.....	124
3.4.4	Untersuchung von LDL.....	126
4	Zusammenfassung	131
5	Anhang	133
5.1	Simulation der Nachsäulenderivatisierung mittels MS VISUAL BASIC .	133
5.2	Abkürzungsverzeichnis	136
5.3	Abbildungsverzeichnis	139
5.4	Tabellenverzeichnis.....	146
5.5	Chemikalienliste	148
5.6	Geräteliste.....	152
5.7	Ergänzende Abbildungen	153
5.7.1	NMR-Spektren.....	153
5.7.2	NMR-Daten	163
5.7.3	Kalibriergeraden	167
5.7.4	Elektropherogramme und Chromatogramme	171
6	Literaturverzeichnis	180

1 Einleitung

Allgegenwärtig in der Natur gehören Öle und Fette seit alters her zu den Basisbestandteilen menschlicher Nahrung. Viele Lebensmittel und Gerichte erhalten durch sie erst die bekannte geschmackliche Note. Neben der Aromaentfaltung ermöglichen Lipide die zusätzliche Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen und liefern wichtige essentielle Bausteine für den Körper^[1]. Der hohe Energieinhalt von ca. 38 kJ (9 kcal) pro Gramm verleiht Fett seine sprichwörtliche „Effizienz“, sowohl bei der Energiezufuhr als auch bei der körpereigenen Energiespeicherung. Der Lipidgehalt des typischen, gesunden menschlichen Körpers beträgt bis zu 16 %. Dieser Wert kann je nach Veranlagung der entsprechenden Person im Gehalt jedoch von 8 % bis 50 % schwanken^[2].

Vom Organismus nicht verwertetes Fett wird hauptsächlich subkutan und im Muskelgewebe gespeichert. Neben der Funktion als Energievorrat dient es als Schutzpolster gegen mechanische Beschädigungen innerer Organe sowie zur Isolierung gegen Unterkühlung. Mit der Nahrung zugeführte Fette können infolge der Molekülgröße sowie der geringen Wasserlöslichkeit nicht ohne weiteres resorbiert werden. Daher müssen die aufgenommenen Triacylglycerine, Cholesterine und Phospholipide durch teilweisen hydrolytischen Abbau mittels Enzymen sowie feinste Emulgierung resorptionsfähig gemacht werden. Am endoplasmatischen Reticulum der Mucosazelle findet neben der intestinalen Spaltung und Resynthese der Triacylglycerine auch die Umwandlung der verschiedensten Lipide in unterschiedliche Lipoproteine statt. Nach dem proteinvermittelten Übergang in die Lymphflüssigkeit gelangen die Lipoproteine über den Ductus thoracicus in den großen Blutkreislauf^[3].

Störungen im Lipidstoffwechsel sind für die Pathophysiologie der verschiedensten Erkrankungen von eminenter Bedeutung. Neben den seltenen angeborenen Lipidosen sind beispielsweise Adipositas als Störung der Triacylglycerinspeicherung sowie Hyperlipoproteinämien am Zustandekommen der Arteriosklerose beteiligt^[3,4].

1.1 Biologische Bedeutung der einzelnen Lipidklassen

Chemisch betrachtet stellen Lipide eine Gruppe essentieller, chemisch verschiedener Biomoleküle dar, die als gemeinsames Merkmal eine mehr oder minder stark ausgeprägte Hydrophobizität besitzen. Lipide lösen sich daher gut in Ether, Chloroform und Hexan, schlechte Löslichkeit zeigen sie in Wasser und anderen polaren Lösungsmitteln. Ihre Amphiphilie verleiht ihnen das charakteristische Ausrichtungsverhalten an Grenzen zwischen polaren und unpolaren Phasen. Neben der Micellenbildung kommt es an solchen Grenzen zur Ausrichtung der hydrophoben Molekülabschnitte und somit zur Senkung der Oberflächenspannung. Entsprechend der Verschiedenartigkeit ihrer chemischen Natur gibt es eine Vielzahl von Einteilungsmöglichkeiten, die sich jedoch auf die folgenden Unterklassen reduzieren läßt ^[5].

Einfache Lipide

- a) Fette (Glycerinester höherer Fettsäuren)
- b) Öle (Glycerinester höherer, mehrfach ungesättigter Fettsäuren)
- c) Wachse (Ester langkettiger Fettsäuren mit langkettigen einwertigen Alkoholen)

Komplexe Lipide (Lipoide)

- a) Phospholipide (Glycerophosphatide)
- b) Sphingolipide (Sphingophosphatide)
- c) Steroide (Cholesterin, Hormone)
- d) Carotinoide

1.1.1 Cholesterin und Cholesterinester

Cholesterin (Abbildung 1.1) ist im Körper ubiquitär und ist ein essentieller Bestandteil von Lipoproteinen sowie Vorläufer (für die Synthese) der Steroidhormone, der Gallensäuren und des Vitamin D₃. Das zu den Lipiden gerechnete Cholesterin ist neben Phospho- und Glykolipiden wichtiger Bestandteil von Biomembranen ^[6]. Dort reguliert es insbesondere die Fluidität (innere Beweglichkeit) der Plasmamembranen. Der Biosyntheseweg von Cholesterin

verläuft ausgehend von Acetyl-CoA, unter anderem über Mevalonsäure, Squalen und Lanosterin. Täglich werden im Körper des Erwachsenen ca. 1–2 g Cholesterin synthetisiert. Dabei ist die Leber der Hauptbildungsort, aber auch in der Nebennierenrinde, der Haut und im Darm wird Cholesterin in geringen Anteilen gebildet. Im Gegensatz zu den ebenfalls endogen synthetisierten Triglyceriden und Phospholipiden kann der Sterolrest des Cholesterinmoleküls nicht mehr abgebaut werden. Es ist daher erforderlich, das peripher synthetisierte oder im Darm resorbierte Cholesterin zur Leber zu transportieren, wo es zum Teil in Gallensäuren (essentielle Cofaktoren für die Lipidresorption) umgewandelt wird, zum anderen Teil unverändert über die Galle in den Darm ausgeschieden wird. Der menschliche Körper enthält durchschnittlich 0.32 % Cholesterin. Im Plasma liegt Cholesterin zu 25-40 % als „freies“ (unverestertes) Cholesterin, zu 60-75 % mit ungesättigten Fettsäuren verestert in einem Gesamtgehalt von 0.15-0.25 % vor. Eine Differenzierung zwischen den beiden Formen von Cholesterin wird in der Routinediagnostik meist nicht vorgenommen^[7, 8]. Beide Formen werden gewöhnlich gemeinsam als Gesamtcholesterin bestimmt. Der Transport von Cholesterin im Plasma erfolgt wegen seiner geringen Löslichkeit als Komplex mit Apolipoproteinen. Dabei wird der Hauptteil in der LDL-Fraktion (Low Density Lipoproteins) transportiert, der Rest in der HDL- (High Density) und der VLDL-Fraktion (Very Low Density Lipoproteins) und nur wenig in Chylomikronen^[9].

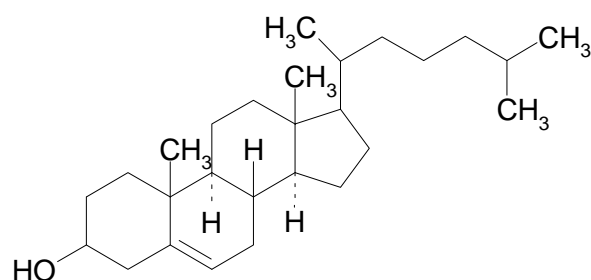


Abbildung 1.1: 5-Cholesten-3b-ol (Cholesterin)

1.1.2 Phospholipide

Phospholipide sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen in tierischen und pflanzlichen Zellen vor und stellen mit den Proteinen den Hauptbestandteil eukaryontischer Membranen dar. Neben ihrer strukturellen Bedeutung sind sie an zahlreichen metabolischen Vorgängen beteiligt^[10]. Phospholipide werden in

Phosphoglyceride (Abbildung 1.2) oder Phosphosphingoide (nicht abgebildet) unterteilt. Phosphosphingoide sind ähnlich aufgebaut wie Phosphoglyceride.

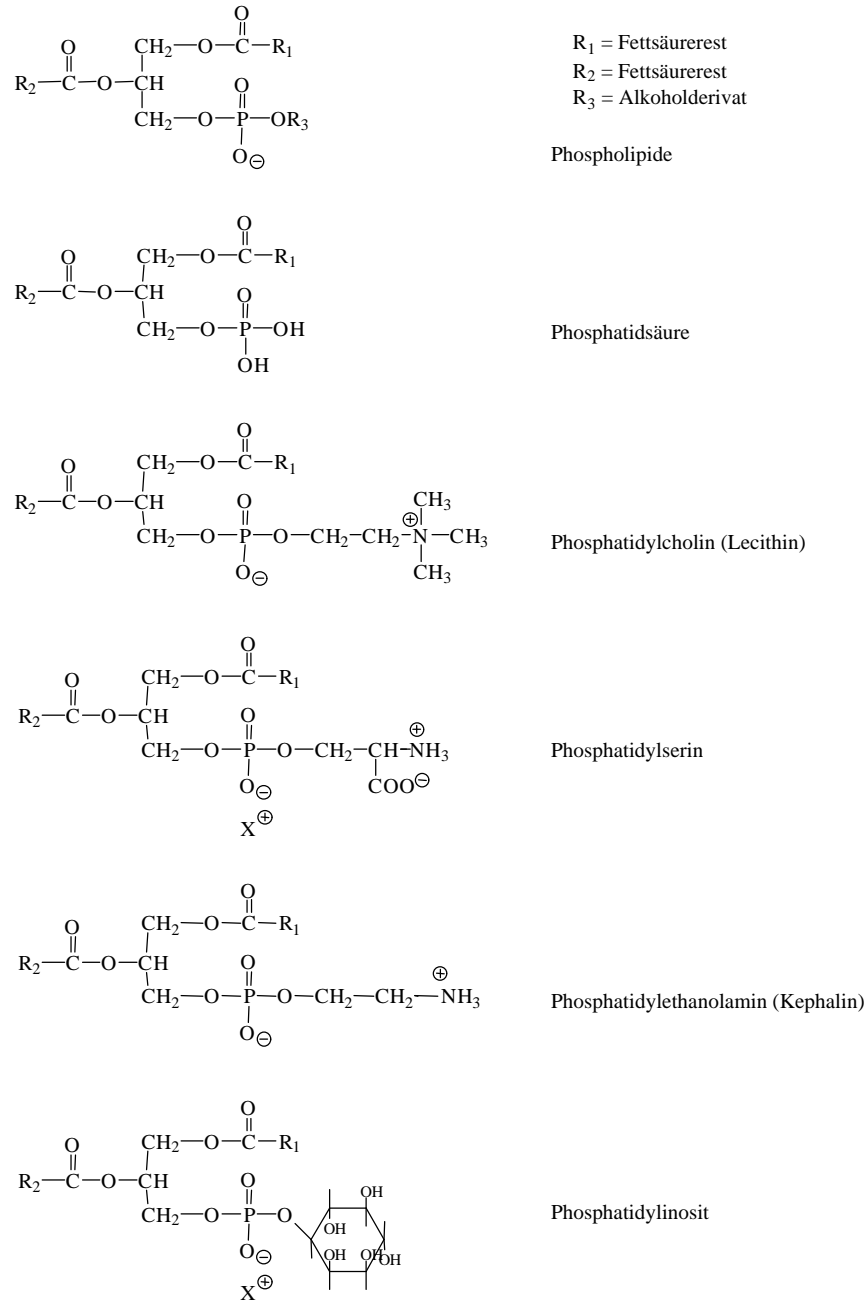


Abbildung 1.2: Wichtige Vertreter der Phosphoglyceride

Bei den Sphingolipiden übernimmt der Aminodialkohol Sphingosin die Rolle des Glycerins. Wenn die Aminofunktion des Sphingosins mit einer Fettsäure über eine Amidbindung verknüpft ist, entsteht Ceramid, das einfachste Sphingolipid. Eine weitere Gruppe der Phospholipide sind die Cardiolipine, welche als Vertreter der

Diphosphatidylglycerine nur in Mitochondrienmembranen des Herzens vorkommen. Die Nomenklatur der Phosphoglyceride leitet sich vom prochiralen L-Glycerin ab. Hierbei wird eine stereospezifische Numerierung der Acylreste verwendet, die mit dem Präfix „sn“ für „stereospecifically numbered“ gekennzeichnet wird. Alle Glycerophospholipide besitzen in der 2-Position ein asymmetrisches C-Atom und kommen in der Natur nur in der L-Form vor. Am C-1- und C-2-Atom des Glycerins sind Fettsäuren gebunden. Die Hydroxylgruppe am C-3-Atom ist mit Phosphorsäure bzw. Phosphorsäurederivaten verestert. Der einfachste Vertreter der Phosphoglyceride ist die Phosphatidsäure, die in Zellen jedoch nur selten vorkommt. Im Körper entsteht Phosphatidsäure als Zwischenprodukt der Biosynthese von Phospholipiden. Die wichtigsten Derivate der Phosphatidsäure sind Phosphatidylcholin (PC), -ethanolamin (PE), -serin (PS) und -inositol (PI). Bei diesen ist die Phosphorylgruppe mit der Hydroxylgruppe der Alkohole Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol verestert. Insbesondere Phosphatidylcholine (Lecithine) kommen als Bestandteile der Zellmembranen aller Lebewesen häufig vor. Besonders sind sie im Hirn, Eidotter und pflanzlichen Samenzellen anzutreffen. Die industrielle Gewinnung erfolgt überwiegend aus Sojabohnen. Die Gestalt dieser Moleküle ist, grob gesehen, rechteckig; beide Fettsäureketten verlaufen annähernd parallel zueinander, während der Phosphorylcholinanteil in die entgegengesetzte Richtung zeigt (Abbildung 1.3)^[9]. Die natürlich vorkommenden Phosphatidylcholone unterscheiden sich in den verschiedenen Kombinationen der Fettsäurereste.

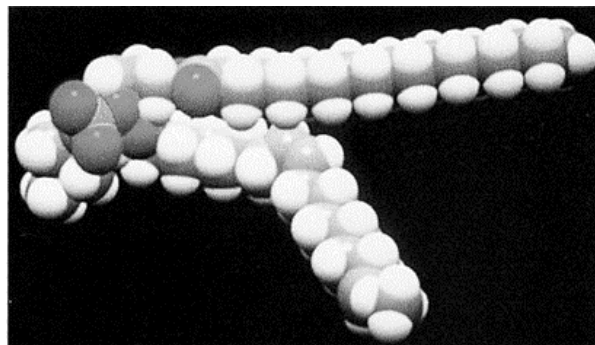


Abbildung 1.3: Chalottenmodell eines 1-Stearoyl-2-oleoyl-3-phosphatidylcholins

Normalerweise sind gesättigte Fettsäuren mit der primären und die ungesättigten mit der sekundären Hydroxylgruppe des Glycerins verestert.

1.1.3 Triglyceride

Von besonderer Bedeutung für den Stoffwechsel sind die Triacylglycerine (Abbildung 1.4), die als Energiespeicher vor allem im Fettgewebe abgelagert werden. Sie sind der häufigste Lipidtyp, kommen jedoch im Gegensatz zu Cholesterin und Phospholipiden nicht in Membranen vor ^[6]. Triacylglycerine unterscheiden sich nach Art und Position ihrer drei Fettsäurereste. Häufig treten gemischte Systeme auf, die zwei oder drei verschiedene Fettsäurereste in verschiedenen Positionen aufzeigen. Die Zusammensetzung der Triacylglycerine bestimmt hierbei den Schmelzpunkt. Vertreter mit hohem Anteil gesättigter Fettsäuren sind bei Raumtemperatur fest und werden als Fette bezeichnet. Öle hingegen sind flüssig und enthalten meist mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Triacylglycerine sind höchst effiziente Stoffwechselenergiespeicher, da sie in einer niedrigeren „Oxidationsstufe“ vorliegen als Kohlenhydrate und Proteine. Sie liefern bei ihrem Abbau Fettsäuren, die in Ketonkörper umgewandelt oder schließlich zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert werden können. Im Gegensatz zu den Triacylglycerinen bedingt das Vorkommen freier Hydroxylgruppen in Monoacyl- bzw. Diacylglycerinen, daß diese Verbindungen sowohl hydrophile wie auch hydrophobe Bereiche besitzen. Sie sind daher zur Bildung von Micellen und anderen geordneten Strukturen an wäßrigen Grenzflächen imstande und spielen während der duodenalen Resorption eine wichtige Rolle bei der Emulgierung von Lipiden ^[3]. Analog zum Cholesterin werden auch die Triglyceride wegen ihrer schweren Löslichkeit im Plasma an Apolipoproteine gebunden transportiert. Triglyceridreiche Lipoproteine sind Chylomikronen und VLDL, die auch als endogene Triglyceride bezeichnet werden.

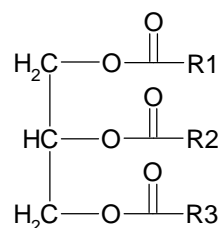


Abbildung 1.4: Triacylglycerin (Triglycerid)

1.2 Fettsäuren der Lipide

Die Fettsäuren der natürlichen Lipide enthalten normalerweise eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen mit einer typischen Kettenlänge von 14 bis 24. Sie werden auch im menschlichen Organismus aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA durch ein

Symbol	Trivialname	Systematischer Name	Summenformel	Schmp. (°C)
12:0	Laurinsäure	Dodecansäure	$C_{12}H_{24}O_2$	44.2
14:0	Myristinsäure	Tetradecansäure	$C_{14}H_{28}O_2$	52
16:0	Palmitinsäure	Hexadecansäure	$C_{16}H_{32}O_2$	63.1
18:0	Stearinsäure	Octadecansäure	$C_{18}H_{36}O_2$	69.6
20:0	Arachinsäure	Eicosansäure	$C_{20}H_{40}O_2$	75.4
22:0	Behensäure	Docosansäure	$C_{22}H_{44}O_2$	81
24:0	Lignocerinsäure	Tetracosansäure	$C_{24}H_{48}O_2$	84.2

Tabelle 1.1: Häufig vorkommende gesättigte Fettsäuren ^[8]

multifunktionales Enzym synthetisiert. Dabei ermöglicht die Fettsäure-Synthase eine einfache Polykondensationsreaktion, bei der jeweils C_2 -Einheiten addiert werden. Tabelle 1.1 und Tabelle 1.2 geben einen Überblick über die wichtigsten in

Symbol	Trivialname	Systematischer Name	Summenformel	Schmp. (°C)
16:1	Palmitoleinsäure	9-Hexadecensäure	$C_{16}H_{30}O_2$	-0.5
18:1	Ölsäure	9-Octadecensäure	$C_{18}H_{34}O_2$	13.4
18:2	Linolsäure	9,12-Octadecadiensäure	$C_{18}H_{32}O_2$	-9
18:3	α -Linolensäure	9,12,15-Octadecatriensäure	$C_{18}H_{30}O_2$	-17
18:3	γ -Linolensäure	6,9,12-Octadecatriensäure	$C_{18}H_{30}O_2$	–
20:4	Arachidonsäure	5,8,11,14-Eicosatetraensäure	$C_{20}H_{32}O_2$	-49.5
20:5	EPA	5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure	$C_{20}H_{30}O_2$	-54
24:1	Nervensäure	15-Tetracosensäure	$C_{24}H_{46}O_2$	39

Tabelle 1.2: Biologisch relevante ungesättigte Fettsäuren ^[8]

natürlichen Lipiden vorhandenen Fettsäuren. Mehr als die Hälfte der Fettsäuren in pflanzlichen und tierischen Lipiden sind einfach oder mehrfach ungesättigt. Fettsäuren aus Bakterien sind selten mehrfach ungesättigt, zeigen eine ungerade Anzahl von Kohlenstoffatomen und sind häufig verzweigt und hydroxyliert.

Im humanen Organismus liegen Fettsäuren unverzweigt vor. Die wichtigsten gesättigten Vertreter sind die in Abbildung 1.5 aufgeführten Palmitin- und Stearinsäure, die wichtigsten ungesättigten sind Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure, die all-cis Konfiguration aufweisen. Die physikalischen Eigenschaften von Fettsäuren sind von der Zahl der im Molekül enthaltenen Doppelbindungen abhängig. Aufgrund der freien Drehbarkeit um jede C–C-Einzelbindung können gesättigte Fettsäuren eine Vielzahl von Konformationen annehmen und sind somit hoch flexible Moleküle. Ungesättigte Fettsäuren besitzen eine starre 30°-Krümmung der Kohlenwasserstoffkette, die eine dichte Packung verhindert. Mit steigender Anzahl an Doppelbindungen sinkt der Schmelzpunkt durch die verringerten van-der-Waals-Kräfte. Die Fluidität der Lipide nimmt mit der Zahl der beteiligten ungesättigten Fettsäuren zu. Häufig werden drei einfache Regeln

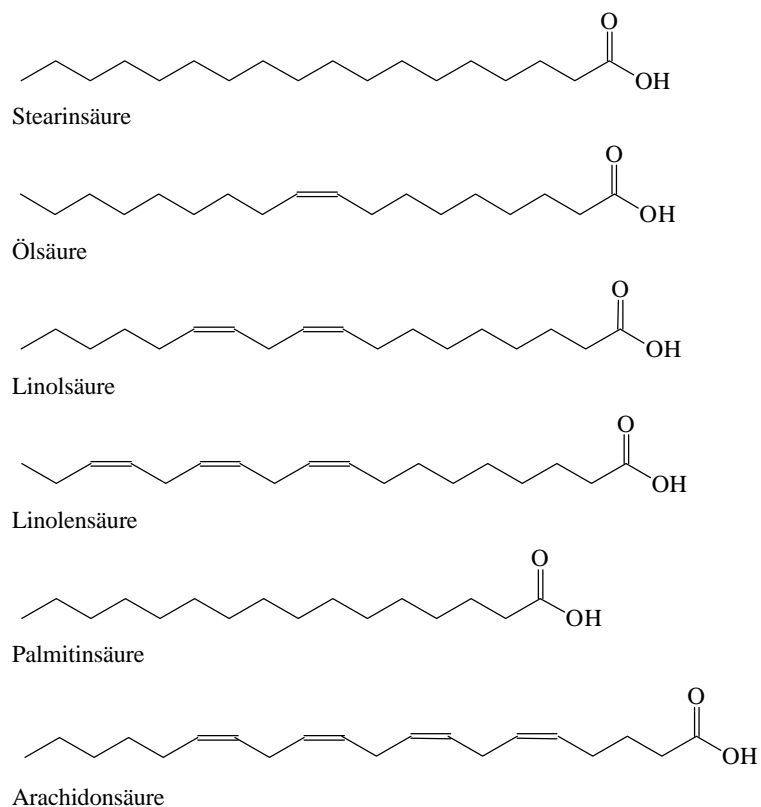


Abbildung 1.5: Wichtige Vertreter der im humanen Organismus vorkommenden Fettsäuren

benutzt, um die Fettsäuren zu bezeichnen. Die erste gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome und Doppelbindungen an, die zweite die Lage der ersten Doppelbindung, gezählt von der Säuregruppe und die dritte die Lage der ersten

Doppelbindung, gezählt vom Methylende. So wird beispielsweise die Linolensäure als **18:3; Δ^9** -Säure bezeichnet und zur Familie der **ω^3 -Fettsäuren** gezählt.

Zur Gewinnung von Energie werden Fettsäuren aus dem Zytoplasma als aktivierte Carnitylfettsäure in das Mitochondrium transportiert und dort im Rahmen der β -Oxidation schrittweise abgebaut. Als Zwischenprodukte treten dabei β -Hydroxy- bzw. β -Ketoacyl-CoA Verbindungen auf. Auf diese Weise wird eine um zwei C-Atome verkürzte Fettsäurekette gebildet, die einer erneuten β -Oxidation unterworfen werden kann ^[11, 12].

Der Mensch muß die essentiellen Fettsäuren Linol- und Linolensäure mit der Nahrung aufnehmen, da im Stoffwechsel jenseits der Δ^9 -Position keine Doppelbindungen eingeführt werden kann. Arachidonsäure, die als Vorstufe zur Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen dient, kann vom Organismus nur dann synthetisiert werden, wenn in ausreichender Menge Linolsäure zur Verfügung steht ^[13, 14]. Wegen ihrer Wirkung auf den Zellstoffwechsel, schon in geringsten Konzentrationen (10^{-10} - 10^{-8} mol/l), werden Prostaglandine und Leukotriene zu den Gewebeshormonen gerechnet. Essentielle Fettsäuren sind für das Wachstum erforderlich und maßgeblich am Aufbau von Membranen beteiligt ^[3]. Als wichtige Bausteine dieser Membranen beeinflussen die Fettsäuren deren Fluidität und Elastizität ^[15]. Sind nicht genügend essentielle Fettsäuren vorhanden, werden nichtessentielle Fettsäuren in Membranen eingebaut. Dieser Mangel kann beim Menschen zu Gewichtsverlust und Störung der Organfunktionen führen ^[10].

1.3 Biologische Membranen

Biologische Membranen sind organisierte Aggregate, die als hochselektive Permeabilitätsschranken die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums regeln. Ihre Funktion ist für jeden Organismus lebensnotwendig, da sie durch spezifische Reizrezeptoren den Informationsfluß zwischen den Zellen und ihrer Umgebung kontrollieren. Membranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden und Proteinen, wobei die jeweilige Zusammensetzung die Funktion der Membran bestimmt ^[9]. Von besonderer Bedeutung für die Ausbildung biologischer Membranen ist die Tatsache, daß amphiphile Lipide, speziell Phosphoglyceride und Sphingolipide, Doppelschichten („bilayer“) ausbilden können ^[16]. Die Doppelschichtbildung (Abbildung 1.6) beruht auf der Tatsache, daß sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Fettsäurereste von amphiphilen Lipiden gegeneinander orientieren, während die hydrophilen Teile sich zur wäßrigen Phase hin ausrichten. Die Lipidmembranen werden durch viele, sich gegenseitig verstärkende, nicht kovalente Wechselwirkungen stabilisiert. Solche Schichten sind für Ionen und die meisten polaren Moleküle kaum durchlässig. Sie sind jedoch als „flüssige Strukturen“

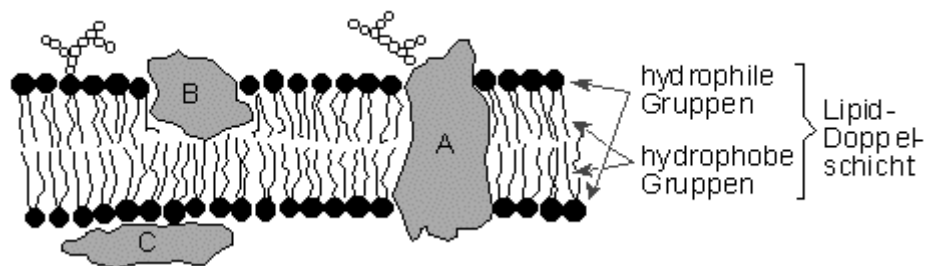


Abbildung 1.6: Aufbau einer biologischen Membran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell (A-C Anordnung verschieden hydrophober Proteine) ^[8]

anzusehen und können so als Lösungsmittel für Membranproteine dienen. Ihre Fluidität ist stark temperaturabhängig und bestimmt die Wechselwirkung der eingebetteten Proteine. Zusätzlich sind in biologische Membranen Enzyme eingebettet oder aufgelagert, die für Energieumwandlungsprozesse unerlässlich sind. Die wichtigsten Prozesse stellen dabei die Photosynthese an der inneren Membran der Chloroplasten und die oxidative Phosphorylierung an der inneren Membran der Mitochondrien dar ^[9]. Der Transfer von Lipidmolekülen durch eine Doppelschicht

(transversale Diffusion) geschieht außerordentlich langsam (einige Tage), da die polare Kopfgruppe durch die Doppelschicht transportiert werden muß. Im Gegensatz zur transversalen Diffusion, findet die laterale Diffusion fortwährend in einer Größenordnung von 1 µm pro Sekunde statt und sorgt somit für einen kontinuierlichen Austausch der Lipidmoleküle. In Tabelle 1.3 ist die Lipidzusammensetzung einiger biologischer Membranen zusammengefaßt ^[17].

Lipid	Menschliche Erythrocyten	Menschliches Myelin	Rinderherz Mitochondrien	<i>E. coli</i>
Phosphatidsäure	1.5	0.5	0	0
Phosphatidylcholin	19	10	39	0
Phosphatidylethanolamin	18	20	27	65
Phosphatidylglycerin	0	0	0	18
Phosphatidylinosit	1	1	7	0
Phosphatidylserin	8.5	8.5	0.5	0
Cardiolipin	0	0	22.5	12
Sphingomyelin	17.5	8.5	0	0
Glycolipide	10	26	0	0
Cholesterin	25	26	3	0

Tabelle 1.3: Lipidzusammensetzung einiger biologischer Membranen (in Gew.% vom Gesamtlipid)

1.4 Transport der Lipide im Blut

Eine Vielzahl von Lipiden lässt sich aus Blutserum mit geeigneten Lösungsmitteln extrahieren. Neben verestertem und nicht verestertem Cholesterin liegen im Serum Phosphoglyceride, Triacylglycerine sowie in sehr viel geringeren Mengen unveresterte langkettige Fettsäuren (Tabelle 1.4) vor^[3, 18]. Durch die überwiegenden

Lipid	Konzentrationsbereich	
	[mg/100ml]	[mmol/l]
Triacylglycerine	50-150	0.62-2.5
Phosphoglyceride	160-250 ^{a), b)}	2.2-3.4 ^{a)}
Cholesterin (frei + verestert)	120-220 ^{a)}	3.1-6.2 ^{a)}
Nicht veresterte Fettsäuren	14-22	0.5-0.8

^{a)} Normalwerte nehmen mit steigenden Lebensalter zu; ^{b)} momentan als klinischer Parameter ohne Bedeutung

Tabelle 1.4: Normale Konzentrationsbereiche der im Serum vorkommenden Lipide

hydrophoben Eigenschaften der Lipide ist es verständlich, daß dem Transport im wäßrigen Medium des Blutplasmas Schwierigkeiten entgegenstehen. Deshalb müssen die Plasmalipide durch Bindung an spezifische Transportproteine als Plasmalipoproteine expeditiert werden. Der Transport der relativ unbedeutenden Menge an nicht veresterten Fettsäuren erfolgt über das Serumalbumin.

Lipoprotein	Konzentrationsbereich [mg/100 ml]
Chylomikronen	keine nach 12stündigem Fasten
VLDL	1-30
LDL	60-160
HDL	35-65
Verhältnis LDL zu HDL < 3.5	

Tabelle 1.5: Normale Verteilung der Lipoproteine im menschlichen Serum

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihren funktionellen und physikalischen Eigenschaften. Chylomikronen, Very Low (VLDL), Intermediate (IDL), Low (LDL) und High (HDL) Density Lipoproteine sind entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte eingeteilt^[19] und variieren bezüglich ihres Protein- und Lipidgehalts. Tabelle 1.5 gibt den Bereich gesunder Lipoproteinwerte wieder^[18].

1.4.1 Aufbau und Funktion der Lipoproteine

Das allgemeine Strukturmodell der Lipoproteine basiert auf der Vorstellung eines hydrophoben Kerns und einer Hülle aus amphiphilen Komponenten (Abbildung 1.7). Letztere enthält Phospholipide, Cholesterin und Apolipoproteine, wohingegen der Kern aus verestertem Cholesterin und Triglyceriden besteht. Der relative Anteil dieser Komponenten bestimmt die Größe des sphärischen Partikels, die bis zur Bakteriengröße (ca. 1 µm) reichen kann. Die Oberflächeneigenschaften der Partikel, die überwiegend durch den Proteinanteil und die Phospholipide bestimmt werden, haben für den Lipoproteinstoffwechsel eine entscheidende Bedeutung. Sie

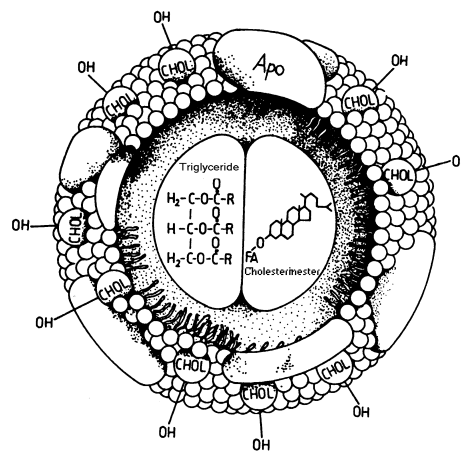


Abbildung 1.7: Strukturmodell der Lipoproteine ^[4]

bestimmen durch Interaktion mit triglyceridspaltenden oder cholesterinveresternden Enzymen, mit Lipidtransferproteinen und Zelloberflächenrezeptoren, weitgehend das metabolische Schicksal des Partikels sowie die Aufnahme zusätzlichen freien Cholesterins oder die Aktivität weiterer hydrolytischer Enzyme. Dabei weisen die

Lipoprotein- klasse	Partikelgröße [nm]	Dichtebereich [g/ml]	Prozentuale Zusammensetzung				
			Triglyceride	Cholesterin	Cholesterinester	Phospholipide	
Chylomikronen	80-1200	0.95	90-95	1	2-4	2-6	
VLDL	28-80	<1.006	50-65	5-8	8-14	12-18	
IDL	25-30	1.006-1.019	25-40	7-11	20-35	16-24	
LDL	19-25	1.019-1.063	6-12	6-10	35-45	22-26	
HDL	HDL ₂	8-11	1.063-1.125	3-8	4-6	15-20	30-40
	HDL ₃	6-9	1.125-1.210	3-5	1-3	10-18	25-35

Tabelle 1.6: Partikelgröße, Dichtebereich und prozentuale Zusammensetzung der menschlichen Serumlipoproteine ^[4]

Apolipoproteine diskrete Regionen auf, die ihnen die Interaktion sowohl mit wäßrigen als auch mit Lipidphasen ermöglichen ^[4]. Tabelle 1.6 gibt einen Einblick über die Zusammensetzung der wichtigsten Lipoproteine. Während des gesamten Lipoproteinkreislaufes werden fortlaufend die im Partikel enthaltenen Apolipoproteine variiert und somit die Erkennung der jeweiligen Lipoproteine und deren Funktionalität gesteuert. Eines der wichtigsten Apoproteine stellt Apo B 100 aufgrund seiner besonderen Bedeutung für den Cholesterintransport dar ^[6] (Bindungsfähigkeit des LDL Partikels an den Rezeptor).

1.4.1.1 Chylomikronen

Chylomikronen werden hauptsächlich als Antwort auf die mit der Nahrung zugeführten Lipide in den Darmmukosazellen gebildet. Der mittlere Durchmesser der Partikel beträgt 120 nm und schwankt stark aufgrund absorbierender und resorbierender Effekte (siehe auch Tabelle 1.6). Die Triglyceride, deren Fettsäuremuster dem der aufgenommenen Nahrungsfette entspricht, bilden mit 90-95 % der Masse den Hauptbestandteil der Chylomikronen ^[4]. Nachdem die Chylomikronen durch den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf gelangt sind, kommen sie im Kapillarendothel und im extrahepatischen Gewebe in engen Kontakt mit den Gefäßen. Die dort auf der Zelloberfläche lokalisierte Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert die enthaltenen Triglyceride zu Monoacylglycerinen und zwei freien Fettsäuren, die dann vom Gewebe aufgenommen werden. Die im Cholesteringehalt erhöhten Rest-Chylomikronen („Remnants“) gehören zur HDL-Klasse und werden in der Leber abgebaut ^[3].

1.4.1.2 VLDL und IDL

Von der Leber aufgenommene oder dort endogen synthetisierte Lipide werden in Form von VLDL an das Plasma abgegeben (Abbildung 1.8). VLDL sind mit einem Anteil von 55-65 % die wichtigsten „Carrier“ für Triglyceride. Auch sie verändern durch Hydrolyse mittels Lipoproteinlipasen (LPL) ihre Zusammensetzung. Die entstehenden kleineren, cholesterinreicheren und triglyceridärmeren IDL-Partikel („VLDL-Remnants“) werden zu ca. 80 % von der Leber aufgenommen. Nur ca. 20 % der IDL-Partikel werden zu LDL konvertiert ^[20].

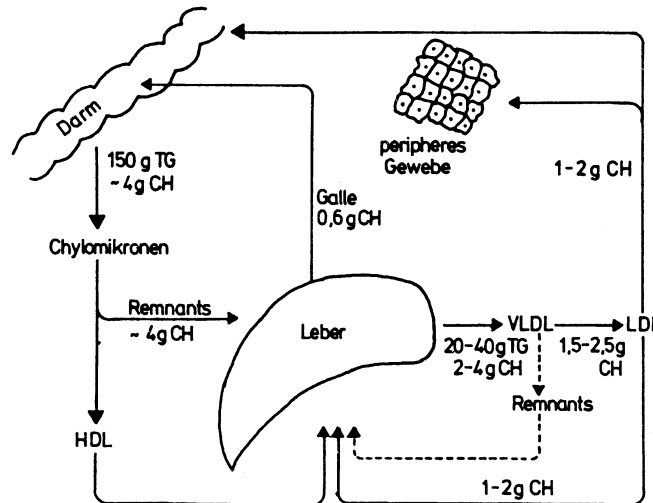


Abbildung 1.8: Täglicher Umsatz des Lipoproteincholesterin beim Menschen
TG Triglyceride; CH Cholesterin ^[4]

1.4.1.3 LDL

LDL-Partikel sind die wichtigste Transportform des Cholesterins im Serum. Sie enthalten bis zu 70 % des körpereigenen Gesamtcholesterins ^[3,4], davon liegen ca. 73 % als Cholesterinester im hydrophoben Kern des Partikels vor ^[21]. Als weitere wichtige Bestandteile enthalten LDL ca. 10 % Triglyceride und 25 % Phospholipide. Über die Bindung des LDL-Apoproteins an die LDL-Rezeptoren der Zielzellen wird das Cholesterin ins Gewebe aufgenommen. Rezeptoren vermitteln 60-90 % des LDL-Katabolismus, 10-40 % werden über den sogenannten „Scavenger-Pathway“ aus dem Plasma entfernt ^[20]. Das nicht direkt für den Membranaufbau benötigte Cholesterin wird in den Zellen verestert und gelagert. Ein großer intrazellulärer Überschuss an Cholesterinestern entsteht aber nicht, denn sowohl die zelleigene Cholesterinsynthese als auch die Bildung und der Einbau der LDL-Rezeptoren in die Zellmembran werden eingestellt, wenn die intrazelluläre Cholesterinkonzentration über ein bestimmtes Maß steigt. Dies hat einen erhöhten Serumspiegel an Cholesterin zur Folge ^[22].

1.4.1.4 HDL

Die wichtigste biologische Funktion der HDL ist die Fähigkeit, freies Cholesterin von peripheren Zellen aufzunehmen und durch die assoziierte Lecithin-Cholesterin-

Acyltransferase (LCAT) zu verestern. Somit ist eine Übertragung auf die IDL möglich, welche wie bereits oben beschrieben, zum größten Teil von der Leber abgebaut werden. Alle Daten sprechen dafür, daß die HDL-Partikel eine den LDL-Partikeln entgegengesetzte Funktion besitzen und sich positiv auf einen erhöhten Cholesterinspiegel und damit verbundene Erkrankungen auswirken ^[23, 24, 25]. Für HDL ist ein hoher Proteinanteil zwischen 40 und 55 % typisch. Der Phospholipid- und Cholesterinesteranteil liegt bei 23-30 % bzw. 12-16 % ^[4]. Beim Menschen können zwei Subpopulationen (HDL₂ und HDL₃) sicher abgetrennt werden, die sich deutlich im Phospholipid- und Cholesterinesteranteil und im Proteinanteil unterscheiden (Tabelle 1.7).

Lipoproteinklasse	Proteine ^{a)}	Phospholipide	Cholesterin		Triglyceride
			frei	verestert	
Chylomikronen	102000	45160	25840	27700	507000
VLDL	15656	4545	3539	3600	11500
LDL	4830	653	475	1310	298
HDL ₂	1476	137	50	90	19
HDL ₃	963	51	13	32	10

^{a)} angegeben als Zahl der Aminosäuren

Tabelle 1.7: Anzahl der verschiedenen Lipidmoleküle im menschlichen Serumlipoprotein

1.4.2 Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung der Lipoproteine

Phospholipide finden sich als amphiphile Verbindungen in der Oberflächenregion aller Lipoproteine, wobei ihr Massenanteil von 2 bis 40 % schwankt (Absatz 1.4.1). Am weitaus stärksten ist Phosphatidylcholin mit 66 % in VLDL- und LDL- und mit bis zu 74 % in HDL-Partikeln vertreten. Der Sphingomyelinanteil in diesen Fraktionen beträgt 23, 25 bzw. 13 %. Den Rest bilden Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinosit und Lysolecithin ^[4]. Fettsäuren sind in veresteter Form in Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterinestern der Lipoproteine nachweisbar. In den Triglyceriden von VLDL, LDL und HDL überwiegt mit ca. 35 % die Ölsäure, gefolgt von Palmitinsäure und Linolsäure. Die Cholesterinester der VLDL unterscheiden sich von denen der LDL und HDL durch ihren hohen Anteil an Ölsäure, während in den beiden letztgenannten Spezies die Linolsäure mehr als 50 % des Fettsäureanteils ausmacht. Bei den Phospholipiden

überwiegt in den drei genannten Dichteklassen die Palmitinsäure. Arachidonsäure ist mit 4-9 % stärker in den Cholesterinestern der VLDL als in den Triglyceriden vertreten. Der Fettsäurezusammensetzung muß vor allem im Zusammenhang mit dem Phasenzustand der Lipide eine hohe Bedeutung beigemessen werden, da dieser nicht unerheblich den Metabolismus der Partikel beeinflusst ^[4].

1.5 Oxidationsprodukte von Lipiden und Lipoproteinen

Die in den Kapiteln 1.1-1.4 aufgeführten Lipidklassen besitzen als gemeinsames Merkmal einen mehr oder weniger großen Anteil an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Die in den Hauptbestandteilen Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure enthaltenen Doppelbindungen sind leicht durch Sauerstoff oxidierbar. Die hierbei entstehenden Lipidhydroperoxide treten zum Beispiel bei der Alterung von fetthaltigen Lebensmitteln als Zwischenprodukte auf ^[26]. In dem als Desmolyse bezeichneten Prozeß werden durch primäre Spaltung der gebildeten Peroxide und Hydroperoxide zahlreiche unangenehm riechende und schmeckende Substanzen erzeugt ^[27, 28]. Diese sogenannte „Parfumranzigkeit“ führt im fortgeschrittenen Stadium zur Unbrauchbarkeit der Lebensmittel. Eine frühzeitige analytische Erfassung geringster Konzentration der primär gebildeten Lipidhydroperoxide ist somit für die Lebensmittelindustrie wichtig, um mögliche sekundär ablaufende Prozesse bei der weiteren Verarbeitung zu unterbinden. Neben den in Naturalien unerwünschten Effekten wird die Lipidperoxidation in biologischen Systemen für biochemische und toxische Effekte verantwortlich gemacht. So wird ihr eine Beteiligung bei der Photocarcinogenese und bei der Zerstörung von Proteinen und Biomembranen zugeschrieben ^[29]. Ähnliche Vorgänge sind auch bei der Schädigung von Pflanzen beobachtet worden. So kann durch die Aufnahme großer Ozonmengen über die Pflanzenstomata eine Oxidation der Membranlipide ausgelöst werden, die zur starken Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Kälteeinwirkung führt ^[30-33].

1.5.1 Lipidperoxidation als Folge von oxidativem Streß

Viele chronische Krankheiten, zu denen auch Atherosklerose ^[34, 35], Diabetes ^[36], Rheuma ^[37], multiple Sklerose ^[38, 39], Parkinsonsche Krankheit ^[40] und Alzheimerische Krankheit ^[41] zählen, werden mit „oxidativem Streß“ in Verbindung gebracht ^[42, 43]. Ebenso kann ein Zusammenhang von Lipidperoxidation und Krebs ^[44, 45, 46] nicht ausgeschlossen werden. Unter oxidativem Streß faßt man Vorgänge zusammen, die zur Schädigung von Gewebe führen und wahrscheinlich durch reaktive Sauerstoffspezies (wie z.B. $\cdot\text{O}_2^-$ und $\cdot\text{OH}$) ausgelöst werden ^[47, 48, 49].

Eine besonders wichtige Rolle wird hierbei den $\bullet\text{OH}$ -Radikalen zugesprochen, die in Gegenwart katalytischer Mengen an Eisenionen aus Wasserstoffperoxid gebildet werden können. [21, 50].

Die am häufigsten auftretende, altersbedingte Krankheit ist die Atherosklerose, ein pathologisches Alterungsphänomen von Gefäßgewebe [51]. *Goldstein und Brown* sowie andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß erhöhte LDL-Werte ein wichtiger Risikofaktor für diese Krankheit sind und einen maßgeblichen Einfluß auf die Läsion der Arterien besitzen [52-57]. Nach heutigem Wissensstand treten durch einen gestörten Lipoproteinstoffwechsel nicht nur erhöhte LDL-Konzentrationen im Blut sondern auch in der Intima auf (vgl. Abbildung 1.9).

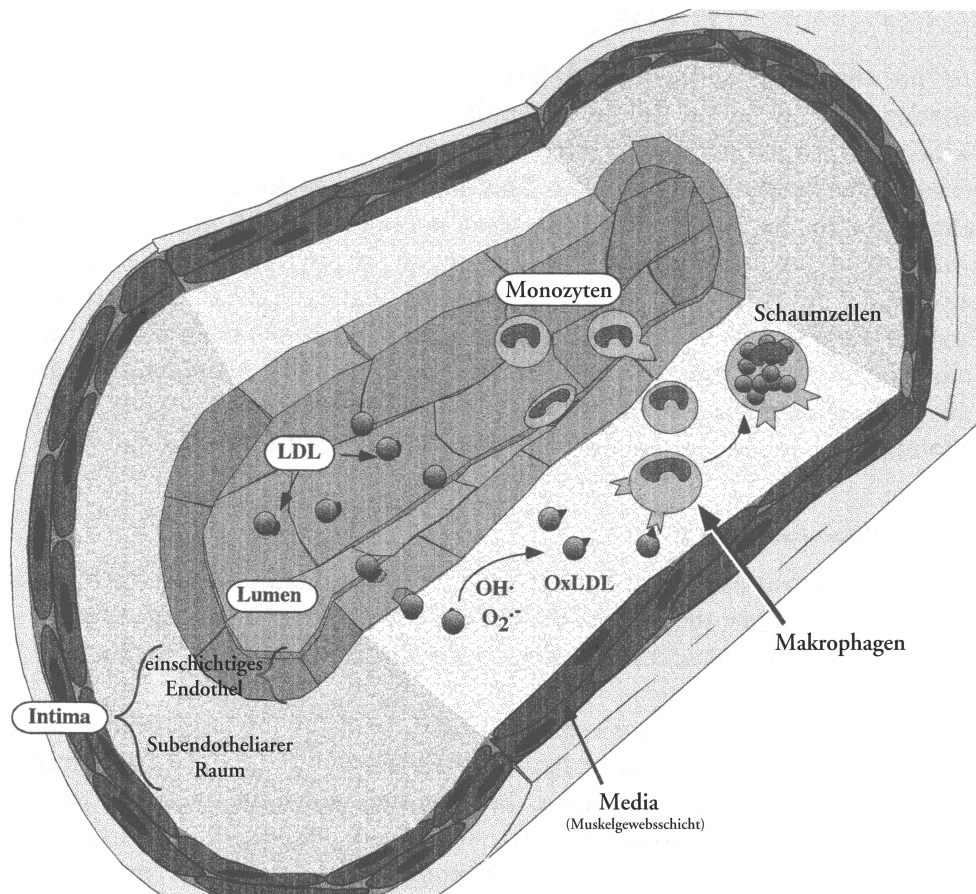


Abbildung 1.9: Pathogenese der Atherosklerose (Querschnitt durch eine Arterie) [21]

Oxidationsprozesse durch freie Radikale und / oder Lipoxygenasen, welche bei hohen LDL-Konzentration in den Partikeln vermehrt auftreten können, werden als Ursache der Gefäßveränderungen diskutiert [58, 59]. Die geringe Dichte der LDL-Partikel ermöglicht den leichten Durchtritt durch das Endothel und damit eine von

der Plasmakonzentration abhängige Anreicherung in der Gefäßwand. Die LDL-Aufnahme in die Media erfolgt dann rezeptorvermittelt, z.B. über das Apolipoprotein B100.

Während das Blut reich an Antioxidantien ist, existiert dieser Schutz in der Intima nicht. Hohe Konzentrationen von LDL im Serum begünstigen den Aufenthalt der LDL-Partikel in den inneren Gefäßschichten. Dort können von Gewebsmakrophagen gebildete Sauerstoffradikale sowie Enzyme ungesättigte Fettsäuren und Apolipoproteine oxidieren. Oxidierte LDL-Partikel haben zwei negative Effekte: Zum einen ziehen sie weitere Makrophagen an ^[22], zum anderen werden sie über den normalen saturierbaren Rezeptorweg (Apo B, E) nur noch bedingt aufgenommen ^[20]. Es existiert, wie in Kapitel 1.4.1.3 erwähnt, noch ein weiterer Mechanismus, der sogenannte „Scavenger-Pathway“, über den LDL nicht saturierbar (nicht gesteuert) in die Zellen resorbiert werden kann. Dieser Weg wird immer dann bevorzugt, wenn die Aktivität der spezifischen Rezeptormechanismen eingeschränkt ist. Der für die Aufnahme verantwortliche „Scavenger-Rezeptor“ akzeptiert auch chemisch modifizierte (wie z.B. oxidierte) LDL und baut diese in die „Scavenger-Zellen“ ein. Aufgrund der Cholesterinübersättigung werden die an der Atherogenese beteiligten, lipidüberladenen „Schaumzellen“ generiert ^[20]. Da ein Abtransport des phagozytierten Cholesterins durch HDL nicht mehr in einem ausreichenden Maßstab gewährleistet ist, wird verestertes, kristallines Cholesterin immer weiter in den Schaumzellen eingelagert. Ältere Schaumzellen sterben ab und bilden den Anfang eines Atheroms, das entsprechend durch einen zentralen Herd nekrotischer Schaumzellen und freigesetztes Cholesterin gekennzeichnet ist ^[60]. Gleichzeitig induziert oxidiertes LDL in den noch vitalen Plaque-Makrophagen die Synthese von Faktoren, die eine Proliferation der Media und die Bildung von Kollagenen bewirken. Neben der Einlagerung von Calciumsalzen kann außerdem auch eine Thrombozyten-Aktivierung bei der zunehmenden Verengung der Arterien eine wichtige Rolle spielen. Die durch die modifizierten LDL verursachten Endothelschädigungen ^[61, 62, 63] und das hieraus resultierende atherosklerotische Plaque führen schließlich zu Schlaganfall, Herzinfarkt und arteriellen Verschlusskrankheiten. Der Schutz der cholesterinhaltigen LDL-Partikel vor oxidativen Veränderungen ist deshalb ein wichtiger Faktor bei der Prävention koronarer Erkrankungen.

1.5.2 Bedeutung der Fettsäurehydroperoxide und ihrer korrespondierenden Hydroxyfettsäuren

Der erste Schritt bei den oben erwähnten oxidativen Vorgängen ist meist die Bildung von Hydroperoxiden an den ungesättigten Fettsäuren der Lipide, insbesondere an der Linolsäure (ODE) ^[64]. Freie Fettsäuren haben keine große Bedeutung. Gebildete Hydroperoxide werden in biologischen Systemen durch Glutathion-Peroxidase allerdings leicht zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen reduziert ^[65]. Neben der direkten Bestimmung der Fettsäurehydroperoxide können auch die Hydroxyfettsäuren als analytischer Parameter für die Bestimmung des Oxidationszustandes der Lipide genutzt werden ^[66, 67, 68]. Nach *Spiteller et al.* sind besonders die Hydroxyfettsäuren der Linolsäure (9- und 13- HODE) gute „Marker“ zur Ermittlung von Lipidperoxidationsprozessen (LPO) ^[69].

Untersuchungen von älteren Atherosklerose-Patienten ergaben eine 20- bis 100-fache Erhöhung dieser Hydroxyfettsäuren im LDL des Serums gegenüber den Probanden einer gesunden, jungen Vergleichsgruppe. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß mit zunehmendem Alter mehr oxidiertes LDL im Plasma vorliegt ^[70]. Im Herzgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde im Vergleich zu gesunden Personen eine 10-fach höhere Hydroxyfettsäurekonzentration gefunden ^[71]. Außerdem konnten *Spiteller et al.* eine um 95 % verminderte Oxidationsfähigkeit von HDL- gegenüber LDL-Partikeln nachweisen ^[72, 73]. (Die Bedeutung dieses Befundes ist allerdings noch unklar).

1.6 Bildung von Lipidhydroperoxiden

Die Bildung von Lipidhydroperoxiden erfolgt im allgemeinen durch Autoxidation, Lipoxygenase-Katalyse und Photooxygenierung der im Lipid gebundenen ungesättigten Fettsäuren. Diese drei Reaktionswege unterscheiden sich sowohl in Mechanismus als auch in der Zahl und Art der anfallenden Produkte ^[26, 74]. In der nachfolgenden Tabelle sind die verschiedenen relevanten Hydroperoxide der einzelnen Reaktionswege für Öl-, Linol- und Linolensäure aufgeführt.

	Autoxidation ($^3\text{O}_2$)	Oxidation mit $^1\text{O}_2$	Enzymatische Oxidation
Ölsäure	8-OOH (26-28 %) 9-OOH (22-24 %) 10-OOH (22-24 %) 11-OOH (26-28 %)	9-OOH (ca. 50 %) 10-OOH (ca. 50 %)	keine Oxidation bekannt
Linolensäure	9-OOH (ca. 50 %) 13-OOH (ca. 50 %)	9-OOH (32 %) 10-OOH (17 %) 12-OOH (17 %) 13-OOH (34 %)	9-OOH (Lipoxidase aus Tomaten) 13-OOH (Lipoxidase aus Sojabohnen)
Linolensäure	9-OOH (27-35 %) 12-OOH (10-13 %) 13-OOH (10-13 %) 16-OOH (41-52 %)	9-OOH (20-29 %) 10-OOH (12-16 %) 12-OOH (12-16 %) 13-OOH (12-16 %) 15-OOH (12-16 %) 16-OOH (20-29 %)	13-OOH (Lipoxidase aus Sojabohnen)

Tabelle 1.8: Verteilung der Fettsäurehydroperoxide in Abhängigkeit der Oxidationsmethode

Durch Reaktion mit Sauerstoff entstehen im Körper leicht Lipidhydroperoxide als primäre Oxidationsprodukte ^[21, 75, 76]. Im Hinblick auf die Synthese dieser Verbindungsklassen sind jedoch einige Vorüberlegungen nützlich: Da fast alle organischen Moleküle im Singulett-Grundzustand vorliegen, ist eine direkte Oxidation mit dem im Triplett-Grundzustand vorliegenden Sauerstoff spinverboten. Deshalb wird der Triplett-Sauerstoff in den reaktiven Singulett-Zustand überführt. Da Sauerstoff nicht in der Lage ist, sichtbares Licht zu absorbieren, wird ein Photosensibilisator wie Metylenblau zugesetzt, der durch Bestrahlung angeregt wird. Durch Stoß erfolgt eine Energieübertragung auf den Triplett-Sauerstoff, der als

$^1\text{O}_2$ nun in der Lage ist, über eine Hetero-En-Reaktion die ungesättigten Fettsäuren zu Fettsäurehydroperoxiden zu oxidieren. Die Reaktion erfordert jedoch Doppelbindungen mit allylständigem Wasserstoff. In den Fettsäuren verfügt jede Doppelbindung über zwei allylische CH_2 -Gruppen, so daß pro Doppelbindung zwei Hydroperoxidisomere entstehen. Aufgrund der hohen Reaktivität von Singulett-Sauerstoff sind zudem Mehrfachoxidationen zu Di-Hydroperoxiden möglich ^[77, 78, 79]. Ein weiterer Weg der Synthese von Lipidhydroperoxiden stellt die Autoxidation dar. Hierbei handelt es sich um eine radikalische Kettenreaktion, in deren Verlauf an den ungesättigten Fettsäuren der Lipide Monohydroperoxide mit einem konjugierten Diensystem entstehen. Die Geschwindigkeit der Autoxidation von Lipiden hängt von verschiedenen Faktoren ab: der Fettsäurezusammensetzung, der Konzentration der anwesenden Pro- und Antioxidantien, dem Sauerstoffpartialdruck und der Größe und Art der Oberfläche, die mit dem Sauerstoff in Kontakt kommt. Der wichtigste Faktor aber ist die Anzahl der Doppelbindungen im Fettsäuremolekül ^[80]. So ist die Geschwindigkeit der Oxidation bei einer dreifach ungesättigten Fettsäure um den Faktor 25 größer, als bei einer Fettsäure mit nur einer Doppelbindung.

Die enzymatische Oxidation ermöglicht eine selektive Einführung der Hydroperoxidgruppe. In Pflanzen und in bestimmten tierischen Geweben sind Lipoxygenasen für die Oxidation der Fettsäuren zu Hydroperoxiden verantwortlich. Die Regioselektivität ist dabei von der Art des Enzyms und den Reaktionsbedingungen abhängig ^[80, 81]. Für die Lipoxygenase-katalysierte Oxidation muß ein *Z,Z*-1,4-Pentadiensystem vorliegen, aus dem ein *Z,E*-konfiguriertes Diensystem entsteht ^[82]. Daher ist eine Umsetzung von z.B. Ölsäure nicht möglich.

1.7 Enzyme

Enzyme sind bemerkenswerte Biokatalysatoren, die in der Natur bestimmte chemische Reaktionen beschleunigen. Aufgrund ihrer Selektivität und ihrer hohen Aktivität unter milden Reaktionsbedingungen werden sie in vielen Bereichen der Chemie (org. Chemie, Lebensmittelchemie, Biochemie) eingesetzt ^[83]. Im besonderen werden die herausragenden Eigenschaften seit Jahren für die Herstellung enantiomerenreiner Zwischenprodukte, für die Synthese von Naturstoffen bzw. Pharmaka und zum Einsatz in komplexen biologischen Proben genutzt.

Enzyme sind hochmolekulare, aus peptidisch verknüpften Aminosäuren aufgebaute Proteine. Die eigentlichen chemischen Reaktionen finden an katalytischen Zentren statt, den prosthetischen Gruppen. Durch die Bindung des Substrats an diese Zentren der Enzyme wird die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion stark erniedrigt. Dabei ist eine Geschwindigkeitssteigerung gegenüber der unkatalysierten Reaktion um den Faktor 10^8 bis 10^{12} möglich.

Der Einsatz eines Enzyms ist im wesentlichen davon abhängig, ob es im verwendeten Medium ausreichend stabil ist und ohne großen experimentellen Aufwand eingesetzt werden kann. Weiterhin sollte das Enzym leicht verfügbar und kostengünstig sein.

1.7.1 Lipasen

Die International Union of Biochemistry (IUB) unterteilt die bislang bekannten Enzyme in Abhängigkeit ihrer katalytischen Funktionen in sechs Klassen ^[84]. Lipasen gehören zur Unterklasse 3.1.1.3, den Triacylglycerol-Acylhydrolasen. Sie sind in der Natur weit verbreitet und kommen in den Organen fast aller Tiere, in vielen Pflanzen (z.B. im Ölsamen der Rizinus-Pflanze), sowie in Bakterien (z. B. Lipoproteinlipasen) und Pilzen vor. Lipasen hydrolysieren in wäßrigem Medium Triglyceride zu Diglyceriden und freien Fettsäuren, wobei der Fettsäurerest in Mittelstellung häufig nicht oder nur sehr langsam abgespalten wird. Die Umsetzung im wäßrigen Medium führt durch den hohen Überschuß an Wasser als Nucleophil zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zugunsten des Alkohols und der am Triglycerid gebundenen Carbonsäure.

Lipasen reagieren bevorzugt mit emulgierten Fetten und nur schlecht mit einfachen Estern. Die optimalen Reaktionsbedingungen der Lipasen sind von der Quelle des Enzyms abhängig. Mikrobielle Lipasen erreichen ihr Wirkungsoptimum in der Regel bei pH 7.0 und 37 °C, während animale Lipasen bei pH 9 und 37 °C optimal reagieren. Bei Inhibitoren und Aktivatoren zeigen sich ebenfalls Unterschiede. Alle Lipasen werden jedoch durch Calcium-Ionen aktiviert ^[85, 86, 87].

1.7.2 Phospholipasen

Phospholipasen gehören zur Klasse der Hydrolasen, die eine spezifische Spaltung von Phospholipiden bewirken. Wie in Abbildung 1.10 aufgeführt, unterscheidet man diese Enzyme nach ihrem Angriffspunkt ^[80]. Sie lösen entweder Carbonsäureester- (Phospholipase A und B) oder Phosphodiester-Bindungen (Phospholipase C und D). Durch Verwendung von Phospholipase B (EC 3.1.1.5), die im Pankreas und anderen tierischen Organen gefunden wird, ist eine Abspaltung der beiden am Phosphoglycerid gebundenen Fettsäuren möglich ^[88]. Dieses Enzym reagiert optimal in einem pH-Bereich von 7.0 bis 7.6 und wird durch Ca^{2+} -Ionen aktiviert ^[89].

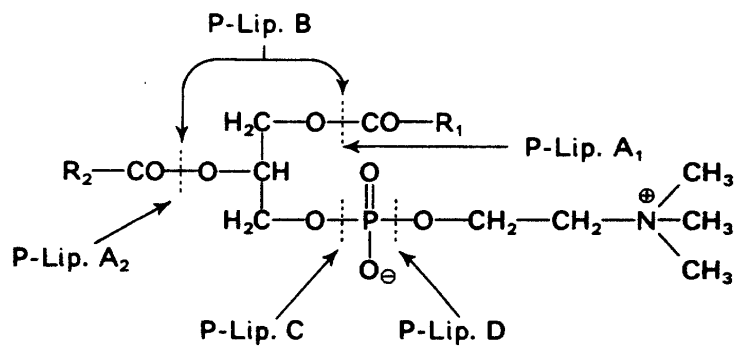


Abbildung 1.10: Angriffspunkte der Phospholipasen

1.7.3 Lipoproteinlipasen

Lipoproteinlipasen (LPL, EC 3.1.1.34) nehmen eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel ein. Viele Organe weisen nur einen begrenzten Glykogenspeicher auf. Die Enzyme haben die Aufgabe, die Energiebereitstellung abzusichern. In Zeiten verminderter Verfügbarkeit von Kohlenhydraten werden Triglyceride aus Chylomikronen- und VLDL-Triglyceriden unter Freisetzung von Fettsäuren gespalten ^[4]. LPL findet man in den meisten Geweben, besonders im Fettgewebe, dem Herzmuskel und der Lunge vor. Einige Lipoproteinlipasen zeigen jedoch nur eine mäßige Substratspezifität, so daß eine aus Muttermilch isolierte LPL nicht nur Tri-, Di- und Monoacylglycerine hydrolysiert, sondern auch Phospholipide.

1.7.4 Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT, EC 2.3.1.43) wird in der Leber synthetisiert und bildet zu etwa 90 % die im Humanserum vorhandenen Cholesterinester. LCAT spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus der Lipoproteine. Gebunden an den HDL-Partikeln katalysiert die LCAT die Umesterung der Fettsäuren. Sie ist im eigentlichen Sinne keine Lipase, überträgt die in C2-Stellung gebundene Fettsäure der Phospholipide auf die Hydroxylgruppe in C3-Stellung des Cholesterinmoleküls.

1.7.5 Cholesterin-Esterase

Cholesterin-Esterase (Sterolester-Acylhydrolase, EC 3.1.1.13) spaltet Cholesterinester in freies Cholesterin und Fettsäuren. Sie findet Verwendung in der vollenzymatischen Cholesterinbestimmung und eignet sich durch ihre Selektivität zur kontrollierten Abspaltung von Cholesterin-Fettsäuren aus komplexen Lipidgemischen und Lipoproteinen.

1.8 Methoden der Lipid- und Lipidhydroperoxidanalytik

Zum Nachweis von Lipiden ^[90-95] und Lipidhydroperoxiden ^[96] stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die sich über ein weites Gebiet der analytischen Chemie erstrecken. Hierzu zählen einfache Techniken wie die Dünnschichtchromatographie (TLC), photometrische Methoden und Titrations, aber auch komplexe Systeme wie die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), die Gaschromatographie (GC) und die Kapillarelektrophorese (CE), welche in Kombination mit den verschiedensten Detektionssystemen (UV, Fluoreszenz, Chemilumineszenz und Massenspektroskopie) genutzt werden. Die Komplexität der Lipid- und Lipoproteinmoleküle erfordert dabei eine breite Fächerung der Probenvorbereitungstechniken, welche zur Analyse unterschiedlichster Stoffklassen eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Molekülmassen und der thermischen Labilität mancher Oxidationsprodukte gewinnt die HPLC in der Lipidanalytik immer mehr an Bedeutung.

Zur Gruppentrennung von Phosphatidylcholinen, - inositolen, -ethanolaminen und -serinen wird im allgemeinen die Umkehrphasen (RP)-HPLC eingesetzt ^[97, 98, 99]. Die Trennung verschiedener Diacylglycerine ^[100] nach enzymatischer Spaltung der Phosphatidylglyceride mit Phospholipase C ist nur ein Beispiel, das die Möglichkeiten und Komplexität im Bereich dieser Analytik verdeutlichen soll. Eine Trennung der Phosphoglyceride von den durch Oxidation gebildeten Hydroperoxiden oder deren Folgeprodukten ist mit diesen Verfahren aber nicht möglich. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in Verbindung mit der UV / VIS-Detektion ^[101], elektrochemischen Detektion ^[102] und Chemilumineszenzdetektion erzielt ^[103, 104, 105]. Die Kombination von Chemilumineszenzdetektion und HPLC stellt dabei aufgrund hoher Empfindlichkeit und Selektivität eine der vielversprechendsten Methoden für Lipidhydroperoxide dar. Die Zudosierung einer Lösung von Luminol bzw. Isoluminol und Cytochrom c ^[106, 107, 108] oder Mikroperoxidase ^[109, 110, 111] ermöglicht den Nachweis von Phospholipidhydroperoxiden. *Holley und Slater* und *Miyazawa et al.* gelang so die Detektion dieser Komponenten im menschlichen Blutplasma ^[110] und in LDL-Fraktionen ^[104, 112]. Nachsäulenderivatisierungsreaktionen in Verbindung mit fluorimetrischer Detektion konnten ebenfalls erfolgreich zur Bestimmung von oxidierten Cholesterinestern, Triglyceriden und

Phospholipiden eingesetzt werden ^[113, 114, 115]. Dabei erlaubt die Chemilumineszenz- und Fluoreszenzmessung im allgemeinen die Bestimmung sehr geringer Hydroperoxidkonzentrationen mit einer absoluten Nachweisgrenze von wenigen Picomol. Triglyceride werden in der Regel über die gebundenen Fettsäuren bestimmt, die sich nach Umesterung mittels GC analysieren lassen. In der Literatur finden sich nur wenige Beispiele für eine direkte Analyse der Triglyceride durch GC ^[116] oder HPLC ^[117]. Bei gemischten Fettsäuremustern sind lediglich Gruppenbestimmungen möglich, da die isomeren Triglyceride nicht vollständig aufgelöst werden können. Die Trennung von oxidierten Triglyceriden wird in der Literatur wegen der thermischen Instabilität nur für die HPLC mit UV-Detektion ^[118] beschrieben. Kapillarelektrophoretische Methoden zur Trennung unterschiedlicher Lipidklassen sind bisher nur selten eingesetzt worden ^[119]. In einigen Fällen wurden diese Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen benutzt, um eine einfache und schnelle Probenvorbereitung zu ermöglichen. So entwickelten *Suh et al.* ^[120] eine Methode zur Analyse von Phosphatidylinositolen (PI) und Diacylglycerinen (DAG), um die Aktivität von Phospholipase C zu bestimmen. Die simultane Trennung von oxidierten und nicht oxidierten Lipidklassen wurde allerdings nicht beschrieben. Eine Möglichkeit, oxidative Veränderungen in LDL-Partikeln nachzuweisen, ist deren direkte kapillarelektrophoretische Untersuchung. *Stocks und Miller* ^[121] zeigten, daß sich das Migrationsverhalten der LDL-Partikel nach Cu^{2+} -katalysierter Oxidation deutlich ändert. Für die oxidierten Formen konnten jedoch keine scharfen Signale erhalten werden.

1.8.1 Bestimmung von Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxiden

Zur Bestimmung von Fettsäurehydroperoxiden wird häufig die HPLC eingesetzt ^[122–130]. Hinsichtlich der Trennleistung gibt es zwischen der Normalphasen (NP)- und der RP-HPLC große Unterschiede.

Die Analyse isomerer Fettsäurehydroperoxide ist in der Literatur bisher nur für die NP-HPLC beschrieben worden, wobei die Hydroperoxidgruppe meist vorher zum Alkohol reduziert und die Säurefunktion verestert wurde. Die NP-HPLC weist jedoch verschiedene Nachteile auf. Als Lösungsmittel werden für diese Trennungen häufig Gemische aus Hexan oder Heptan mit einem geringen Zusatz von 2-Propanol, Ethanol oder Diethylether verwendet. Schon geringe Veränderungen der

Eluentenzusammensetzung führen zu großen Änderungen in den Retentionszeiten der untersuchten Verbindungen ^[131]. Bereits Spuren von Wasser im Eluenten bzw. auf der stationären Phase führen zu einem Verlust der Trennleistung. Ein erheblicher Nachteil der NP-HPLC ergibt sich durch die Einschränkungen bei der Wahl geeigneter Detektionssysteme. Viele Nachsäulenderivatisierungsreagenzien sind im Eluenten wegen des hohen Hexananteils nicht löslich. Der Einsatz enzymatischer Nachsäulenderivatisierungssysteme, bei denen z.B. Cytochrom c oder Mikroperoxidase eingesetzt werden, ist ebenfalls problematisch, da die Enzyme in den organischen Lösungsmitteln denaturieren können ^[132]. Aus diesem Grunde wurden in der Literatur überwiegend Analysen mit UV-Detektion bei 200 oder 234 nm beschrieben. Während die NP-HPLC eine Trennung isomerer Fettsäurehydroperoxide ermöglicht, gibt es noch keine entsprechenden Beispiele in der RP-HPLC. Mit der RP-HPLC läßt sich jedoch eine recht gute Trennung der Lipidklassen erzielen. Dabei kommen sowohl RP-8- als auch RP-18-Materialien zum Einsatz. Als mobile Phase werden in der Regel Gemische aus Methanol bzw. Acetonitril und Wasser verwendet. Diese Eluenten ermöglichen den Einsatz verschiedener Nachsäulenderivatisierungsreaktionen, die sowohl die Selektivität als auch das Nachweisvermögen verbessern. Desweiteren wird zur Analyse der Fettsäuren und der Fettsäurehydroperoxide die Gaschromatographie ^[133–139] eingesetzt. Die Polarität und thermische Instabilität dieser Verbindungen erfordern eine vorherige Derivatisierung, bei der die Carboxylgruppen verestert ^[134–139] und die Hydroperoxygruppen silyliert werden ^[133, 138, 139].

Neben den oben beschriebenen Methoden konnten verschiedene Arbeitsgruppen auch die Kapillarelektrophorese erfolgreich zur Trennung von Fettsäuren einsetzen. Zur Bestimmung gesättigter Fettsäuren wurde oftmals die indirekte UV-Detektion angewandt. *Gutnikov et al.* ^[140] und *Erim et al.* ^[141] konnten mit Hilfe der Kapillarezonenelektrophorese ein partielles Fettsäureprofil von natürlichen Fetten beobachten. *Roldan-Assad et al.* ^[142] verwendeten erstmals die MEKC zur Trennung von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von bis zu 20 C-Atomen. Um länger-kettige gesättigte Fettsäuren in hydriertem Fischöl analysieren zu können, verwendeten *Drage und Lundanes* ^[143] ein nicht wäßriges, indirektes Kapillarelektrophorese-System. Die simultane Trennung von Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxiden gelang erstmals *Schmitz* ^[144] durch Verwendung von Mischmicellen in einem komplexen MEKC-Puffer.

1.9 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Selektivität bekannter analytischer Methoden der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE) reicht nicht aus, um Isomerengemische oxidierter Lipide (z.B. isomere Hydroperoxy- und / oder Hydroxyverbindungen von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterinestern) zu trennen. Da in den letzten Jahren jedoch im Arbeitskreis der Analytischen Chemie der BUGH-Wuppertal CE-Methoden zur Trennung und zum empfindlichen Nachweis von isomeren Fettsäurehydroperoxiden entwickelt werden konnten ^[144, 145], sollte nun ein geeignetes Verfahren zur enzymatischen oder chemischen Freisetzung von oxidierten und nicht oxidierten Fettsäuren aus Lipiden ausgearbeitet und am Beispiel komplexer Matrices erprobt werden. Darüber hinaus sollte durch Verbesserung der Selektivität des Trennsystems die simultane Bestimmung von Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren ermöglicht werden. Zur Steigerung der Empfindlichkeit der Detektion sollten sowohl ein UV-Diodenarray- als auch ein Fluoreszenz-Detektor in Verbindung mit einer neuen „post-column“-Derivatisierung zum Einsatz kommen ^[146]. Alternativ wurde die Verbesserung der Trennleistung literaturbekannter HPLC-Methoden durch Verwendung neuer Säulenmaterialien und durch die zur Packung der Säule eingesetzten, kleinen Korngrößen hoher Qualität angestrebt. Insbesondere sollte überprüft werden, ob unter den Bedingungen der RP-HPLC die Trennung isomerer Fettsäurehydroperoxide (Lipidhydroperoxide) möglich ist, mit dem Ziel, enzymatische Nachsäulenderivatisierungsreaktionen zur Verbesserung des Nachweisvermögens einzusetzen.

2 Experimenteller Teil

2.1 Synthese der Standardsubstanzen

Die Synthese der als Referenzsubstanzen eingesetzten Lipidhydroperoxide erfolgte durch die Oxidation mit Singulett-Sauerstoff. Ungefähr 300 mg der jeweiligen ungesättigten Lipide wurden in 370 ml Methanol gelöst, mit 10 mg Metylenblau als Photosensibilisator versetzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die auf ca. $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Reaktionsmischungen wurden unter ständigem Durchleiten von Sauerstoff mit einer 100 W-Halogenlampe ($\lambda_{\text{max}} = 500\text{ nm}$) bis zur maximalen Produktkonzentration bestrahlt. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die für die Synthesen verwendete Bestrahlungsapparatur.

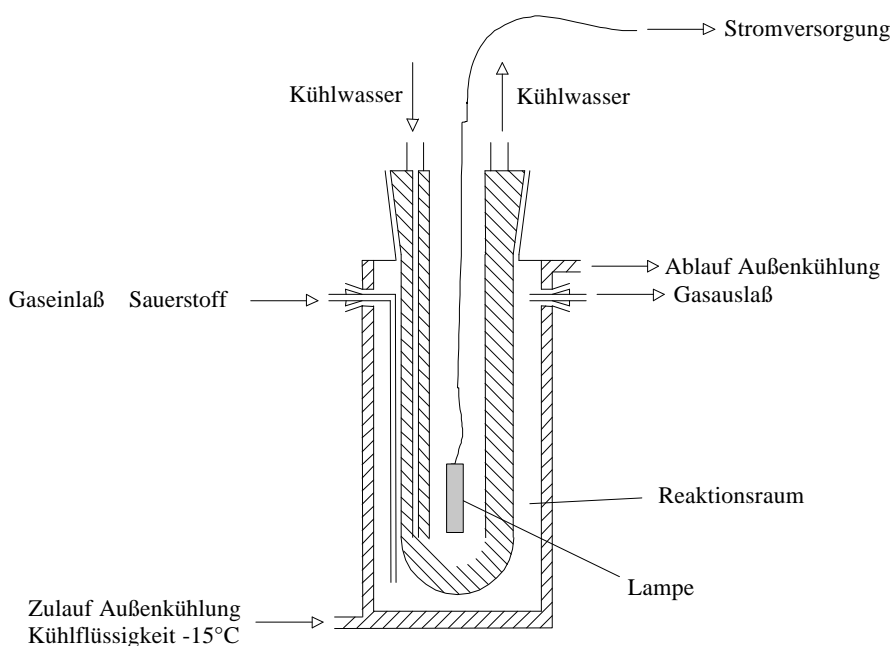


Abbildung 2.1: Bestrahlungsapparatur

Die notwendige Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) mit KI/Essigsäure als Sprühreagenz bzw. durch Entwicklung der DC-Platte in einer Jodkammer. Während das KI/Essigsäure-Gemisch oxidierende Verbindungen selektiv detektiert, werden in der Jodkammer sowohl die eingesetzten Lipide als auch Lipidhydroperoxide sichtbar. Zusätzlich wurde der Reaktionsverlauf der Oxidation

von ungesättigten Fettsäuren mit den in dieser Arbeit entwickelten CE- und HPLC-Methoden verfolgt (siehe Kapitel 3). Um nach Beendigung der Reaktion die Fettsäurehydroperoxide von den Edukten abzutrennen, wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Hydroperoxidisomerenmische der Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure zur Vereinfachung mit HPOE, HPODE, HPOTE und HPETE abgekürzt. Handelt es sich bei den Hydroperoxiden um enantiomerenreine Verbindungen, so wird die Stellung der Hydroperoxidgruppe und die absolute Konfiguration vorangestellt.

2.1.1 Hydroperoxidstandards der ungesättigten Fettsäuren

Die Oxidation der ungesättigten Fettsäuren Öl- (OE), Linol-(ODE), Linolen- (OTE) und Arachidonsäure (ETE) erfolgte nach der im Kapitel 2.1 beschriebenen Methode. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit und anschließend mittels Säulenchromatographie bei ca. -5 °C gereinigt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Hexan/Diethylether/Eisessig 80:20:1 (v/v/v). Jedes 5. Reagenzglas des Fraktionssammlers wurde mittels DC (gleiches Laufmittel; Detektion Jodkammer bzw. KI-Lösung ^[122]) und CE auf Hydroperoxidfraktionen untersucht. In Tabelle 2.1 sind die Bestrahlungszeiten und die Ausbeuten der Hydroperoxide zusammengefaßt.

Hydroperoxide (Isomerenmische)	Bestrahlungsdauer [h]	Ausbeute der Hydroperoxide [mg]	Ausbeute [%]
HPOE	50	173.2	57
HPODE	24	146.9	49
HPOTE	24	108.5	36
HPETE	22	118.0	51

Tabelle 2.1: Bestrahlungsdauer und Ausbeuten der Fettsäurehydroperoxide

2.1.2 13S-Hydroperoxide der Linol- und Linolensäure

Zur Synthese der isomerenreinen 13S-Hydroperoxide von Linol- und Linolensäure (13S-HPODE und 13S-HPOTE) wurde auf häufig verwendete Standardverfahren zurückgegriffen. Die Einführung der Hydroperoxygruppe erfolgte durch enzymkatalysierte Oxidation der Fettsäuren mittels Lipoxidase aus Sojabohnen^[131, 147]. Als Produkte wurden dabei die entsprechenden 13S-Hydroperoxyfettsäuren in jeweils mehr als 98 % Ausbeute erhalten. Nach Funk et al.^[148] wird die Produktselektivität durch Verwendung verschiedener Puffersysteme und Temperaturen erheblich beeinflusst. So können je nach Reaktionsbedingungen bis zu 50 % 9S-Hydroperoxide erhalten werden.

2.1.3 9S-Hydroperoxid der Linolensäure

Sieben frische, rote Tomaten wurden gereinigt, geschält und nach Entkernung mit tridestilliertem (tridest.) Wasser bei 0 °C gewaschen. 140 g des erhaltenen Fruchtfleischs wurden in 500 ml 0.1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5.5) suspendiert und mit 1 ml einer 160 mg Linolensäure enthaltenden verdünnten Ammoniaklösung versetzt. (Endkonzentration ca. 1 mM). Nach 25minütiger Homogenisierung (Stab-Mixer) und Inkubation mit Sauerstoff (alle 2 min; 15 s) bei 25 °C wurde die Suspension mit Chloroform extrahiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand durch Säulenchromatographie, wie von Matthew et al.^[149] beschrieben, gereinigt. Die Ausbeute eines Gemisches von 9S-HPOTE und 13S-HPOTE im Verhältnis 95:5 betrug 10 mg (6 %).

2.1.4 Hydroperoxide des Triolein

255 mg Triolein wurden in 300 ml eines Aceton/Methanol-Lösungsmittelgemisches im Verhältnis 70:30 (v/v) mit 30 mg Methylenblau versetzt. Nach 69 Stunden unter den in Kapitel 2.1 beschriebenen Bedingungen wurde das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Hexan/Essigester 80:20 (v/v) gereinigt. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch Dünnschichtchromatographie mit Hexan/Essigester 90:10 (v/v).

2.1.5 Hydroperoxide des Dioleylphosphatidylcholin

270 mg Dioleylphosphatidylcholin (DOPC) wurden in 370 ml Methanol gelöst, mit Methyleneblau versetzt und in der unter 2.1 beschriebenen Bestrahlungsapparatur 120 Stunden bestrahlt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol/25 %-ige Ammoniaklösung 15:30:2 (v/v/v) kontrolliert.

Der Reaktionsansatz wurde nach beendeter Bestrahlung eingeengt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel bei ca. -5 °C gereinigt. Als Laufmittel wurde erneut Chloroform/Methanol/25 %-ige Ammoniaklösung 15:30:2 (v/v/v) eingesetzt. Die Fraktionen wurden mittels DC untersucht. Es gelang zwar eine Trennung des DOPC von den Oxidationsprodukten, die Hydroperoxidfraktionen waren jedoch durch Methyleneblau leicht verunreinigt.

Die Trennung der Hydroperoxide des Dioleylphosphatidylcholin (HPDOPC) vom Methyleneblau erfolgte in einer miniaturisierten Säule (Pasteurpipette) an Kieselgel 60. Dazu wurde die Säule mit Diethylether, in welchem Methyleneblau nur sehr schlecht löslich ist, konditioniert. Nach Aufgabe der eingeengten HPDOPC-Fraktion wurde die Säule mit 5 ml Ether und anschließend mit Methanol gespült, bis die Elution der Hydroperoxide abgeschlossen war (DC-Kontrolle). Dieses Verfahren wurde bis zur vollständigen Abtrennung von Methyleneblau wiederholt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Ausbeute betrug 120 mg (41.1 %) HPDOPC.

2.1.6 Hydroxyfettsäure-Derivate

Eine ca. 1 mM methanolische Lösung der entsprechenden oxidierten Lipide wurde mit der 1.5-fachen Menge an Natriumborhydrid versetzt. Nach ca. 10minütiger Reaktion bei Raumtemperatur wurde die Lösung kurz im Ultraschallbad behandelt und aufgrund der quantitativen Umsetzung als Standardlösung der korrespondierenden Hydroxyfettsäure-Derivate verwendet. Zur Umsetzung eignen sich sowohl freie Fettsäuren und Fettsäuremethylester als auch Triglyceride, Phospholipide und Cholesterinester.

2.2 Charakterisierung der Standardsubstanzen

Nach Auflösen der Standardsubstanzen in CDCl_3 wurden diese mittels ^1H - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie untersucht. Zur Charakterisierung der jeweiligen Verbindungen wurden die NMR-Spektren in Bereiche eingeteilt, die den Strukturelementen entsprechen. Die zugehörigen Spektren befinden sich im Kapitel 5.7 (im Anhang).

2.2.1 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie

Durch Betrachtung der olefinischen Kohlenstoffatome im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR konnte eine Aussage über die Anzahl der mit Singulett-Sauerstoff gebildeten Isomere getroffen werden. Pro Doppelbindung und Isomer werden zwei Signale erwartet. Hieraus ergeben sich vier Signale für HPOE, 16 Signale für HPODE, 32 Signale für HPOTE und 64 Signale für HPETE. Eine Zuordnung der Signale konnte trotz Aufnahme von DEPT 135-Spektren und Literaturvergleich^[150, 151] nur zum Teil erfolgen, da bei der Oxidation der Fettsäuren komplexe Mischungen der isomeren Fettsäurehydroperoxide gebildet wurden, was zu Signalüberlagerungen führte.

Neben den Signalen für die Doppelbindungen lassen sich folgende Signalgruppen unterscheiden: CH_3 , CH_2 , CH , CH-OOH und COOH . Die Resonanzen der Kohlenstoffatome, die eine OOH -Gruppe tragen, traten erwartungsgemäß bei 85 – 88 ppm auf und konnten als zusätzliche Information über die Anzahl der entstandenen Isomere genutzt werden. Die weiteren im Molekül enthaltenen Kohlenstoffatome zeigten nach der Photooxygenierung keine signifikanten Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen.

2.2.2 ^1H -NMR-Spektroskopie

Charakteristisch für die Bildung der Fettsäurehydroperoxide sind die Signale der CH-OOH -Gruppe bei 4.2 ppm bis 4.4 ppm und die olefinischen Protonen bei 5.2 bis 6.7 ppm. Die in Abschnitt 5.7.2 angegebenen Integrale der ^1H -NMR-Resonanzen wurden auf die Protonen der CH_3 -Gruppe normiert. Die Normierung weicht für sehr breite oder überlagerte Signale von den erwarteten Werten ab. Dies ist einerseits

durch Austauschphänomene an den Hydroperoxid- und Säuregruppen, andererseits durch leichte Verunreinigung der Probe mit Methanol und Essigsäure zu erklären.

2.2.3 Hydroperoxide des Diolelylphosphatidylcholin

In den Tabellen 5.9 und 5.10 ist die Zuordnung der Signale der ^1H -NMR- und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren von HPDOPC aufgeführt.

Zusätzlich erfolgte die Charakterisierung des HPDOPC-Standards durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie. Während das nichtoxidierte DOPC nur ein Signal bei 0.33 ppm aufweist, erkennt man im ^{31}P -NMR-Spektrum von HPDOPC zwei Signale bei 1.10 ppm und 0.02 ppm. Das Signal bei 0.02 ppm wird dem HPDOPC zugeordnet. Das Signal geringerer Intensität bei 1.10 ppm ist vermutlich auf Phosphatidsäure zurückzuführen, die durch Hydrolyse des HPDOPC gebildet wurde. Eine genaue Zuordnung dieses Signals war aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich.

2.3 Oxidation von Pflanzenölen

Zur Autoxidation der Triglyceride wurden 100 ml Öl in einer Petrischale (Durchmesser: 9 cm) 240 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank gelagert. 25 mg der oxidierten Ölprobe wurden in 25 ml Chloroform gelöst und 500 µl (1 mg Öl) dieser Lösung zur Analyse mit der in Abschnitt 2.6 beschriebenen Methode enzymatisch hydrolysiert.

2.4 Prüfung der thermischen Stabilität von Pflanzenölen

Zur Überprüfung der thermischen Stabilität von Pflanzenölen unterschiedlichster Herkunft wurden 5 ml des Öls in einem Reagenzglas maximal 240 Stunden bzw. bis zur einsetzenden Verharzung bei 220 °C im Dunkeln gehalten. 35-80 mg der thermisch belasteten Probe wurden in 50 ml Chloroform gelöst und 1 ml (ca. 1-2 mg Öl) dieser Lösung wurde zur Analyse mit der in Abschnitt 2.6 beschriebenen Methode enzymatisch hydrolysiert.

2.5 Extraktionsmethoden zur Isolierung der Lipidfraktion aus Vollblut

Nach Abnahme von 20 ml Blut und Verteilung auf mehrere Probenahmegefäße (z.B. Monovette 7.5 ml der Firma Sarstedt, mit Kalium-EDTA oder Lithium-Heparin oder Gerinnungsaktivator) sowie Zentrifugation (Laborstandardmethode; siehe auch Herstellerempfehlung) wurde das erhaltene Plasma / Serum sofort vom Blutkuchen getrennt. Zur weiteren Lipid-Extraktion wurden die Methoden unter 2.5.1 und 2.5.2 verwendet.

2.5.1 Standardmethode

Die aus 10 ml Vollblut gewonnenen ca. 2.4 g Serum wurden in 30 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) eingegossen und noch zweimal mit 10 ml Lösungsmittel gleicher Zusammensetzung extrahiert. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, und der Rückstand wurde erneut in 10 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen. Nach Filtration wurde die Lösung im Eisfach bei -18 °C gelagert.

2.5.2 Mikromethode

500 µl des Serums wurden mit 100 µl Wasser bzw. der wäßrigen Lösung eines Enzyminhibitors gemischt und anschließend mit 500 µl Methanol (kann internen Standard enthalten) versetzt. Nach Zugabe von 3 ml Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v), kräftiger Durchmischung und dreiminütiger Zentrifugation bei 5000 U/min konnte die Oberphase abgenommen werden. Die Unterphase wurde noch einmal mit 3 ml Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) geschüttelt und zentrifugiert. Nach Vereinigung der Oberphasen wurde das Lösungsmittel durch Stickstoffstrom entfernt. Die so gewonnene Lipidfraktion konnte nun alkalisch oder enzymatisch hydrolysiert werden.

2.5.3 Isolierung der Lipidfraktion aus Synovia

Die aus den Gelenken entnommene Synovia (5-10 ml) wurde zur Isolierung der Lipide nach der unter 2.5.1 beschriebenen Standardmethode aufgearbeitet.

2.6 Enzymatische Hydrolyse der Triglyceride

2.6.1 Standardmethode

Die Reaktionsmischung, bestehend aus 1 mg Triglycerid, 3 ml Puffer (400 mM Glycylglycin pH 7.5, 20 mM CaCl_2), 100 μl Esterase und 20 μl Lipase (Enzymsuspensionen der Firma Boehringer), wurde 30 min unter Schütteln bei 37 °C gehalten. Nach Zusatz von ca. 7 ml peroxidfreiem Diethylether wurde die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase noch zweimal mit jeweils 5 ml Diethylether extrahiert. Die über Natriumsulfat getrocknete Ether-Lösung wurde anschließend wegen der geringen Hydroperoxidkonzentration eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 μl Methanol aufgenommen und injiziert.

2.6.2 Mikromethode

Ca. 60 mg Öl wurden in 50 ml Chloroform gelöst. 1 ml (entspricht ca. 1 mg Öl) dieser Stammlösung wurde in ein Probengefäß überführt und im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit. 200 μl eines 400 mM Glycylglycinpuffers, der 20 mM CaCl_2 enthielt und durch Zugabe von Natronlauge auf pH 7.5 eingestellt war, wurden mit 0.5 mg des Enzyms LPL der Firma Amano bzw. mit 50 μl Esterase und 10 μl Lipase (Enzymsuspensionen der Firma Boehringer) versetzt und zum Ölrückstand gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Zur Bildung einer großen Phasengrenze wurde das Reaktionsgefäß während der Reaktion geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Chloroform abgebrochen und die organische von der wäßrigen Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde noch viermal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen.

2.7 Mikromethoden zur enzymatischen Hydrolyse der Phosphatidylcholine

2.7.1 DOPC und HPDOPC

Ca. 60 mg (75 μmol) Dioleylphosphatidylcholin (DOPC) bzw. Dioleylphosphatidylcholinhydroperoxid (HPDOPC) wurden in 10 ml Methanol gelöst. 50 μl (ca. 0.4 μmol) dieser Standardlösung und 50 μl (ca. 0.2 μmol) einer Linolensäure-Standardlösung (interner Standard) wurden in ein Probengefäß überführt und im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit. 200 μl eines 400 mM Glycylglycinpuffers, der 20 mM CaCl_2 enthielt und durch Zugabe von Natronlauge auf pH 7.5 eingestellt war, wurden mit 0.4 mg des Enzyms SP 525 der Firma Novo Nordisk versetzt und zum Phosphatidylcholin/Linolensäure-Rückstand gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Zur Bildung einer großen Phasengrenze wurde das Reaktionsgefäß während der Reaktion geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Chloroform abgebrochen und die organische von der wäßrigen Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde noch viermal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen.

2.7.2 Sojalecithin-Rohware

149.9 mg der Sojalecithin-Rohware wurden in 10 ml Methanol/Chloroform 1:2 (v/v) gelöst. 50 μl dieser Lösung wurden mit 50 μl einer Lösung aus 59.0 mg ω^6 -OE in 50 ml Methanol (interner Standard) versetzt und in ein Probengefäß überführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurden 0.4 mg des Enzyms SP 525 in 200 μl Glycylglycinpuffer zugegeben und das Reaktionsgemisch 90 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase fünfmal mit je 1 ml Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurden im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen.

2.7.3 Eilecithin-Rohware

99.5 mg der Eilecithin-Rohware wurden zur Herstellung einer Standardlösung in 10 ml Methanol/Chloroform 1:2 (v/v) gelöst. 50 µl dieser Lösung und 50 µl einer Lösung aus 59.0 mg ω^6 -OE in 50 ml Methanol (interner Standard) wurden in ein Probengefäß überführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wurde die Enzym-Pufferlösung, bestehend aus 0.4 mg des Enzyms SP 525 gelöst in 200 µl Glycylglycinpuffer, zugesetzt und das Reaktionsgemisch 90 min bei 37 °C geschüttelt. Die wäßrige Phase wurde fünfmal mit je 1 ml Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel der organischen Phase wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen.

2.7.4 Humanproben

Die aus Blut und Synovia durch Extraktion gewonnenen Lipide (Abschnitt 2.5) wurden entsprechend der Extraktionsmethode in ein Probengefäß überführt und wie im Kapitel 2.7.1 beschrieben unter Zusatz von ω^6 -OE als interner Standard enzymatisch hydrolysiert. Die durch Ultrazentrifugation ^[152, 153] aus Blutserum gewonnenen LDL-Fractionen wurden nach Zusatz des internen Standards ohne weitere Aufarbeitung enzymatisch umgesetzt.

2.8 Alkalische Hydrolyse der Phosphatidylcholine

2.8.1 DOPC und HPDOPC

Zur alkalischen Hydrolyse wurden ca. 13 mg der Phosphatidylcholine in 10 ml Methanol aufgenommen. Ein aliquoter Teil wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Methanol auf 500 µl aufgefüllt und mit weiteren 500 µl 1N Natronlauge versetzt. Nach 45-60 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zusatz von 50 µl 98-100 %iger Ameisensäure abgebrochen und die Probe mittels HPLC und nach weiterer Aufkonzentrierung mittels CE analysiert.

2.8.2 Humanproben

Der durch Mikroextraktion gewonnene Lipidrückstand (Kapitel 2.5.2) oder eine entsprechende äquivalente Menge eines anderen Extrakts wurde in 500 µl Methanol gelöst und wie in 2.8.1 beschrieben hydrolysiert. Nach 60 min Schütteln bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 98-100 %iger Ameisensäure abgebrochen und analysiert. Die durch Ultrazentrifugation ^[152, 153] aus Blutserum gewonnenen LDL-Fractionen konnten ohne Probenvorbereitung alkalisch verseift werden.

2.9 Immobilisierung von Mikroperoxidase an der fused-silica Kapillarwand

Zur Immobilisierung von Mikroperoxidase wurde die Kapillarwand zwei Stunden mit einer 5 %igen Salpetersäure bei 45 °C konditioniert und nachfolgend eine Stunde mit tridest. Wasser gespült. Anschließend wurde eine mit 6 M HCl auf pH 3.5 eingestellte wäßrige 10 %ige (v/v) 3-(Triethoxysilyl)-propylaminlösung acht Stunden bei 35 °C langsam durch die Kapillare gedrückt und die Kapillare erneut eine Stunde mit tridest. Wasser gewaschen. Zur Fixierung des Reagenzes und zur Trocknung der Kapillare wurde diese über Nacht (ohne vorherige Entfernung des Wassers) bei 115 °C im Trockenschrank aufbewahrt und nach dem Abkühlen mit Immobilisierungsreagenz acht Stunden bei Raumtemperatur gespült. Das Immobilisierungsreagenz bestand aus ca. 4 mg Mikroperoxidase (MP-11) und 35-40 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDAC) in 3 ml 10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES-Puffer), die mit 1 N NaOH auf pH 7.8 eingestellt war. Abschließend wurde die Kapillare noch eine Stunde mit Wasser gewaschen und unter tridest. Wasser bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.9.1 Verwendung kommerzieller Amin-Kapillarsäulen

Die bereits mit Amin-Gruppen belegte Kapillarwand wurde mit tridest. Wasser 5 min konditioniert und anschließend mit dem unter 2.9 beschriebenen Immobilisierungsreagenz acht Stunden bei Raumtemperatur gespült. Abschließend wurde die Kapillare noch eine Stunde mit Wasser gewaschen und unter tridest. Wasser bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.10 Totvolumenfreie Kopplung von fused-silica Kapillaren

Zur totvolumenfreien Kopplung von Kapillaren wurde die aus der Lichtleitertechnik bekannte Verbindungsart des Spleißens ^[154] verwendet. Dazu wurden die Kapillarenden möglichst planar abgeschnitten ^[155, 156] und ohne weitere Vorbereitung in das Spleißgerät (Felten und Guilleaume OSG-15) eingelegt. Nach Justierung der x- und y-Koordinaten, was zur optimalen Verbindung beider Kapillarenden notwendig ist, wurde die Polyimidschicht durch einen kurzen Lichtbogen entfernt. Nach Anlegen eines Inertgasflusses (z.B. N₂) mit einem Überdruck von ca. 800 mbar erfolgte der eigentliche Spleißvorgang durch einen weiteren, zeitlich längeren Lichtbogen. Der Inertgasstrom durch die Kapillare bewirkte neben der Stabilisierung des Kapillarinneendurchmessers eine Kühlung der äußeren Zonen des Schmelzbereiches. Durch die thermische Belastung wurde jedoch die äußere Polyimidschicht im Bereich des Lichtbogens zerstört, so daß nachfolgend die bruchempfindliche Stelle durch eine 9 mm lange Teflonhülse (PTFE) geschützt werden mußte. Um eine spätere Fixierung mit Cyanacrylat an der Kapillare zu gewährleisten, wurde die Teflonhülse zuvor mit Polyvinylchlorid (PVC) ummantelt. Abbildung 2.2 zeigt den vereinfachten Aufbau der beschriebenen ^[157] und zum Patent angemeldeten Verbindung ^[158].

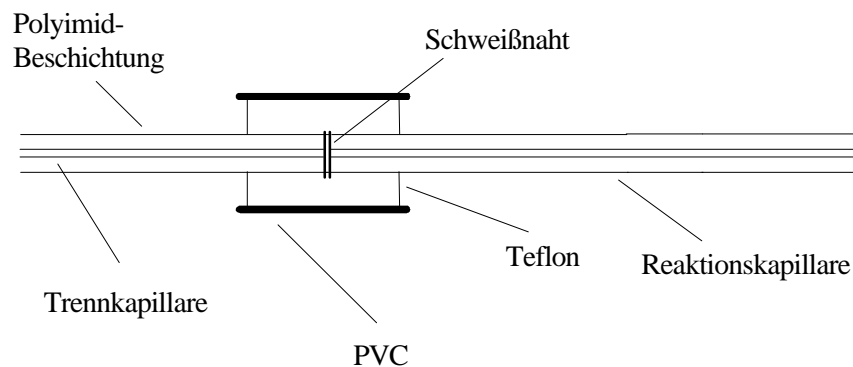


Abbildung 2.2: Skizze des Verbindungsstücks mit Trenn- und Reaktionskapillare

2.11 Herstellung von Bubble-Cells

Nach Verschließen eines Kapillarendes im Lichtbogen wurde ein Inertgasüberdruck von ca. 800 mbar in der Kapillare aufgebaut. Die Polyimidbeschichtung wurde am späteren Detektorfenster durch einen kurzen Lichtbogen entfernt. Durch einen langen, präzise an der Quarzglasoberfläche entlang laufenden Lichtbogen wurde nun die Kapillare an der unbeschichteten Stelle zum leichten Schmelzen gebracht und weitete sich unter Ausbildung einer kleinen Blase. Durch Stärke und Art des Lichtbogens konnten Form und Größe der Blase variiert werden ^[159].

3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden MEKC- und HPLC-Methoden zur Bestimmung von Fettsäuren und den davon abgeleiteten Hydroxy- und Hydroperoxyfettsäuren beschrieben. Routinemäßig erfolgt die Quantifizierung dieser Verbindungen durch den Einsatz von UV/VIS- und UV/VIS-Diodenarraydetektoren. Zur Erhöhung von Empfindlichkeit und Selektivität werden Nachsäulenderivatisierungsreaktionen in Verbindung mit der Fluoreszenz- bzw. Chemilumineszenzdetektion angewandt. Die erarbeiteten Methoden werden schließlich zur Untersuchung von oxidierten Fettsäuren, die durch enzymatische und chemische Hydrolyse aus biologischem Probenmaterial freigesetzt wurden, erprobt.

3.1 MEKC-Methoden für Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren

Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Optimierung der MEKC-Trennung von Fettsäuren und isomeren Hydroxy- und Hydroperoxyfettsäuren sowohl unter „reversed-flow“- als auch unter „normal-flow“-Bedingungen. Bei der 1984 von *Terabe et al.* ^[160, 161] eingeführten micellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) erfolgt die Trennung der Analyten durch ein Verteilungsgleichgewicht zwischen micellarer und mobiler Phase bei einem sehr großen EOF, der für den Transport zum Detektor verantwortlich ist. Seit einigen Jahren ist es das Ziel vieler Arbeitsgruppen, eine Erhöhung der Selektivität des Trennsystems durch Vergrößerung des micellaren Fensters zu erreichen. Einen Überblick hierzu geben *Muijselaar et al.* ^[162]. Eine Möglichkeit, das micellare Fenster zu vergrößern, besteht in der Reduzierung des EOF, so daß negativ geladene Micellen eine größere vektorielle Geschwindigkeit als der Gesamtfluß aufweisen und zur Anode wandern. *Otsuka und Terabe* führen dazu die Trennung bei niedrigen pH-Werten durch ^[163]. Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch dynamische oder permanente Belegung der Kapillaroberfläche mit Tensiden oder Polymeren. *Janini et al.* verwendeten 1996 erstmals den Begriff „reversed-flow“ MEKC (RF-MEKC) ^[164] für solche Trennbedingungen, bei denen die Analyten in der Reihenfolge der Normalphasenchromatographie getrennt werden. Der größte Vorteil der RF-MEKC

gegenüber der MEKC ist die umgekehrte Migrationsreihenfolge sowie das fast unendlich große micellare Fenster. Nachteile ergeben sich je nach Stärke der EOF-Unterdrückung durch relativ lange Migrationszeiten.

3.1.1 Reversed-flow MEKC

Ausgehend von dem in unserem Arbeitskreis entwickelten micellaren Trennsystem sollte eine weitere Optimierung der Trennleistung erfolgen ^[144]. Das zur simultanen Trennung der Fettsäuren und ihrer isomeren Hydroperoxide verwendete Elektrolytsystem besteht aus einer Lösung von 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 800 mg/l Polyoxyethylenlaurylether (Brij 35) und 35 mM Natriumdodecylsulfat (SDS).

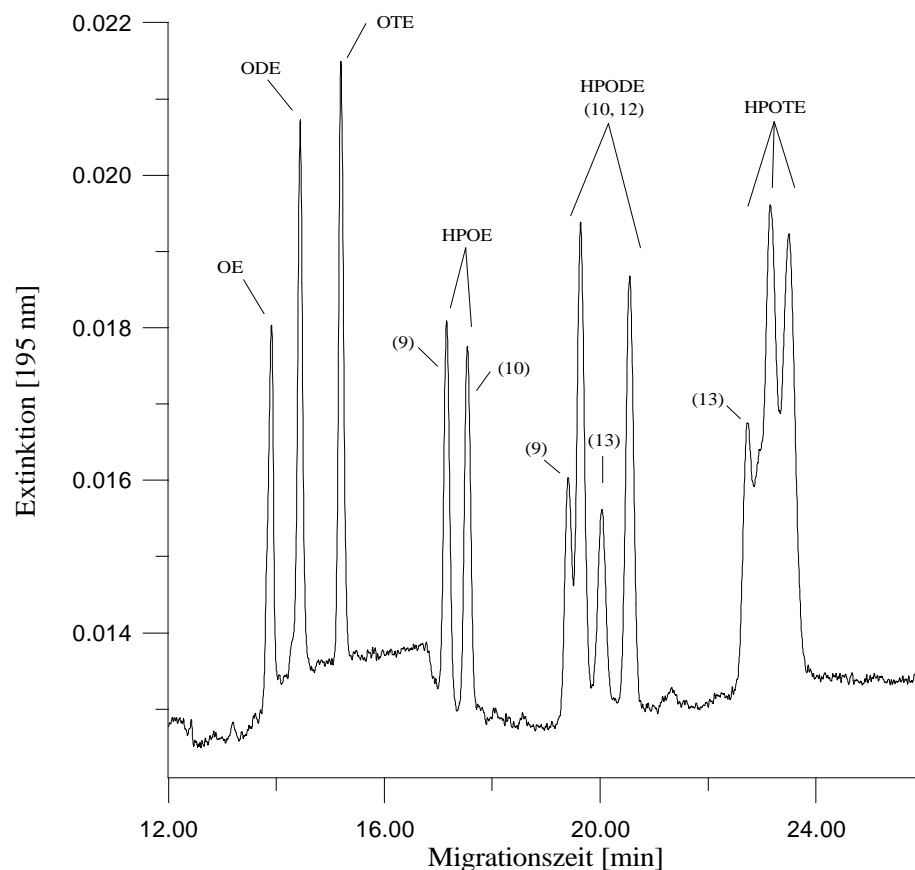


Abbildung 3.1: Trennung der Fettsäuren (OE, ODE, OTE) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide (HPOE, HPODE, HPOTE); fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm

Abbildung 3.1 zeigt, daß unter Verwendung des oben beschriebenen Elektrolyten eine gute Trennung der drei Fettsäuren Öl- (OE; 0.5 mM), Linol- (ODE; 0.3 mM) und Linolensäure (OTE; 0.25 mM) erreicht werden kann. Für die beiden isomeren Hydroperoxide der Ölsäure (HPOE; 1.1 mM) liegt eine Basislinientrennung vor. Während die Trennung der vier isomeren Hydroperoxide der Linolsäure (HPODE; 1.9 mM) noch ausreichend gut ist, werden für die sechs isomeren Hydroperoxide der Linolensäure (HPOTE; 1.4 mM) jedoch nur drei Peaks beobachtet.

Die verwendeten Tenside haben nicht nur die Funktion als Micellenbildner. Das eingesetzte Brij 35 beschichtet, wie bereits von *Iki* und *Yeung* ^[165] beschrieben, die Kapillarwand dynamisch und reduziert den elektroosmotischen Fluß. Natriumdodecylsulfat erhöht aufgrund seiner negativen Ladung die Migrationsgeschwindigkeit der micellaren Phase und beschleunigt somit den Transport der ebenfalls negativ geladenen Analyten.

Alle in diesem Kapitel durchgeführten Messungen fanden, wenn nicht gesondert erwähnt, in einer fused-silica Kapillare mit einer Länge von 40/47 cm und einem Innendurchmesser von 50 µm bei 25 °C statt. Bei der Kapillarlänge wird zwischen der Länge bis zum Detektor (L_{eff}) und der Gesamtlänge der Kapillare (L_{ges}) unterschieden, welche als Zahlenbruch angegeben werden. Die hydrodynamische Injektionszeit betrug fünf Sekunden und die Trennungsspannung 28 kV. Alle verwendeten Lösungen wurden durch einen 0.45 µm PTFE-Filter filtriert. Die Konzentrationsverhältnisse der Analyten im oben beschriebenen Standardgemisch wurden im Laufe der Arbeit nicht variiert.

3.1.1.1 Optimierung des Phosphatpuffersystems

Um die Trennung der isomeren Hydroperoxide zu verbessern, wurden sowohl die Brij 35- als auch die SDS-Konzentration verändert. Dabei kamen zwei Verfahren zur Anwendung, bei denen die Zusammensetzung und Gesamtkonzentration der Micellen variiert wurden.

Unter der Annahme, daß die Micellenzusammensetzung des ursprünglich verwendeten Elektrolyten optimal war, wurde das Verhältnis von Brij 35 zu SDS konstant gehalten und die Gesamtkonzentration der Micellen im Bereich von $\pm 5\%$ der Ausgangskonzentration verändert. Dies führte zu keiner wesentlichen Steigerung der Effizienz, es ergaben sich lediglich geringe Veränderungen der Migrationszeiten.

So konnte bei Erhöhung der Micellenkonzentration eine etwas schnellere Migration beobachtet werden, die aber mit einem geringen Verlust an Trennleistung verbunden war. Eine Reduzierung der Micellenkonzentration führte zu längeren Migrationszeiten, die zunächst eine sehr schwache Effizienzsteigerung bewirkte, bei weiterer Absenkung aber aufgrund reduzierter Wechselwirkung zwischen Analyt und Micelle zu einer schlechteren Trennleistung führte. Erst eine Änderung der relativen Konzentrationen von Brij 35 und SDS brachte den gewünschten Erfolg. So ergab eine Erhöhung der Brij 35- bei gleichbleibender SDS-Konzentration eine schnellere Migration, aber abnehmende Trennleistung. Eine Verringerung der Brij 35-Konzentration führte zu verlängerten Migrationszeiten, jedoch zu einer besseren Trennung. Das Optimum wurde bei 720 mg/ml erreicht ^[159]. Abbildung 3.2 zeigt

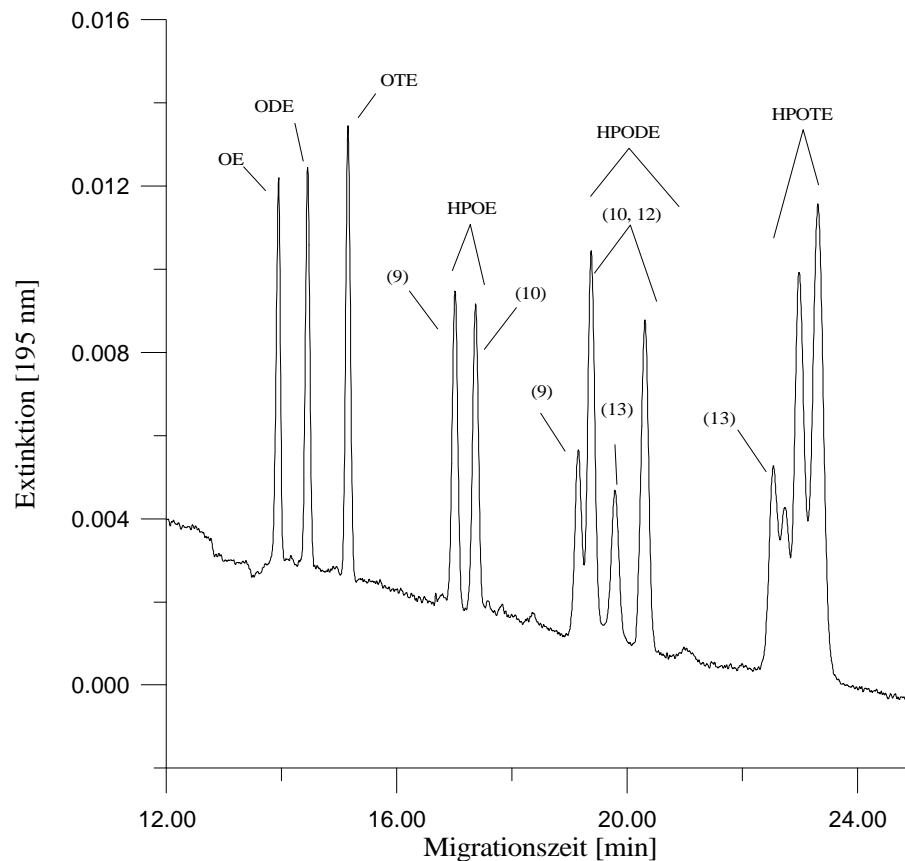


Abbildung 3.2: Trennung des Standardgemisches nach Optimierung der Brij 35-Konzentration; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 720 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm

das Elektropherogramm des oben beschriebenen Standardgemisches von OE (0.5 mM), ODE (0.3 mM), OTE (0.25 mM) und den isomeren Hydroperoxiden (HPOE,

1.1 mM; HPODE, 1.9 mM; HPOTE, 1.4 mM), das unter gleichen Geräteparametern wie Abbildung 3.1 detektiert wurde. Neben der guten Trennung der Fettsäuren und leicht verbesserten Trennung der HPOE- und HPODE-Isomeren konnte eine Steigerung der Trennleistung der isomeren Hydroperoxide der Linolensäure (HPOTE) beobachtet werden. Ohne Verlängerung der Analysenzeit konnten vier der sechs Isomeren getrennt werden. Danach erfolgte die Änderung der SDS-Konzentration bei konstantem Brij 35-Anteil. SDS ist aufgrund seiner Ladung maßgeblich für den Micellentransport verantwortlich und verändert infolgedessen entscheidend die Migrationszeiten. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration führte zu entsprechend schnellerer Migration, jedoch unter deutlichem Verlust der Trennleistung. Die Erniedrigung der SDS-Konzentration verbesserte zwar die

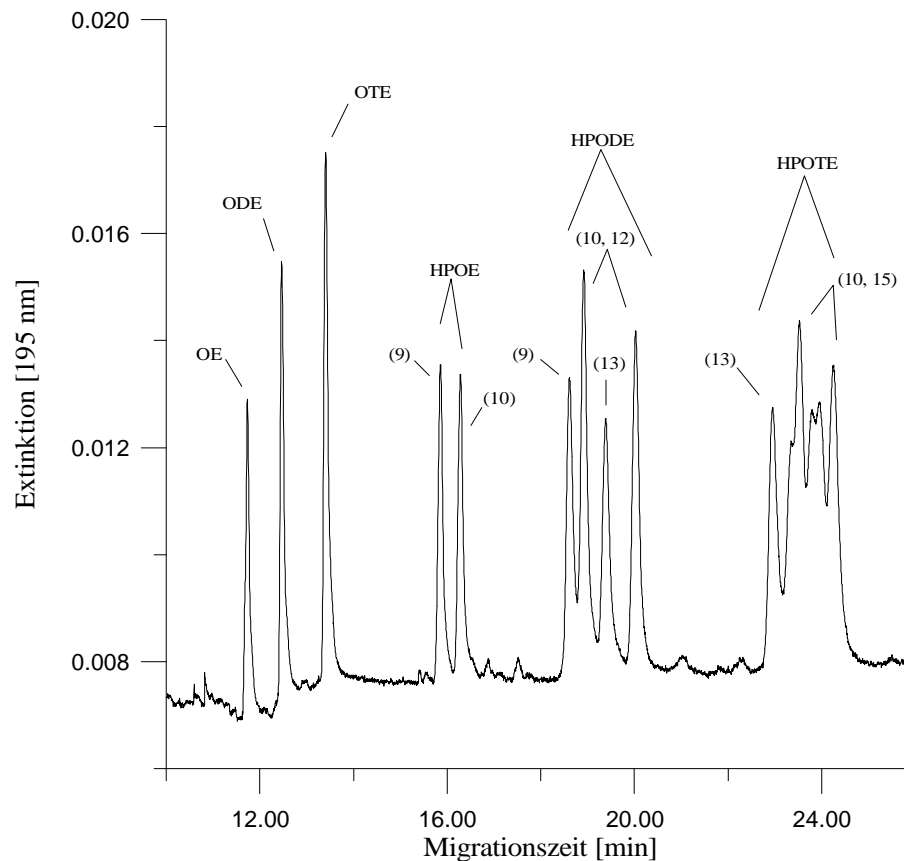


Abbildung 3.3: Trennung des Standardgemisches nach Optimierung der Trennungsspannung, der Trenntemperatur und des pH-Wertes; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm

Auflösung der HPOE- und HPODE-Isomeren, führte jedoch zu einer geringeren Auflösung der HPOTE-Isomeren und einer nicht akzeptablen Verlängerung der

Migrationszeit um 5 min (nicht gezeigt). Die beobachtete Selektivitätserhöhung für Komponenten mit kleineren k -Werten steht dabei im Einklang mit der Theorie ^[179]. Durch die geringere SDS-Konzentration wird das micellare Fenster vergrößert, was eine Steigerung der Selektivität, insbesondere für Analyten mit kleinen k -Werten, zur Folge hat.

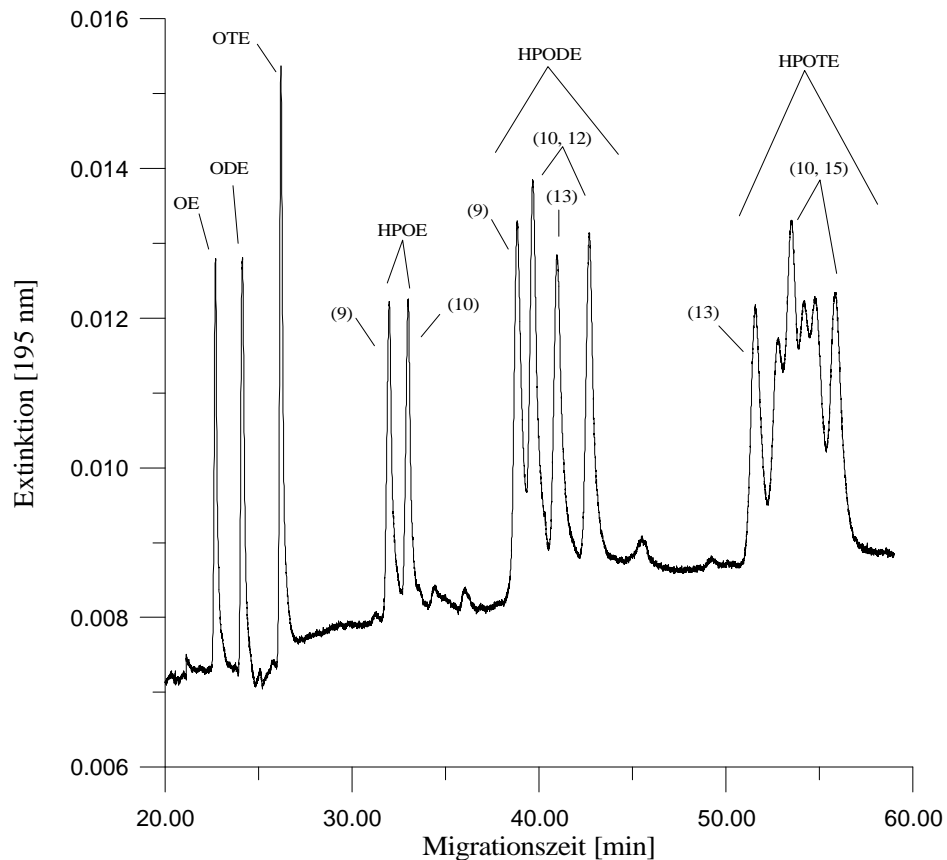


Abbildung 3.4: Trennung des Standardgemisches nach Verlängerung der Kapillare; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.0), 30 % (v/v) Ethanol, und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 50/57 cm; Detektion bei 195 nm

Ein vollständiger Austausch von Brij 35 gegen Brij 30, welches nur ca. ein Drittel der Molmasse besitzt, zeigte überraschenderweise keine Änderungen der Trennleistung. Dies führte zu der Annahme, daß die von Schmitz ^[144] postulierten Wechselwirkungen des Brij mit den Hydroperoxidgruppen der Fettsäuren von untergeordneter Bedeutung sind. Versuche, die ohne Brij 35 als Pufferzusatz durchgeführt wurden, ergaben bei gleicher Auflösung aufgrund des erhöhten EOF stark verlängerte Migrationszeiten (nicht gezeigt). Durch Reduzierung des pH-Wertes von 6.3 auf 6.0 im verwendeten Elektrolytssystem konnte die Trennung des

Standardgemisches mit gleicher Auflösung wie in Abbildung 3.2 in 24 min erreicht werden. Zur weiteren Optimierung der Trennleistung wurden Trennspannung und Temperatur auf 30 kV und 30 °C angehoben. Abbildung 3.3 zeigt das unter diesen Bedingungen erhaltene Elektropherogramm des oben beschriebenen Standardgemisches. Neben der weiterhin guten Trennung der Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxide (HPOE und HPODE) konnte die Trennung der isomeren Hydroperoxide der Linolensäure (HPOTE) erheblich verbessert werden. Ohne Verlängerung der Analysenzeit waren alle sechs Isomeren zu beobachten. Durch die Verlängerung der Kapillare auf 50/57 cm konnte zwar noch eine leichte Steigerung der Auflösung der HPOTE erreicht werden, allerdings verlängerte sich hierdurch die Analysenzeit auf fast 60 min (Abbildung 3.4).

3.1.1.2 Verwendung organischer Modifier

Zur Erhöhung der Trenneffizienz sollte der Einsatz zusätzlicher organischer Modifier im Elektrolyten untersucht werden. Dazu wurde ein Elektrolyt mit folgender Zusammensetzung verwendet: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, 750 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS. In umfangreichen Versuchsreihen wurden dem Elektrolyten unterschiedliche Konzentrationen an 1-Propanol, Aceton, Diethylether, Methanol, tert. Butanol und Tetrahydrofuran zugesetzt.

Durch die Verwendung von Aceton als Modifier konnte, wie ein Vergleich der Abbildung 3.1 und 3.5 zeigt, bei geringer Verlängerung der Migrationszeiten eine deutliche Verbesserung der Trennleistung erzielt werden^[159]. Das in Abbildung 3.5 gezeigte Elektropherogramm wurde mit einem Zusatz von 1 % (v/v) Aceton (bezogen auf den Grundelektrolyten) erhalten. Der Zusatz von 1 % (v/v) Diethylether wirkte sich zwar in gleicher Weise aus, führte jedoch zu einer Erhöhung der Migrationszeiten um mehr als 15 min. Die größeren Migrationszeiten bei Diethylether im Gegensatz zu Aceton lassen auf eine Verminderung des dynamischen Coatings schließen, welches zu einer Erhöhung des EOF führt. Die erhöhte Trennleistung weist auf eine veränderte Verteilung des Analyten zwischen Micelle und Puffer hin. Eine Ursache dafür könnte in der Änderung des Phasenverhältnisses β gesehen werden, welches das Volumenverhältnis von micellarer und wässriger Phase beschreibt. Neben der verbesserten Trennleistung

konnte aber auch ein etwas stärkerer Response festgestellt werden, der sich mit der Verminderung der Wandeffekte der Analyten erklären läßt. Eine veränderte Feldhomogenität hingegen ist auszuschließen, da bei einem geringfügig vergrößerten Lösungsmittelanteil dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ein kompletter Austausch des Ethanol gegen andere organische Lösungsmittel führt, wie in früheren Arbeiten ^[144] gezeigt wurde, zu keiner Verbesserung der Trennung.

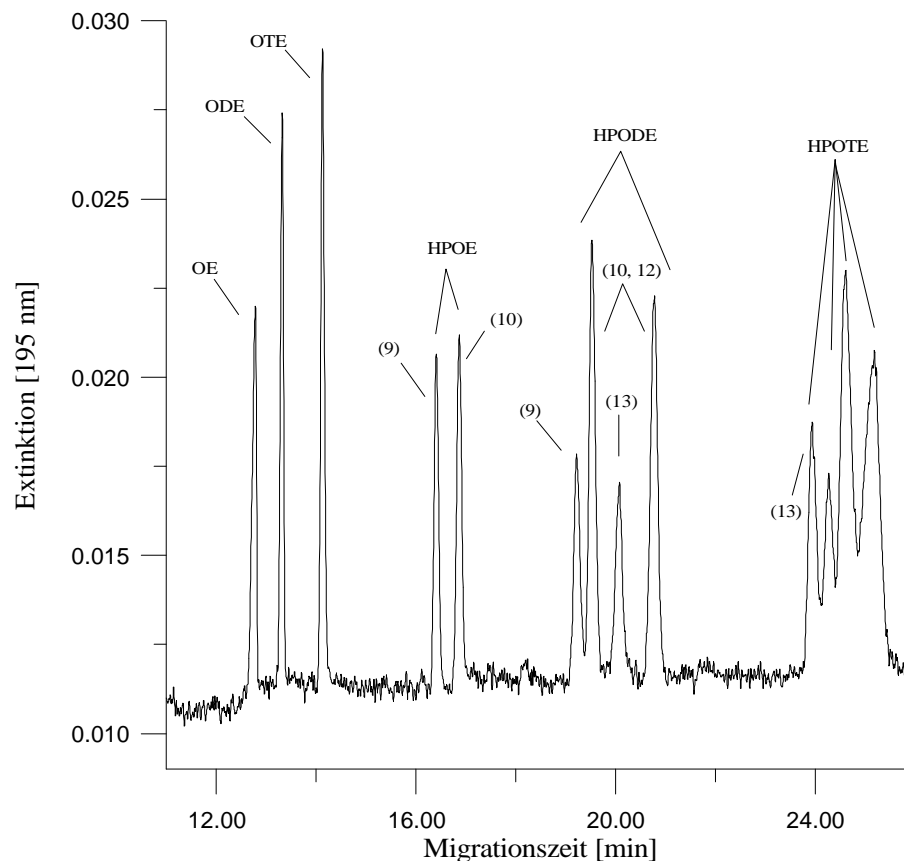


Abbildung 3.5: Optimierung der Trennung des Standardgemisches durch Zusatz von 1 % Aceton; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 750 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm

Die Verwendung von zusätzlichen organischen Modifiern in Puffersystemen ohne Brij-Anteil verbesserte die Auflösung nicht. Es konnte lediglich eine Verlängerung der Migrationszeiten um ca. 20 % festgestellt werden. Auffallend sind die mit tert. Butanol als Modifier stark erhöhten Migrationszeiten und die ausgeprägte Bandenverbreiterung. Diese Befunde lassen sich mit erhöhten Wandeffekten und schwächerer Wechselwirkung der Analyten mit der Micelle erklären. Alle anderen untersuchten Lösungsmittel ergaben keine Verbesserung der Trennleistung.

Im Gegensatz zu der üblichen Arbeitsweise in der micellaren elektrokinetischen Chromatographie, bei welcher der elektroosmotische Fluß die elektrophoretische Wanderung der Micelle überkompensiert ($v_{eof} > v_{ep(MC)}$), ist die resultierende Micellengeschwindigkeit in dem hier vorgestellten Trennsystem größer als der elektroosmotische Fluß ($v_{ep(MC)} > v_{eof}$). Micellen und Analyten wandern gegen den elektroosmotischen Fluß zur Anode. So führt in dem hier verwendeten Trennsystem eine stärkere Wechselwirkung der Analyten mit den Micellen oder ein schnellerer Transport der Micellen durch erhöhte Ladung zu kürzeren Analysenzeiten.

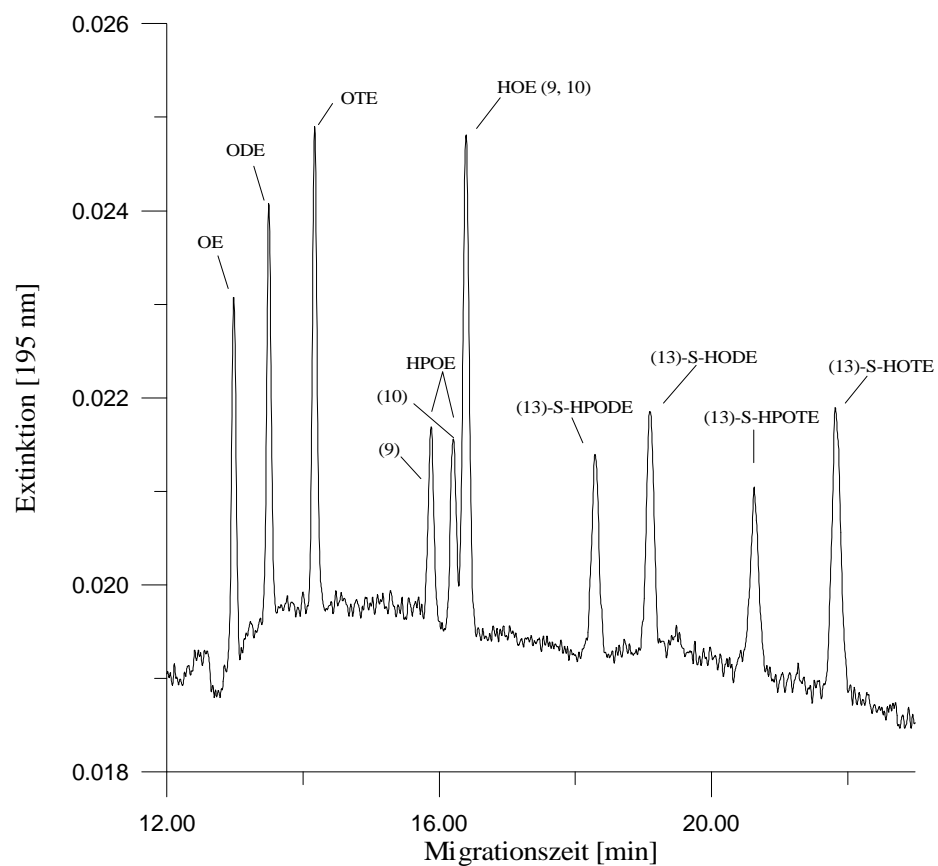


Abbildung 3.6: Trennung der Fettsäuren (OE, ODE, OTE), der 13 S-Hydroperoxide der Linol- und Linolensäure und deren korrespondierenden 13 S-Hydroxyfettsäuren; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 800 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS, 1 % Aceton; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm

Neben der biologischen Relevanz der Hydroperoxide wird in der Literatur immer mehr die Bedeutung der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren (HFS) diskutiert (vgl. Abschnitt 1.5.2). Zur gezielten Analytik der Produkte der Lipidperoxidation wäre deshalb ein Trennsystem wünschenswert, welches sowohl die isomeren

Hydroperoxide als auch die daraus resultierenden Hydroxyfettsäuren zu separieren vermag. Versuche mit den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Methoden zeigten jedoch nur eine bedingte Tauglichkeit der erarbeiteten Trennsysteme.

Abbildung 3.6 läßt zwar eine zufriedenstellende Trennung der Fettsäuren und deren Oxidationsprodukte bei optimaler Pufferzusammensetzung erkennen, eine Trennung der isomeren Hydroxyfettsäuren gelingt aber aufgrund ungenügender Selektivität nicht. So werden die aus den Hydroperoxid-Stammlösungen durch Reduktion mittels Natriumborhydrid bzw. Triphenylphosphin gebildeten isomeren Hydroxyfettsäuren nur als Gruppe getrennt. Wird das Standardgemisch der Fettsäuren (OE, ODE, OTE), der isomeren Hydroperoxide (HPOE, HPODE, HPOTE) und der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren (HOE, HODE, HOTE) eingesetzt, kommt es zur Überlagerung verschiedener Hydroperoxidsignale mit Signalen der Hydroxyfettsäuren.

3.1.1.3 Verwendung oberflächenmodifizierter Kapillaren

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war eine deutliche Reduzierung der Analysenzeiten. Die effektivste Möglichkeit besteht dabei in der chemischen Modifikation der Kapillaroberfläche. In der Literatur ^[166-169] sind Ansätze beschrieben, die eine Absenkung des ζ -Potentials bewirken und damit den elektroosmotischen Fluß effektiv unterdrücken. Versuche in unserem Arbeitskreis ^[144], die mit dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Elektrolytsystem durchgeführt wurden, haben Probleme hinsichtlich der Beständigkeit der Beschichtungen aufgezeigt. Lediglich bei Verwendung von silanisierten (C₁₈-Alkyl) Kapillaren ^[170] war ein erfolgreiches Arbeiten möglich. In einer Vorstudie kam zur Trennung von Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxiden erstmals eine von *Gilges et al.* ^[171] entwickelte Kapillare, die mit Polyvinylalkohol (PVA) permanent beschichtet war, zum Einsatz ^[159]. Nach Optimierung des Trennsystems wurde das in Abbildung 3.7 dargestellte Elektropherogramm erhalten. Bei gleicher Kapillarlänge und gleichem Kapillardurchmesser wie bei den zuvor verwendeten fused-silica Kapillaren bestand der Trennelektrolyt aus 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, 800 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS. Durch eine deutliche Absenkung des elektroosmotischen Flusses konnte die Migrationszeit um durchschnittlich 15 min gegenüber einer nicht beschichteten fused-silica Kapillare verkürzt werden (vgl. Abbildung 3.1). Der auftretende Verlust an Auflösung läßt sich mit der

abnehmenden Dauer der Wechselwirkung von Analyt und Micelle als Folge der schnelleren Bewegung der Micellen in Richtung Anode erklären. Dies entspricht einer Verkleinerung des micellaren Fensters. Hierdurch wird auch die Selektivität gegenüber den Hydroxyfettsäuren stark reduziert. Diese co-migrieren innerhalb der korrespondierenden Hydroperoxidsignale.

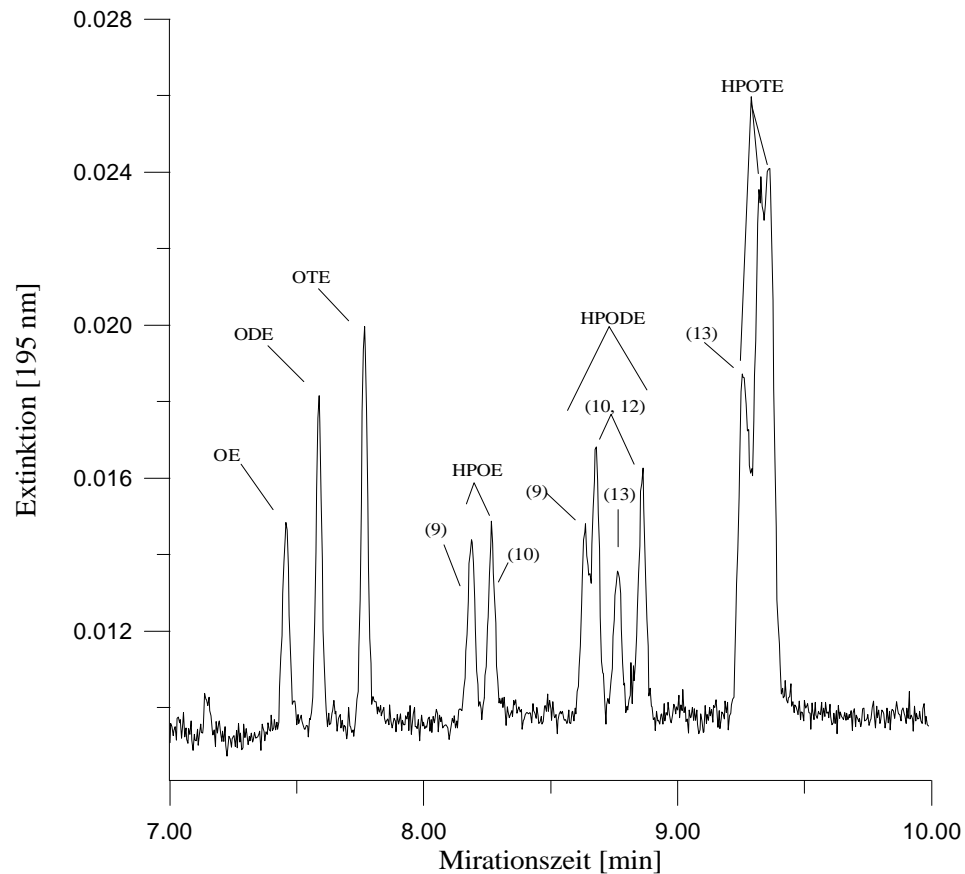


Abbildung 3.7: Trennung des Standardgemisches mittels PVA-belegter Kapillare 40/47 cm; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 800 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; Detektion bei 195 nm

Die Verwendung von zusätzlichen organischen Modifiern, wie im Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben, bewirkte auch hier eine Verbesserung der Trennleistung. Jedoch war bei mehreren Kapillaren nach unterschiedlicher Benutzungsdauer ein spontaner, nicht erklärbarer Verlust des permanenten Coatings zu beobachten. Aus Kostengründen wurden diese Untersuchungen nicht weiter geführt. Als Vorteile PVA-beschichteter Kapillaren sind ferner die Konstanz der Migrationszeiten über mehr als fünfhundert Analysen^[172] und die deutlich schnellere Kapillarkonditionierung zwischen den einzelnen Analysen zu nennen. Hierdurch reduziert sich die Gesamtanalysenzeit, die

sich aus der Migrationszeit des langsamsten Analyten und den Spülschritten zwischen den Analysenläufen zusammensetzt, nochmals drastisch. Der Kapillarkonditionierung kommt bei der reversed-flow MEKC eine besondere Bedeutung zu, so daß dieser Problematik ein separater Abschnitt (3.1.1.4) gewidmet wurde.

3.1.1.4 Konditionierung der Kapillaren

Um die in den vorherigen Abschnitten gezeigten elektrophoretischen Trennungen erzielen zu können, mußten die Kapillaren vor der ersten Verwendung und zwischen den Analysenläufen konditioniert werden, da ansonsten ein permanenter Anstieg der Migrationszeiten unter Verschlechterung der Trenneffizienz zu beobachten war. Dies hängt mit den bei fused-silica Kapillaren auftretenden Hystereseeffekten zusammen, welche wiederum entscheidend von den Spülschritten abhängen. Der hier verwendete Trennpuffer ist als besonders empfindlich einzustufen, da einerseits eine dynamische Belegung der Kapillarwand erfolgt, andererseits keine vollständige Dissoziation der Silanolgruppen vorliegt. Bereits leichte Änderungen an der Kapillaroberfläche wirken sich stark auf die Trennleistung aus. Durch die Konditionierung der Kapillaren konnten beide Parameter (Dissoziation und Coating) kontrolliert werden. Während im verwendeten Trennsystem Spülschritte mit basischen Lösungen eine stetige Verlängerung der Migrationszeiten bewirkten, führte die Verwendung von sauren Spüllösungen zu einer Verkürzung der Migrationszeiten. Die Ursache für die Reduzierung der Migrationszeiten läßt sich mit der Protonierung der negativ geladenen Kapillarwand (Bildung von Silanolgruppen) und einer kontinuierlichen Erhöhung der dynamischen Belegung erklären. Als praktikabel erwies sich vor jedem Analysenlauf die Kapillare 2 min mit tridest. Wasser, 1.5 min mit 0.1 N Salzsäure, 2 min mit tridest. Wasser und 3 min mit Elektrolyt zu spülen. Zur Konditionierung neuer Kapillaren wurden diese 5 min mit p.a. Aceton gereinigt und 5 min im Stickstoffstrom getrocknet. Nach jeweils fünfminütiger Konditionierung mit Wasser und Puffer konnten die Kapillaren verwendet werden. Das entwickelte Spülprogramm eignete sich sowohl für Trenn- als auch für Reaktionskapillaren, bei denen aufgrund des empfindlichen Immobilisates besonders auf die Spülbedingungen geachtet werden mußte.

Bei beschichteten Kapillaren, wie in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben, sind die Silanolgruppen weitgehend abgeschirmt, so daß praktisch kein Hystereseeffekt mehr

auftreten kann. So ließ sich bei der Verwendung einer PVA-beschichteten Kapillare die Konditionierung auf einminütiges Spülen mit Trennelektrolyt vor jedem Lauf reduzieren.

3.1.1.5 Einfache Bestimmung des elektroosmotischen Flusses

Die Trennung der Analyten im reversed-flow System wirft Fragen bezüglich der Stärke des auftretenden elektroosmotischen Flusses auf. Der zur Kathode (Inlet) gerichtete EOF konnte auf einfache Weise durch die Grundabsorption des Puffers bei 195 nm bestimmt werden. Dazu wurde mittels Diodenarray-Detektion die Abwesenheit von Aceton im Outlet-Puffer ausgenutzt. Nach Spülen der Kapillare mit acetonhaltigem Puffer wurde unter üblichen Trennbedingungen die Spannung angelegt und die Zeit bis zum Abfall der Basislinie gemessen. Aus der bekannten Wegstrecke vom Kapillarende bis zum Detektorfenster wurde dann die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses berechnet. Für eine 40/47 cm lange Kapillare konnte bei einer Feldstärke von 596 V/cm und üblicher Elektrolytzusammensetzung ein EOF von ca. 3 cm/min ermittelt werden. Bei einer Kapillarlänge von 50/57 cm und einer Feldstärke von 491 V/cm betrug der EOF ca. 1.7 cm/min.

3.1.2 Normal-flow MEKC

Die in Abschnitt 3.1.1 entwickelte Trennmethode führt aufgrund der Eigenmigration der Analyten gegen den reduzierten EOF und durch die nötigen komplexen Spülprogramme zu relativ langen Analysenzeiten. Ein weiterer Mangel liegt in der unbefriedigenden bzw. fehlenden Selektivität gegenüber Hydroxyfettsäuren, die ebenfalls bei der Lipidperoxidation in biologischen Systemen gebildet werden (vgl. Kapitel 1.5.2). Die zuweilen beobachtete Instabilität in der reversed-flow MEKC resultiert aus dem verwendeten Trennelektrolyten. Wie bereits in Abschnitt 3.1.1.4 ausgeführt, tragen dazu die nicht vollständige Dissoziation der Silanolgruppen und das dynamische Coating der Kapillarwand bei. Bereits leichte Änderungen an der Kapillaroberfläche bewirken einen veränderten EOF, welcher wiederum zu Schwankungen der Migrationszeiten führt. Um diese Effekte zu minimieren, eignen sich besonders Puffersysteme mit hohen pH-Werten, die eine fast vollständige Dissoziation der Silanolgruppen bewirken. Der hieraus resultierende EOF ist in vielen Fällen sehr hoch (über 10 cm/min), aber auch sehr stabil und trägt in der normal-flow MEKC maßgeblich zum Transport der Analyten zum kathodischen Detektorfenster bei. Bei kapillarelektrophoretischen Trennungen versucht man, die Löslichkeit schwer löslicher Analyte durch den Zusatz von organischen Modifiern zu erhöhen. Die zu analysierenden Fettsäuren und Fettsäurederivate liegen bei pH-Werten über 9 in der Regel vollständig dissoziiert vor. Daher sollte sich der Einsatz von organischen Modifiern gegenüber dem reversed-flow System (30 % Ethanol) stark reduzieren lassen. Ein geringer organischer Lösungsmittelanteil erhöht wiederum den EOF und beschleunigt somit die Trennung. Diesen Forderungen können bekannte Puffersysteme wie Borax, Glycylglycin, Morpholin, Meglumin und TRIS gerecht werden. Trotz all dieser Vorüberlegungen ergibt sich immer noch eine Vielzahl von Parametern, die optimiert werden müssen. Neben der Pufferzusammensetzung und -konzentration sind als weitere wichtige Parameter die Kapillarlänge, der Kapillardurchmesser, die Trennungsspannung, die Trenntemperatur, der Zusatz von organischen Modifiern, die Injektionszeit und das Injektionsmedium zu nennen.

3.1.2.1 Verwendung eines Boraxpuffers

Zu Beginn der Optimierung des Boraxpuffersystems wurde eine Kapillarlänge von 40/47 cm mit einem Durchmesser von 50 μm gewählt, um die Analysenläufe möglichst kurz zu halten und akzeptable Nachweisgrenzen für die zunächst eingesetzten isomeren Hydroperoxide zu erzielen. Zwischen den einzelnen Analysenläufen wurde die Kapillare 1 min mit Puffer gespült. Die Konditionierung

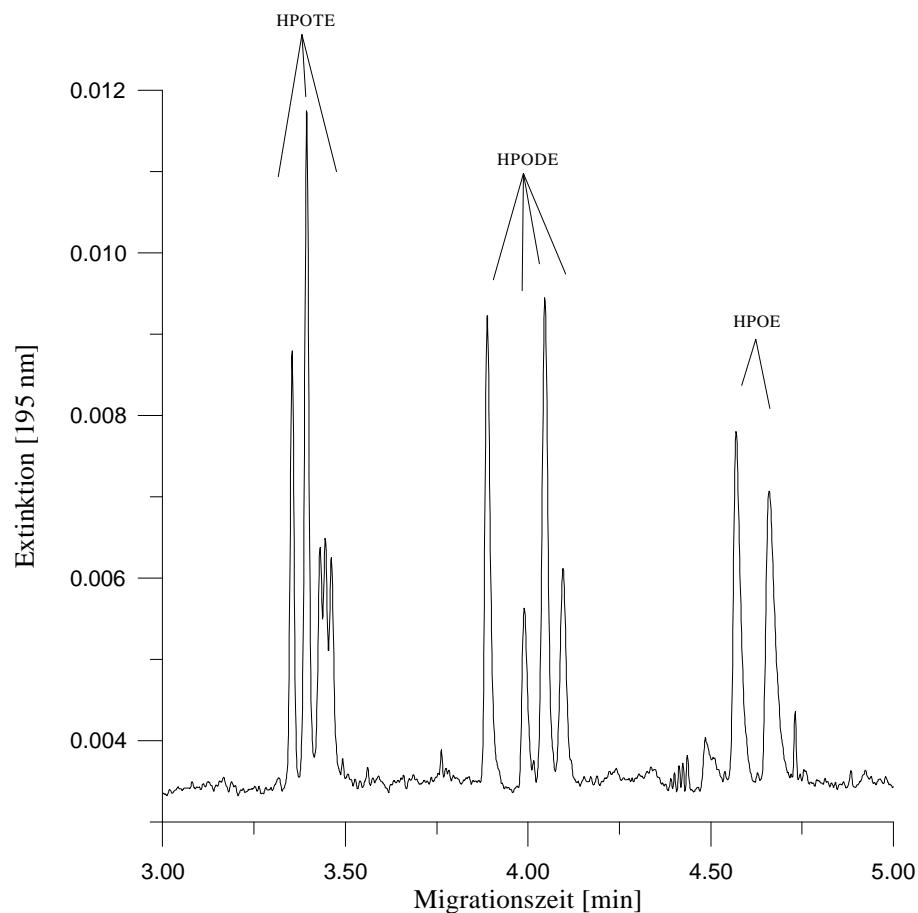


Abbildung 3.8: Trennung des Standardgemisches der Hydroperoxide; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2 % ACN; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Feldstärke 638 V/cm; Detektion bei 195 nm

neuer Kapillaren erfolgte durch 5- bzw. 10minütiges Spülen der Kapillare mit Wasser und Puffer. Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor durch einen 0.45 μm PTFE-Filter filtriert. Die Detektion der Hydroperoxide erfolgte bei 195 nm bzw. 234 nm. Zufriedenstellende Ergebnisse wurden mit einem 20 mM Boraxpuffer und einer SDS-Konzentration von 25 mM erhalten. Der pH-Wert des Systems betrug 9.3,

die Trennungsspannung 15 kV und die Trenntemperatur 30 °C. Nach Injektion des Standardgemisches (5 s) der isomeren Hydroperoxide (HPOE, 1.1 mM; HPODE, 1.9 mM; HPOTE, 1.4 mM in Methanol) zeigte das Elektropherogramm neben einer vollständigen Auftrennung der verschiedenen Hydroperoxidgruppen bereits eine erste Antrennung der einzelnen Hydroperoxidisomeren. In weiteren Optimierungsschritten konnte durch Reduzierung der Borax- und SDS-Konzentration auf 10 mM bzw. 15 mM, Absenken der Trenntemperatur auf 20 °C und der Injektionszeit auf drei Sekunden, Erhöhung der Spannung auf 30 kV und Verwendung von 2 % ACN (v/v) eine gut reproduzierbare Trennung der Analyten in 5 min erzielt werden. Abbildung 3.8 zeigt die fast vollständige Trennung des Hydroperoxid-Standardgemisches. Fünf der sechs HPOTE-Isomeren liegen getrennt vor. Bei 30 °C und 2 % Aceton (v/v) verringerte sich die Analysenzeit auf 3.5 min, von den sechs möglichen HPOTE-Signalen wurden aber nur vier beobachtet. Die Verwendung von weiteren in der HPLC üblichen Lösungsmitteln ergab keine Verbesserung der Trennleistung.

Da es in Anwesenheit der Fettsäuren jedoch zur Überlagerung der Linolensäure (OTE) mit den Hydroperoxiden der Ölsäure (HPOE) kam, mußte die Auflösung des Trennsystems weiter verbessert werden. Bei gleichbleibender Pufferzusammensetzung war dies durch Verlängerung der Trennkapillare auf 60/67 cm möglich. Ein weiteres Verlängern der Kapillare brachte keine Verbesserung mehr, da die längeren Migrationszeiten eine stärkere Bandenverbreiterung zur Folge hatten. Danach wurden nochmals die ACN-Konzentration und der pH-Wert des Trennelektrolyten überprüft. Dabei ergab sich durch Variation des pH-Wertes im Bereich von zwei pH-Einheiten keine und durch Erhöhung des ACN-Anteils von 2.0 % auf 2.4 % (v/v) nur eine geringfügige Verbesserung der Auflösung. Abbildung 3.9 zeigt die mit dem oben beschriebenen Puffersystem erhaltene Trennung des Standardgemisches der freien Fettsäuren OE (0.5 mM), ODE (0.3 mM) und OTE (0.25 mM) und der aus den Fettsäuren abgeleiteten isomeren Hydroperoxide HPOE (1.1 mM), HPODE (1.9 mM) und HPOTE (1.4 mM). Dabei ist eine fast vollständige Trennung des Standardgemisches bei Bodenzahlen im Bereich von 10^6 pro Meter zu erkennen, lediglich für die sechs isomeren Hydroperoxide der Linolensäure konnte keine vollständige Auflösung erreicht werden.

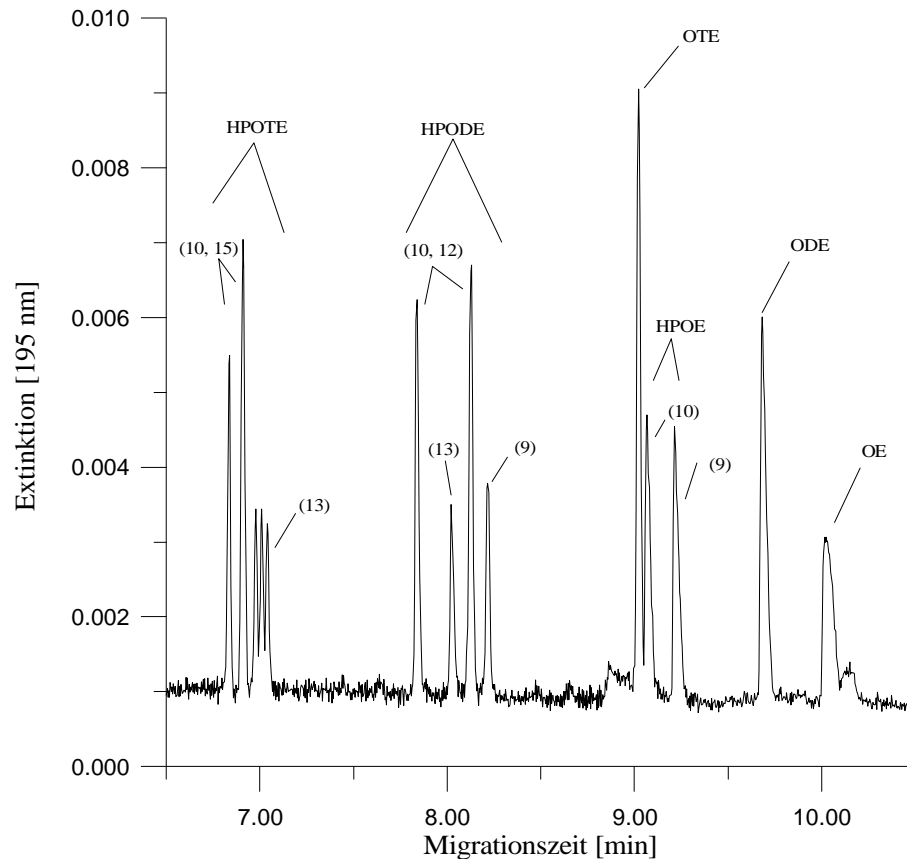


Abbildung 3.9: Trennung des Standardgemisches; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

3.1.2.2 Verwendung eines Megluminpuffers

Die komplexbildenden Eigenschaften von Puffersalzen können je nach Art der Substanzen starken Einfluß auf die zu trennenden Analyten nehmen. Deshalb sollte die nicht ganz befriedigende Auflösung des in Abschnitt 3.1.2.1 optimierten Boraxpuffersystems in Bezug auf die sechs HPOTE-Isomeren durch andere Puffersubstanzen verbessert werden. Dazu wurden in der CE bekannte, in ähnlichen Bereichen puffernde Substanzen ausgewählt, die auch eine spätere Verwendung in permanent beschichteten Kapillaren ermöglichen sollten. Die Abbildung 3.10 und 3.11 zeigen die Trennung des Standardgemisches unter Verwendung eines Megluminpuffersystems, nach Optimierung der Trennparameter. Erstmals gelang die Trennung aller wichtigen isomeren Fettsäurehydroperoxide und deren Fettsäuren ohne vorherige Derivatisierung in einem Analysenlauf. Der Elektrolyt bestand aus 10 mM Megluminpuffer (pH 9.0; eingestellt im fertigen Puffer mit 85 %iger

Phosphorsäure), 15 mM SDS als Micellenbildner und 2.4 % ACN (v/v). Die Kapillarlänge betrug 60/67 cm bei einem Innendurchmesser von 50 μm . Die einzelnen Isomeren wurden durch Aufstockversuche mit enzymatisch synthetisierten, isomerenreinen Hydroperoxiden und durch die selektive Absorption der konjugierten Fettsäurehydroperoxide bei 234 nm identifiziert.

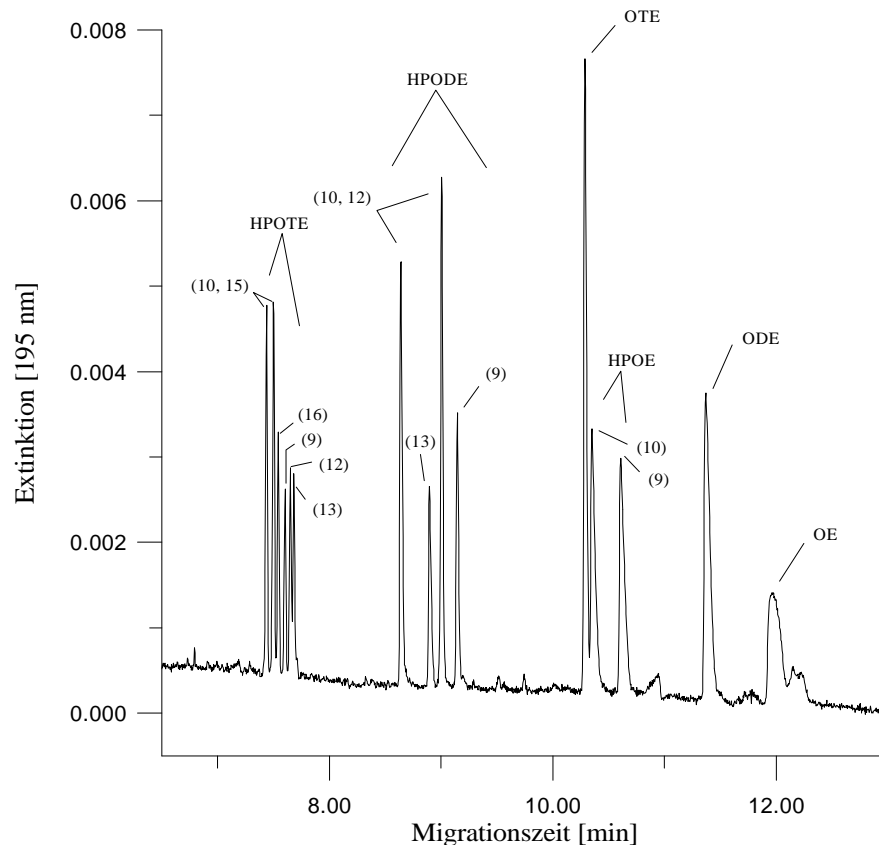


Abbildung 3.10: Trennung des Standardgemisches; Elektrolyt: 10 mM Megluminpuffer (pH 9.0), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

Nicht nur die Verwendung von Meglumin als Puffer zeigte eine gesteigerte Selektivität und Effizienz gegenüber den HPOTE-Isomeren. Auch 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (AMPD) ermöglichte eine vollständige Trennung dieser Verbindungen, ein Nachteil bestand jedoch in der Signalüberlagerung von OTE mit den HPOE-Isomeren. In Tabelle 3.1 sind wichtige Kennzahlen der Trennung mittels Borax- und Megluminpuffersystem gegenübergestellt. Zu erkennen sind die leicht reduzierten Bodenzahlen für die im hinteren Teil des micellaren Fensters migrierenden Analyten. Für Verbindungen, die vor der Linolensäure (OTE) migrieren, liegen in beiden Puffersystemen annähernd gleiche Bodenzahlen vor.

Der etwas geringere pH-Wert im Megluminpuffersystem bewirkt einen leicht reduzierten EOF (ca. 0.5 cm/min) und verlängert hierdurch die Analysenzeit von 10 auf 12 min. Desweiteren wird das micellare Fenster im Megluminpuffer etwas vergrößert, wodurch die Trennung von Verbindungen mit niedrigen Kapazitätsfaktoren stärker verbessert wird als von solchen mit hohen Kapazitätsfaktoren.

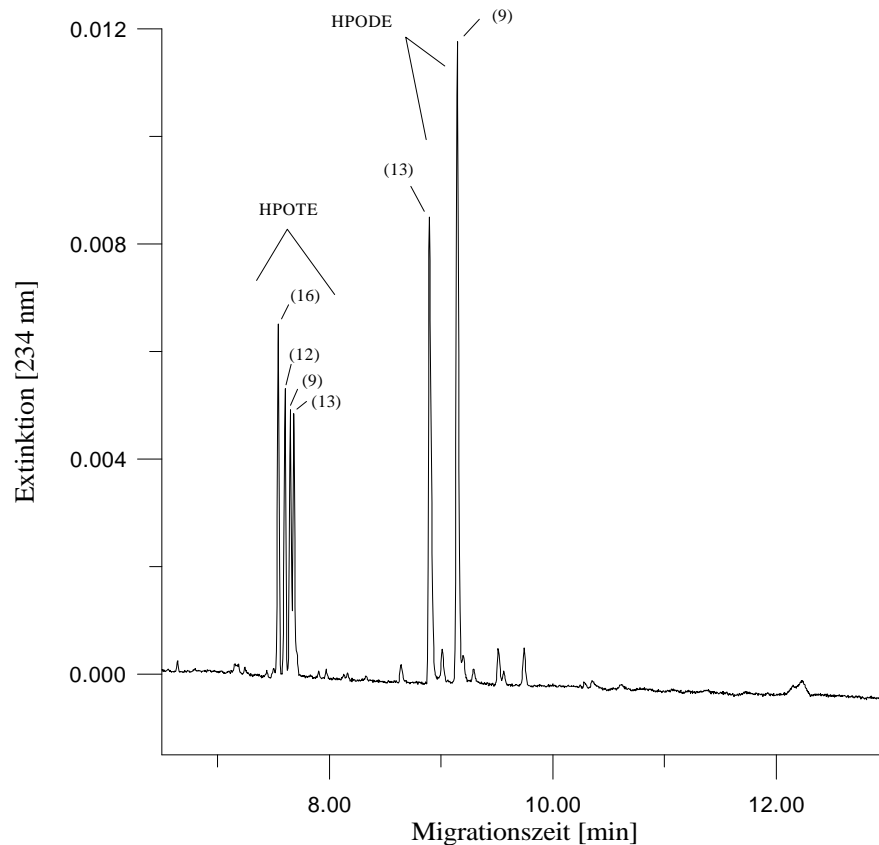


Abbildung 3.11: Trennung konjugierter Hydroperoxide der Linol- (HPODE; 1.9mM) und Linolensäure (HPOTE; 1.4 mM); Elektrolyt: 10 mM Megluminpuffer (pH 9.0), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 234 nm

Im Vergleich zum reversed-flow System liegen die Vorteile des normal-flow Systems in der niedrigen Micellenkonzentration, so daß neutrale Analyten kaum getrennt werden und mit t_{mc} den Detektor erreichen. Hierdurch wird auch die Messung in komplexen Matrices möglich. Ein weiterer Vorteil ist der hohe EOF von 14 cm/min, der eine schnelle Analyse erlaubt. Die Halbwertsbreiten der Signale im Bereich von 0.017-0.033 min und die daraus berechneten effektiven Bodenzahlen von etwa 10^6 Böden (vgl. Tabelle 3.1) liegen im oberen Bereich kapillarelektrophoretischer Trennungen.

Verbindung	Migrationszeit Boraxpuffer [min] ^{b)}	R _S	N [10 ⁵]	Migrationszeit Megluminpuffer [min] ^{c)}	R _S	N [10 ⁵]
OE (9Z)	10.0	3.9	1.3	12.0	4.1	0.6
ODE (9Z,12Z)	9.7	8.2	4.4	11.4	8.7	2.4
9-HPOE (10E)	9.2	3.6	5.0	10.6	3.4	2.7
10-HPOE (8E)	9.1	1.0	6.9	10.4	1.1	3.4
OTE (9Z,12Z,15Z)	9.0	19.6	8.1	10.3	26.6	7.9
9-HPODE (10E,12Z)	8.2	2.8	9.4	9.2	3.6	8.5
10-HPODE (8E,12Z) oder 12-HPODE (9Z,13E)	8.1	3.1	9.3	9.0	2.5	8.5
13-HPODE (9Z,11E)	8.0	5.9	7.8	8.9	5.9	5.9
10-HPODE (8E,12Z) oder 12-HPODE (9Z,13E)	7.8	27.5	9.9	8.6	26.9	7.5
13-HPOTE (9Z,11E,15Z)	7.1	1.2	8.9	7.7	1.1	9.6
12-HPOTE (9Z,13E,15Z)	7.0	1.1	9.3	7.7	1.5	9.8
9-HPOTE (10E,12Z,15Z)	7.0	2.2	9.1	7.6	2.0	9.6
16-HPOTE (9Z,12Z,14E) und 10-HPOTE (8E,12Z,15Z) oder 15-HPOTE (9Z,12Z,16E)	6.9	2.5	5.8	7.5 ^{a)}	2.0	8.6
10-HPOTE (8E,12Z,15Z) oder 15-HPOTE (9Z,12Z,16E)	6.8	–	10.4	7.4	–	9.2

a) 16-HPOTE und 10-HPOTE oder 15-HPOTE werden im Megluminpuffer getrennt (R_S=1.3);

b) vgl. Abb. 3.9; c) vgl. Abb. 3.10

Tabelle 3.1: Vergleich der Trennparameter zwischen Borax- und Megluminpuffer

3.1.2.3 Verwendung oberflächenmodifizierter Kapillaren

Da die Verwendung von oberflächenmodifizierten Kapillaren in der reversed-flow MEKC sehr erfolgreich war, sollte deren Tauglichkeit auch im normal-flow System überprüft werden. Hierzu sollten die entwickelten AMPD- und Megluminpuffersysteme eingesetzt werden, da Boratsalze an der Kapillaroberfläche Komplexe bilden können und somit einen EOF erzeugen. Die Kapillarlänge betrug während dieser Versuchsreihen 30/37 cm, um die Analysenzeiten durch den reduzierten EOF möglichst gering zu halten.

Leider führte die Verwendung von Kapillaren, die entweder mit Polyethylenglykol (PEG) oder mit Polyvinylalkohol (PVA) beschichtet waren, zu keinen besseren Ergebnissen. Die unter reversed-flow Bedingungen erfolgreich eingesetzte

PVA-Kapillare zeigte unter den stark veränderten Pufferbedingungen mit geringem Micellenanteil und hohem pH-Wert weder bei kathodischer, noch bei anodischer Detektion Signale. Auch der Einsatz von AMPD als Puffersubstanz ergab keine Verbesserung. Dieses Verhalten ist möglicherweise auf eine ungenügende Stabilität der Kapillaroberfläche gegenüber den verwendeten Puffersystemen oder auf Adsorptionseffekte der Analyten zurückzuführen.

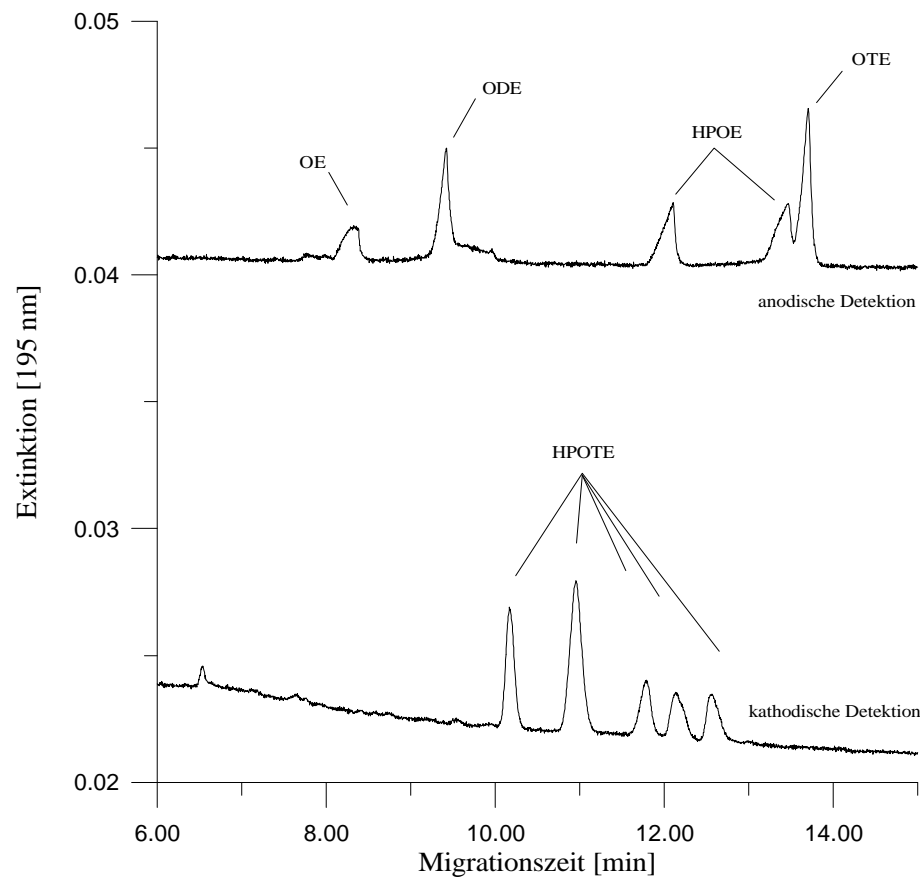


Abbildung 3.12: Trennung des Standardgemisches unter Verwendung einer PEG-Kapillare; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; anodische und kathodische Detektion bei 195nm

Die Verwendung von PEG-Kapillaren, bei denen auch der Boraxpuffer eingesetzt werden konnte, ergab nach Injektion des Standardgemisches für alle Puffersysteme bei kathodischer Detektion die Trennung von fünf der sechs HPOTE Isomeren in ca. 10-12 min. Bis zu einer Analysenzeit von 30 min konnten dann aber keine weiteren Verbindungen detektiert werden. Die anodische Detektion des Standardgemisches hingegen zeigte die Trennung der Fettsäuren und der isomeren HPOE innerhalb von 10 min. Diese Beobachtung läßt sich mit der Eigenmigration der Analyten und dem

noch leicht vorhandenen EOF erklären. Bei kathodischer Detektion erreichen die HPOTE-Isomeren den Detektor durch den überlagerten größeren EOF. Die restlichen Analyten migrieren schneller (HPOE) oder gleich schnell (HPODE) wie der EOF und erreichen somit den Detektor nicht. Bei anodischer Detektion ist die Eigenmigration der HPOE groß genug, um gegen den EOF das Detektionsfenster zu erreichen, die isomeren HPODE hingegen werden auch unter diesen Bedingungen nicht zum Detektor transportiert.

3.1.3 Ausgewählte normal-flow MEKC-Trennungen

3.1.3.1 Hydroperoxide und Hydroxyfettsäuren der Öl-, Linol- und Linolensäure

Die in Abschnitt 3.1.1.2 beschriebene reversed-flow Trennung der isomeren Fettsäurehydroperoxide und der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren (HFS) war aufgrund der unzureichenden Selektivität nicht zufriedenstellend. Da zu einer gezielten LPO-Analytik (vgl. Abschnitt 1.5.2) ein leistungsstärkeres Trennsystem wünschenswert wäre, sollte die Selektivität der entwickelten normal-flow Puffersysteme gegenüber den Hydroxyfettsäuren überprüft werden. Dazu wurden die durch Reduktion der Hydroperoxide mit Natriumborhydrid gebildeten Hydroxyfettsäuren mit dem Standardgemisch der Hydroperoxide versetzt und injiziert. Die in Kapitel 2.1.6 beschriebene Reduktion verläuft nur in Methanol in der gewünschten Weise. Mit anderen Lösungsmitteln wie z.B. ACN entstehen viele nicht identifizierte Nebenprodukte, darunter auch Ketodiene, die sich bei 270 nm detektieren lassen. Im oberen Teil der Abbildung 3.13 ist das Elektropherogramm der aus Öl-, Linol- und Linolensäure mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide HPOE (0.5 mM), HPODE (0.9 mM) und HPOTE (0.7 mM) sowie der durch Reduktion mit Natriumborhydrid gebildeten korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HOE (0.5 mM), HODE (0.9 mM) und HOTE (0.7 mM) bei 234 nm zu sehen. Neben der Basislinientrennung der vier konjugierten HPODE- und HODE-Isomeren, die den wichtigsten Parameter bei LPO-Prozessen in biologischen Systemen widerspiegeln, ist eine gesteigerte Selektivität des Puffersystems gegenüber den HOTE-Isomeren zu erkennen. Während nur fünf der sechs HPOTE-Isomeren getrennt werden konnten, ließen sich alle sechs HOTE-Isomere voneinander trennen.

Der untere Teil des Elektropherogramms zeigt die Detektion bei 195 nm, bei der zusätzlich die nicht konjugierten Hydroxy- und Hydroperoxyverbindungen der Öl-, Linol- und Linolensäure zu beobachten sind.

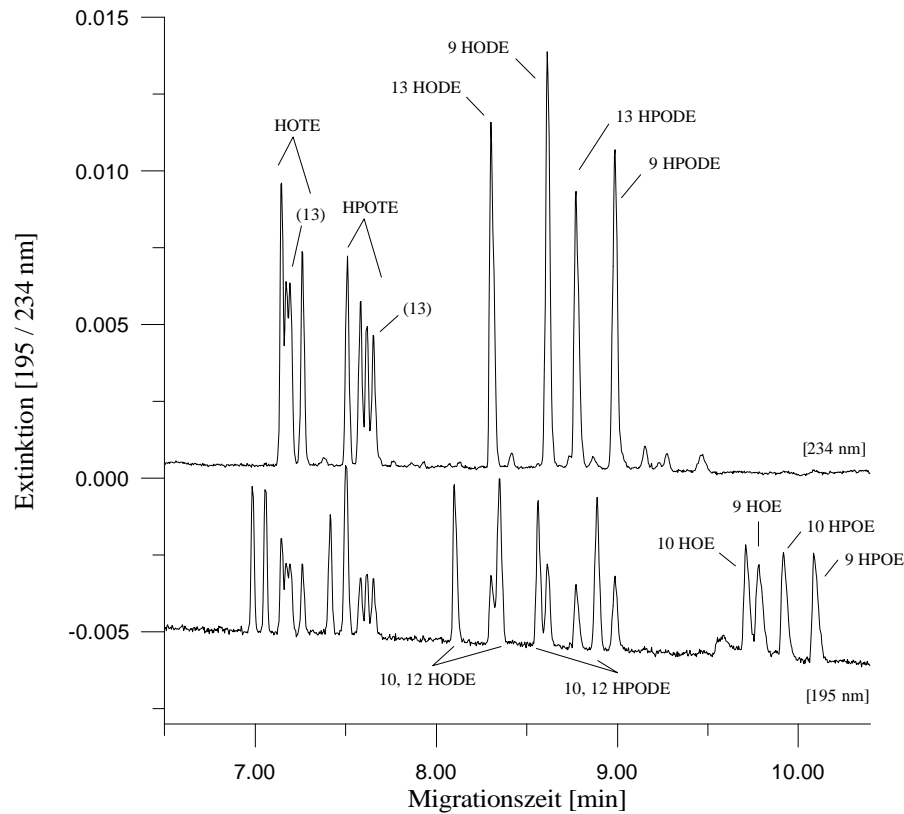


Abbildung 3.13: Trennung der isomeren Hydroperoxide HPOE, HPODE, HPOTE und der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HOE, HODE und HOTE; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm und 234 nm

Um einen abschließenden Eindruck über die Leistungsfähigkeit des Trennsystems zu geben, ist in Abbildung 3.14 die vollständige Trennung des Standardgemisches von OE, ODE und OTE, der abgeleiteten isomeren Hydroperoxide HPOE, HPODE und HPOTE sowie der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HOE, HODE und HOTE bei 195 nm dargestellt. Auch hier werden theoretische Bodenzahlen von 10^6 Böden erreicht. Die gleichzeitige Trennung der Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren gelang nur mit dem hier verwendeten Boraxpuffer. Sowohl das Meglumin- als auch das AMPD-Puffersystem, die ja eine gesteigerte Selektivität gegenüber den HPOTE-Isomeren erbracht hatten, lieferten in Bezug auf die Trennung der HOTE-Isomeren deutlich schlechtere Ergebnisse (nicht gezeigt).

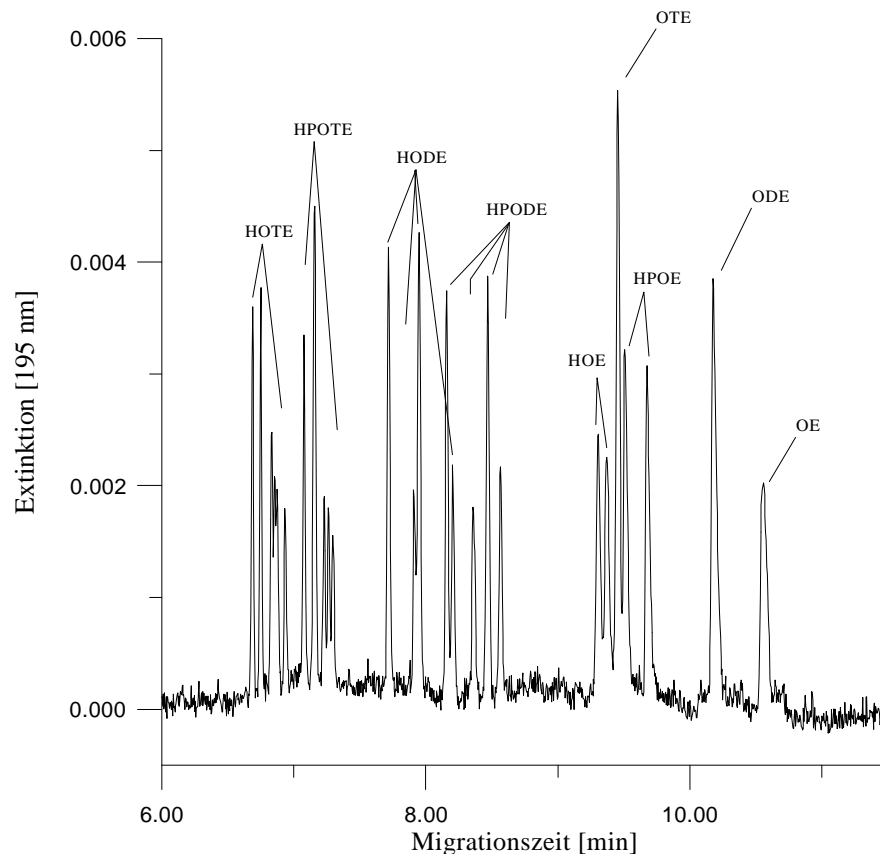


Abbildung 3.14: Trennung von Öl- (OE; 0.25 mM), Linol- (ODE; 0.15 mM) und Linolensäure (OTE; 0.13 mM), der mit Singulett-Sauerstoff hergestellten Hydroperoxide HPOE (0.5 mM), HPODE (0.9 mM) und HPOTE (0.7 mM) und der durch Reduktion mit Natriumborhydrid erhaltenen korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HOE (0.5 mM), HODE (0.9 mM) und HOTE (0.7 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

Desweiteren ergaben sich Überlagerungen der Hydroxy- und Hydroperoxyfettsäuren der Linolsäure. Umfangreiche Optimierungsversuche an diesen Puffersystemen brachten keinen Erfolg, so daß das in Abbildung 3.14 gezeigte Elektropherogramm die beste Trennung für dieses Analytgemisch darstellt.

3.1.3.2 Hydroperoxide und Hydroxyfettsäuren der Arachidonsäure

Neben den Produkten der Peroxidation der Linolsäure sind im besonderen auch die der Arachidonsäure (ETE) von großer biologischer Bedeutung. Verschiedene Hydroperoxide der Arachidonsäure sind nach *Bartmann*^[173] und *Samuelsson*^[174, 175] als Intermediate der Biosynthese von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen bekannt und besitzen wie auch deren reduzierte Formen schon in

geringsten Konzentrationen eine hohe physiologische Aktivität ^[67]. Deshalb erschien es sinnvoll, auch die Selektivität des entwickelten Boraxpuffersystems gegenüber diesen Verbindungen zu testen. Abbildung 3.15 zeigt die Trennung von sieben der acht isomeren Hydroperoxide (HPETE), die bei der Reaktion von Arachidonsäure mit Singulett-Sauerstoff gebildet werden. Die Zuordnung erfolgte über Vergleichsmessungen bei 234 nm und durch Aufstocken der Reaktionsmischung mit den kommerziell erhältlichen Standards 5S-HPETE und 15S-HPETE.

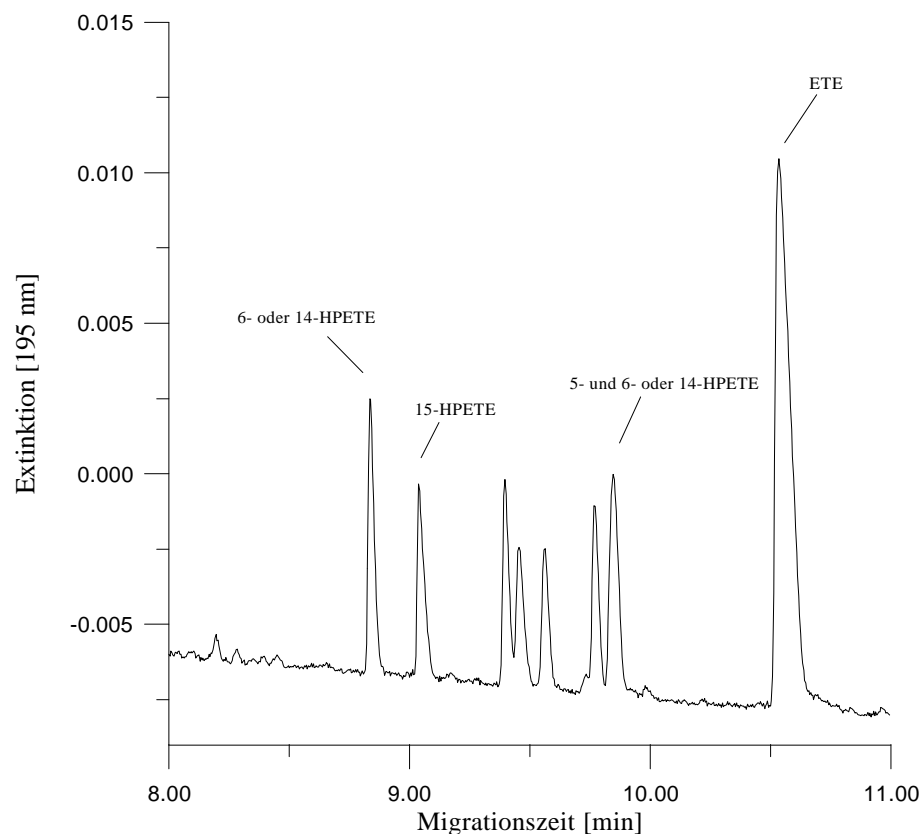


Abbildung 3.15: Trennung von Arachidonsäure (ETE; 0.8 mM) und deren Hydroperoxide HPETE (0.9 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

Die Trennung der mit Natriumborhydrid zu Hydroxyfettsäuren (HETE) reduzierten HPETE-Isomeren wird in Abbildung 3.16 gezeigt, bei der wiederum eine Steigerung der Selektivität des Puffersystems beobachtet werden konnte. Zur Identifizierung wurden die kommerziellen Hydroperoxidstandards ebenfalls mit Natriumborhydrid reduziert. Die Verwendung des Meglumin- bzw. AMPD-Puffersystems brachte keine

Vorteile gegenüber dem Boraxpuffer. Aufgrund der guten Ergebnisse war eine weitere Optimierung nicht notwendig.

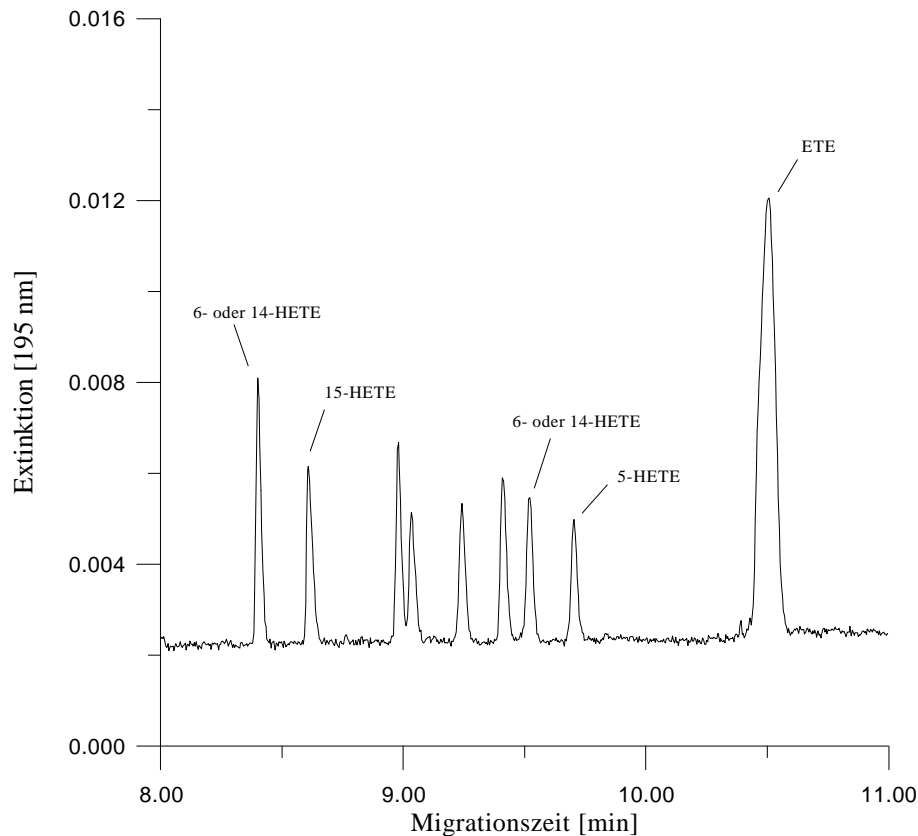


Abbildung 3.16: Trennung von Arachidonsäure (ETE; 0.8 mM) und der durch Reduktion der HPETE-Isomeren mit Natriumborhydrid erhaltenen Hydroxyfettsäuren (HETE; 0.9 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

Da in biologischen Proben sowohl Hydroperoxide der Öl-, Linol- und Linolensäure als auch die der Arachidonsäure vorkommen, sollte geprüft werden, ob die simultane Bestimmung dieser Analyten möglich ist. In einer solch komplexen Mischung (Abbildung 3.17) kommt es tatsächlich zu Überlagerungen der HPOE- und HPETE-Isomeren. Dies führt in der Praxis aber zu keinen Problemen, da die Gehalte an Arachidonsäure meist sehr gering sind und somit die Bestimmung der HPOE-Isomeren nicht gestört wird. Umgekehrt stört die Anwesenheit von HPOE nicht, da die überlagerten Signale der HPETE-Isomeren mit konjugierter Doppelbindung bei 234 nm bestimmt werden können. Die gezeigten Di-Hydroperoxide (Di-HPETE) der Arachidonsäure treten in biologischen Proben nur äußerst selten auf. Sie entstehen bei der Reaktion von HPETE mit Singulett-Sauerstoff und liegen, da jedes nicht

konjugierte Hydroperoxid wiederum leicht oxidiert werden kann, in einer Vielzahl von Isomeren vor. Eine weiterführende Identifizierung dieser Verbindungen war aufgrund fehlender Referenzsubstanzen leider nicht möglich.

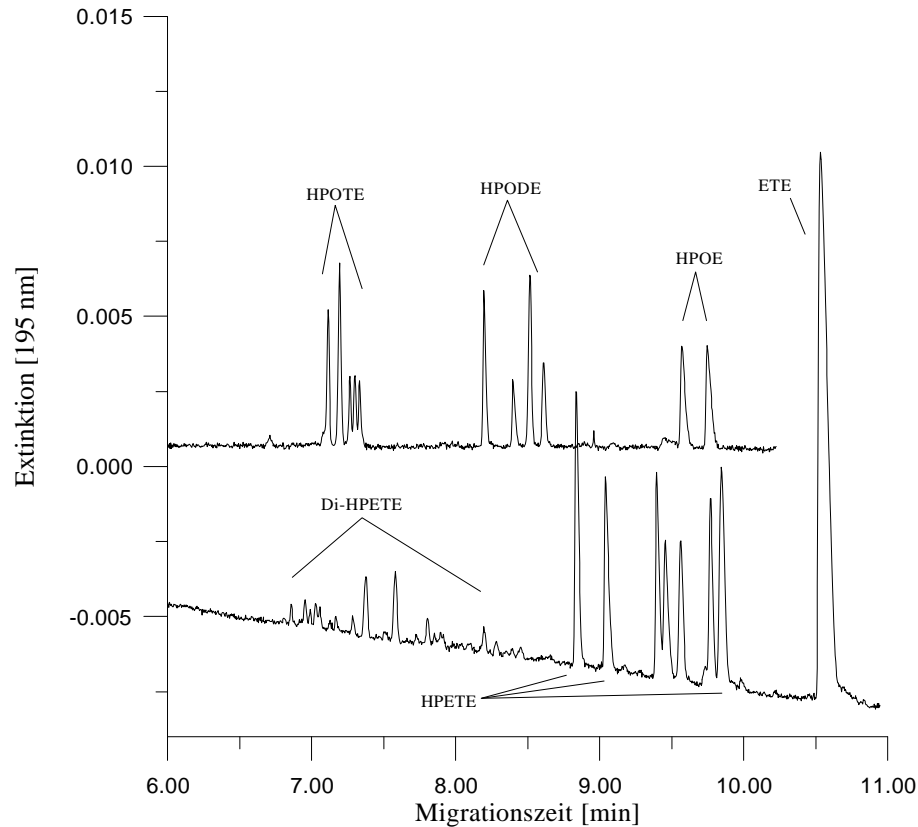


Abbildung 3.17: Peaküberlagerungen bei der simultanen Bestimmung von HPOE- und HPETE-Isomeren; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

3.1.3.3 Hydroperoxide der γ -Linolensäure

Die in natürlichen Triglyceriden enthaltenen ω -6-Fettsäuren haben eine besondere physiologische Bedeutung. Sie sind Vorstufen der Eicosanoide, Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane sowie der Leukotriene und Lipoxine. Fettsäuren der ω -3-Reihe werden dagegen zum Aufbau der Membranlipide des Gehirns und der Retina des Auges benötigt. Der erwachsene Mensch kann zwar durch Desaturasen und Elongasen ω -6-Fettsäuren aus α -Linolensäure bilden, doch gerade im Entwicklungsstadium sind diese Enzyme nicht genügend vorhanden^[176]. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, neben ω -3-Fettsäuren auch ω -6-Fettsäuren wie γ -Linolensäure mit der Nahrung aufzunehmen. Ein Nachteil ergibt sich jedoch durch

die hohe Oxidationsempfindlichkeit der ungesättigten Fettsäuren. Diese Problematik bezieht sich nicht nur auf die Lagerung der Fette, sondern auch auf deren Verwendung in verschiedensten Zubereitungen. Zur Untersuchung der aus solchen Lipiden gebildeten Hydroperoxide kann die oben beschriebene MEKC-Methode in leicht modifizierter Form angewandt werden. Abbildung 3.18 zeigt die Basislinientrennung der sechs durch photosensibilisierte Oxidation von γ -Linolensäure erhaltenen isomeren Hydroperoxide (γ -HPOTE) innerhalb von 11 min.

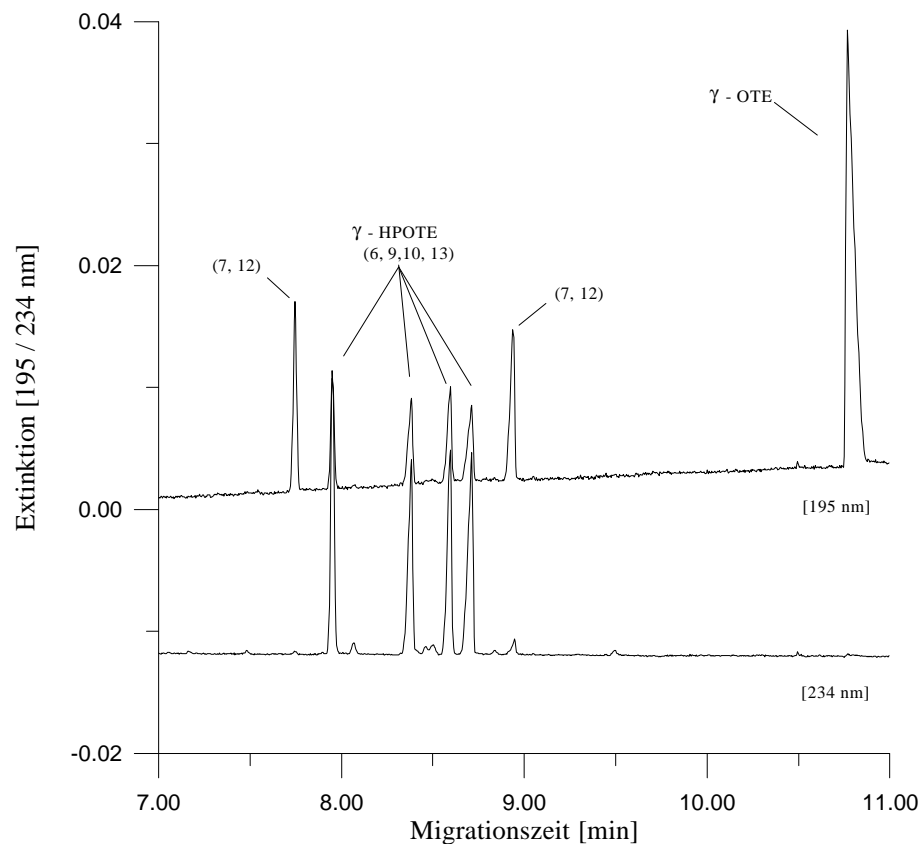


Abbildung 3.18: Trennung von γ -Linolensäure (γ -OTE; 1.0 mM) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide (γ -HPOTE; 1.4 mM); Elektrolyt: 10 mM Borax-puffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 5.7 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm und 234 nm

Im oberen Teil der Abbildung ist der Nachweis aller sechs Isomeren bei 195 nm dargestellt, während im unteren Teil bei 234 nm nur die Hydroperoxide mit konjugierter Doppelbindung zu erkennen sind. Zur Steigerung der Selektivität der im Vergleich zu den HPOTE- etwas lipophileren γ -HPOTE-Isomeren wurde der ACN-Anteil im Puffer von 2.4 auf 5.7 % erhöht. γ -Linolensäure zeigte bei der Umsetzung mit Singulett-Sauerstoff ein ähnliches Verhalten wie α -Linolensäure.

Bereits nach 22 Stunden war auch hier ein deutlicher Nachweis von Di-Hydroperoxiden möglich. Durch den erhöhten Lösungsmittelanteil im Puffer wird jedoch die Selektivität des Trennsystems für die hydrophileren Di-Hydroperoxide reduziert. Um eine optimale Trennung dieser Analyten zu erreichen, empfiehlt sich die Verwendung des Borax-Trennpuffers mit 2.4 % ACN-Anteil. Unter diesen Bedingungen gelingt auch die in Abbildung 3.19 gezeigte Basislinientrennung von α - und γ -Linolensäure.

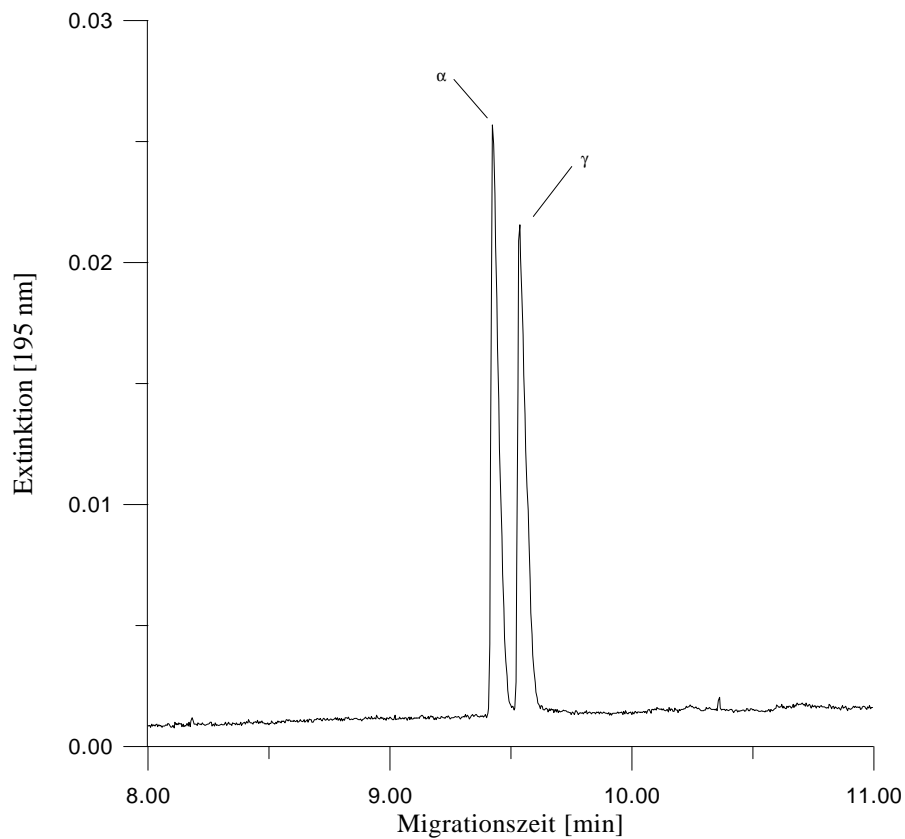


Abbildung 3.19: Trennung von α -Linolensäure (α -OTE; 1.0 mM) und γ -Linolensäure (γ -OTE; 0.9 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

3.1.4 UV-Diodenarray-Detektion

3.1.4.1 Verwendung von Bubble-Cells

Für die optische Detektion kann in der Kapillarelektrophorese nur die mittlere Weite der Kapillare ausgenutzt werden. Um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen, existieren mehrere Ansätze. Neben den aus der Mikro-HPLC bekannten Z-Zellen ^[177, 178] zählt die Vergrößerung des Lichtweges durch Erweiterung des Kapillardurchmessers zu den gerätetechnisch günstigsten und preislich attraktivsten Möglichkeiten. Bei den am Detektorfenster erweiterten Zellen wird zwischen Bubble-Cells und Sleeve-Cells unterschieden. Während Bubble-Cells ^[179, 180, 181] einen blasenförmig erweiterten Körper besitzen, verfügen Sleeve-Cells über eine rechtwinklige Weitung der Kapillare ^[182, 183].

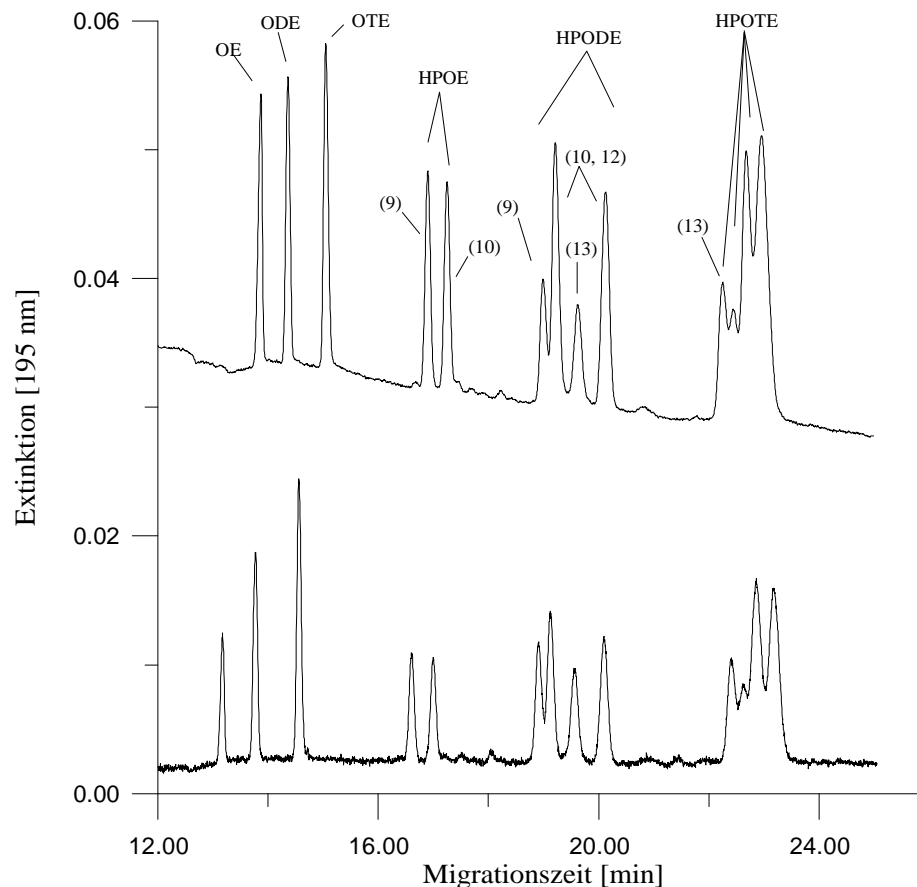


Abbildung 3.20: Erhöhung der Signalfächen durch Einsatz einer Bubble-Cell in der reversed-flow MEKC; unteres Elektropherogramm ohne, oberes mit Bubble-Cell; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, 750 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm; Slit: 200/100 μm

Beim Durchwandern dieser Detektorzellen bleibt das Peakvolumen annähernd konstant, so daß Effizienzverluste gering gehalten werden. Das von der Firma Hewlett Packard entwickelte „HP Extended Light Path Capillary System“ ist zur Zeit das einzige kommerziell angebotene Detektionssystem, welches zu keiner Bandenverbreiterung führt. Der Preis für die Kapillaren und das spezielle Detektorsystem ist jedoch entsprechend hoch. Die durch das hier vorgestellte thermische Verfahren, dessen Durchführung in Abschnitt 2.11 beschrieben ist, hergestellten Bubble-Cells sind eine kostengünstige und gerätetechnisch einfache Alternative, die lediglich eine Anpassung des Detektionssystems an die geänderten Maße der Kapillare am Detektorfenster erforderlich macht.

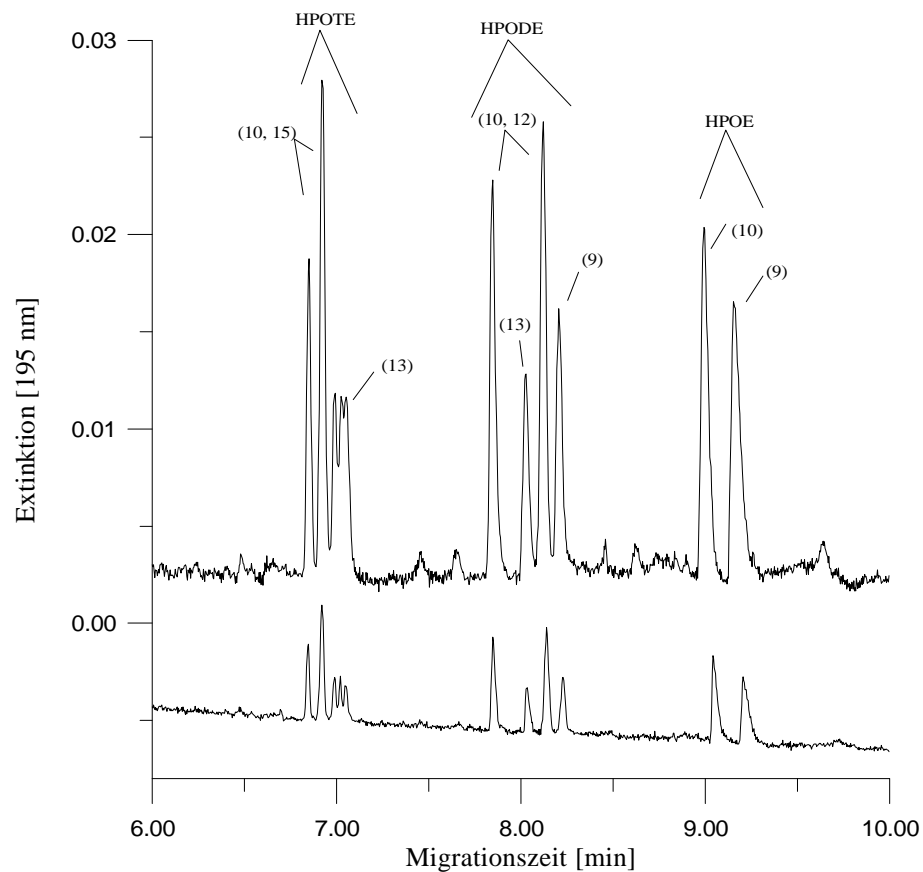


Abbildung 3.21: Erhöhung der Signalfächen durch Einsatz einer Bubble-Cell in der normal-flow MEKC; unteres Elektropherogramm ohne, oberes mit Bubble-Cell; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Detektion bei 195 nm; Slit: 200/100 μm

Eine falsche Dimensionierung des Detektionsspalts (Slit) wirkt sich nachteilig auf das Signal-Rauschverhältnis aus, steigert das Streulicht und reduziert die Linearität [184]. Für ein optimales Signal-Rauschverhältnis bei der UV-DAD-Detektion soll

nach Empfehlung der Firma Beckman ein Slit von 800/100 μm benutzt werden. Da durch geänderte Signalintensitäten bei verschiedenen Dimensionierungen des Detektionsspalt es jedoch kein Vergleich der Elektropherogramme mit und ohne Bubble-Cell möglich ist, wurde im Fall der unteren Elektropherogramme in den Abbildungen 3.20 und 3.21 auf eine Optimierung verzichtet. Die Abbildung 3.20 zeigt die bereits vorgestellte reversed-flow MEKC-Trennung des Standardgemisches bei 195 nm aus einer Vorstudie ^[159]. Die Verwendung eines Slit von 200/100 μm in Verbindung mit der in dieser Arbeit hergestellten Bubble-Cell erwies sich als optimal und zeigte bei einer Erhöhung der Signalflächen um den Faktor 2.5 keine merkliche Bandenverbreiterung sowie ein geringes Rauschen der Basislinie. Ähnlich gute Ergebnisse konnten auch unter normal-flow Bedingungen bei 195 nm erzielt werden (Abbildung 3.21). Bei der Trennung der isomeren Fettsäurehydroperoxide war sogar ein Anstieg der Signalflächen um den Faktor 4.5 zu beobachten, die Nachweisgrenze verbesserte sich unter diesen Bedingungen um den Faktor 3.5. Durch das geringere Rauschen der Basislinie bei 234 nm wird auch die Nachweisgrenze um den Faktor 4.5 reduziert (nicht gezeigt). Bei einer Untersuchung der Bubble-Cells im Institut für pharmazeutische Analytik der Firma ASTRA HÄSSLE (Schweden) wurde unter Verwendung eines UV-Detektors mit variabler Wellenlänge und einer optimalen Slit-Dimensionierung eine Empfindlichkeitssteigerung bis zum siebenfachen Flächenwert gefunden. Das von der Firma Hewlett Packard entwickelte „HP Extended Light Path Capillary System“ zeigte im gleichen Test wesentlich geringere Intensitätssteigerungen. Die Bandenverbreiterung war bei beiden getesteten Kapillaren sehr gering und wirkte sich nicht auf die Auflösung aus.

3.1.5 LIF-Detektion

Die oben gezeigte UV-Detektion der Fettsäurehydroperoxide beruht auf den im Molekül vorhandenen isolierten (195 nm) oder konjugierten (234 nm) Doppelbindungen. Dieser relativ unselektive Nachweis reicht im allgemeinen für die Untersuchung von Öl- und Fettproben aus. Zur Untersuchung der Hydroperoxide in biologischem Material ist aber aufgrund der komplexeren Matrix eine selektivere Detektionsmethode vorzuziehen. In der HPLC sind Fluoreszenzmethoden bekannt, bei denen nach chromatographischer Trennung der Hydroperoxide in einer enzymatischen Nachsäulenderivatisierungsreaktion ein fluoreszierendes Produkt

gebildet wird. Bei der von *Hellpointner* und *Gäb* ^[146] entwickelten Methode entsteht aus den Hydroperoxiden und der zugesetzten p-Hydroxyphenylessigsäure (PES) unter der katalytischen Wirkung von Meerrettichperoxidase (HRP) ein Biphenylderivat, das fluorimetrisch detektiert werden kann. Da für bestimmte Hydroperoxidklassen die Katalyse durch HRP nicht ausreichend schnell ist, wird auch die Mikroperoxidase-11 (MP-11) eingesetzt (Abbildung 3.22).

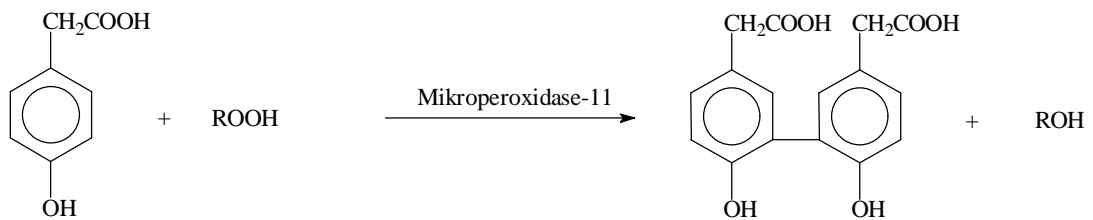


Abbildung 3.22: Enzymatische Reaktion der Hydroperoxide zum fluoreszierenden Biphenyl

MP-11 reagiert ebenfalls selektiv mit den Hydroperoxiden, so daß Matrixkomponenten ohne Eigenfluoreszenz die Detektion nicht stören. Daher sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit versucht werden, diese selektive und empfindliche Fluoreszenzdetektion mit der Trennleistung der MEKC zu vereinen. Zur Steigerung des Nachweisvermögens sollte die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) zum Einsatz kommen. Ein analoges Vorgehen wie in der HPLC schied aus, da das Zumischen der Reagenzien nach der MEKC-Trennung über ein T-Stück erhebliche Nachteile in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Auflösung verursachte. *Rosenstock* ^[145] beschreibt Einzelheiten hierzu am Beispiel der MEKC-Bestimmung von Fettsäurehydroperoxiden. Der von *Schmitz* ^[144] verfolgte Ansatz, der als on-column- bzw. post-column-Technik zu bezeichnen ist, erschien dagegen vielversprechender. Durch Kopplung einer Trennkapillare mit einer Reaktionskapillare, in der MP-11 an der Innenwand immobilisiert war, gelang die Derivatisierung der Hydroperoxide im Anschluß an die Trennung. Jedoch ergaben sich unter den von *Schmitz* beschriebenen Bedingungen noch Probleme bezüglich der Auflösung, so daß nur der Nachweis der einzelnen Hydroperoxidgruppen (keine Isomerentrennung) möglich war (vgl. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.23). Als Ursachen der beobachteten Bandenverbreiterung kamen die nicht ausreichende Geschwindigkeit der Reaktionen der Analyten mit der immobilisierten Mikroperoxidase und eine zu geringe Selektivität des Trennpuffers in Betracht. Eine Erhöhung der Selektivität des

Trennpuffers für die Fettsäurehydroperoxide wurde bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, so daß im folgenden zunächst die Bedingungen der Immobilisierung überprüft und gegebenenfalls optimiert werden mußten.

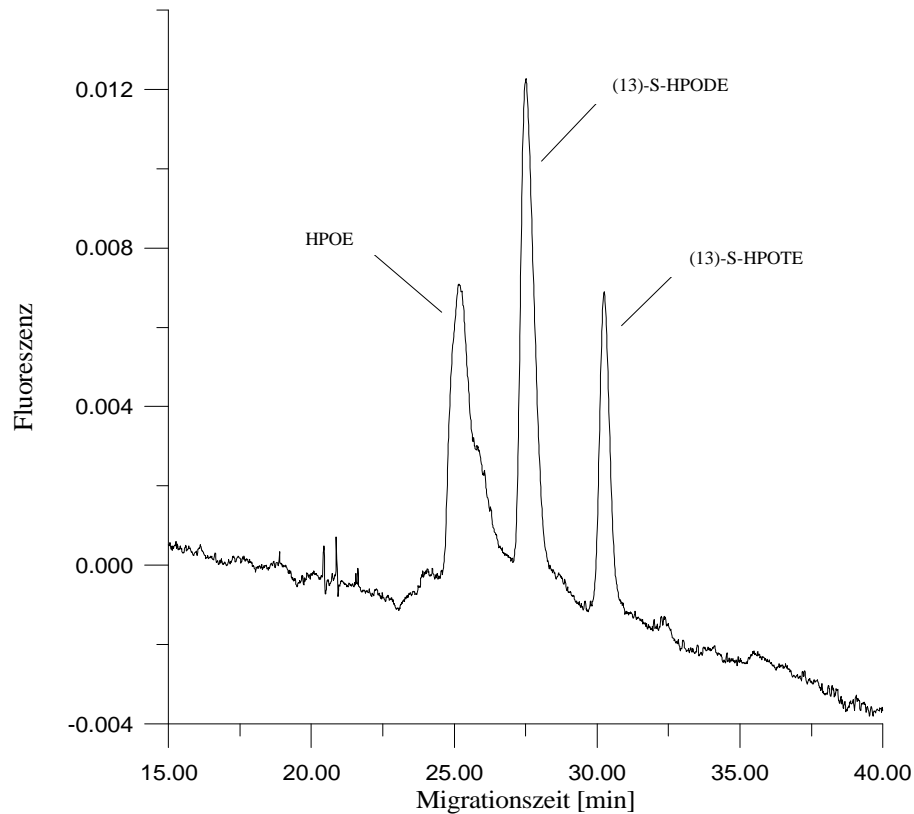


Abbildung 3.23: Elektropherogramm von HPOE, (13)-S-HPODE und (13)-S-HPOTE

3.1.5.1 Immobilisierung von MP-11 an der fused-silica Kapillarwand

Die zur Immobilisierung notwendige Mikroperoxidase-11 ist ein Häminundecapeptid, welches aus Cytochrom c mit Hilfe proteolytischer Enzyme gewonnen wird. Die Immobilisierung der MP-11 an eine fused-silica Oberfläche kann entweder über Aminfunktionen oder über Carboxylgruppen erfolgen.

In Anlehnung an Arbeiten von *Schuhmann*^[185, 186] und *Weetall*^[187], bei denen die Carboxylgruppen verschiedener Enzyme zur Immobilisierung verwendet wurden, sollte MP-11 ebenfalls über die Carboxylgruppen kovalent an die vorbehandelte fused-silica Oberfläche gebunden werden. Abbildung 3.24 zeigt die Schritte der Immobilisierungsreaktion (MP-11 dargestellt als R-COOH). Nach der Aktivierung der Silanolgruppen mit Salpetersäure erfolgt die Silanisierung der Kapillaroberfläche

mittels 3-(Triethoxysilyl)-propylamin. Hierdurch werden die zur Kopplung benötigten Aminfunktionen bereitgestellt. Die Umsetzung der Aminfunktionen mit den Carboxylgruppen der MP-11, unter Ausbildung von Amidbindungen, gelingt nach Aktivierung mit einem Carbodiimid. Als Optimum für die Aktivierung der Silanolgruppen und für die Silanisierung wurden Temperaturen von 45 °C bzw. 35 °C ermittelt. Wegen der thermischen Empfindlichkeit der Mikroperoxidase erfolgte die Immobilisierung bei Raumtemperatur. Durch die Verwendung von 3-(Triethoxysilyl)-propylamin als Silanisierungsreagenz dürfte aus sterischen Gründen die kovalente Bindung an den Carboxylgruppen der Peptidkette bevorzugt werden ^[185]. Zusätzlich wurden bereits mit Aminfunktionen belegte Kapillaren verschiedener Hersteller, die normalerweise zur Umkehrung des EOF in der Kapillarelektrophorese eingesetzt werden, mit Mikroperoxidase immobilisiert und zum Vergleich herangezogen.

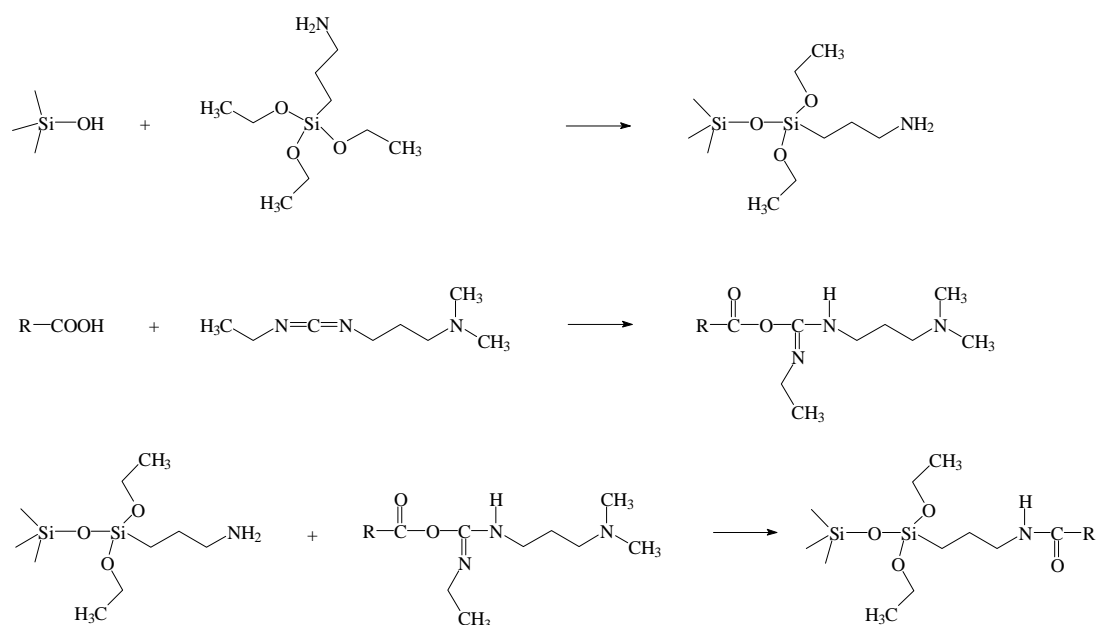


Abbildung 3.24: Immobilisierung von MP-11 (= RCOOH) an der fused-silica Kapillaroberfläche

3.1.5.2 Totvolumenfreie Kopplung von Trenn- und Reaktionskapillare

Die von *Schmitz* eingeführte post-column-Derivatisierung zur fluorimetrischen Bestimmung von Hydroperoxiden im Anschluß an eine MEKC-Trennung erfordert die Kopplung einer Trenn- und einer Reaktionskapillare. Eine einfache Möglichkeit besteht im Zusammenstecken beider Kapillaren in einem Verbindungsstück aus

Teflon mit geeigneter Bohrung ^[144]. Daß diese Art der Kopplung keinen bedeutenden Einfluß auf die Bandenverbreiterung ausübt, konnte *Schmitz* experimentell belegen. Gegenüber einer 40/47 cm langen fused-silica Kapillare ergab eine gekoppelte Kapillare aus einem 30 cm langen und einem 10/17 cm langen Stück nur einen geringfügigen Effizienzverlust.

Zur weiteren Optimierung der Kopplung von Kapillaren wurde erstmals die aus der Lichtleitertechnik bekannte Verbindungsart des Spleißens eingesetzt ^[154, 157]. Eine genaue Beschreibung der Durchführung befindet sich im Experimentellen Teil (Abschnitt 2.10). Während des Spleißvorgangs muß zur Aufrechterhaltung des Innendurchmessers ein Stickstoffstrom mit einem Überdruck von ca. 800 mbar auf die Kapillare gelegt werden. Dieser bewirkt darüber hinaus eine Kühlung der äußeren Zonen des Schmelzbereiches, so daß die thermische Belastung des Immobilisates auf einen kleinen Abschnitt der Kapillare begrenzt wird. Durch den Lichtbogen wird jedoch die äußere, zur Stabilisierung dienende Polyimidschicht entfernt. Die entstehende bruchempfindliche Stelle muß anschließend mit einer Teflonhülse stabilisiert werden. Die Fixierung der Hülse erfolgte mit Cyanacrylat, um eine schnelle Handhabung zu gewährleisten und Kriechströme zu vermeiden. Cyanacrylat ermöglicht darüber hinaus eine Wiederverwendung der Kopplungsstücke, da der Kleber mit Aceton leicht entfernt werden kann. Diese in der Literatur noch nicht beschriebene totvolumenfreie Kopplung der Kapillaren ließ keinen Unterschied zu einer gleich langen fused-silica Kapillare erkennen. Um eventuell auftretende leichte Effizienzverluste zu verstärken, wurde eine zweite Schweißnaht angebracht. Auch in diesem Fall waren keine Effizienzverluste erkennbar. Nachdem sichergestellt war, daß das Verbinden der Kapillaren zu keiner Bandenverbreiterung führte, konnte der Trennelektrolyt für die beabsichtigte LIF-Detektion der Fettsäurehydroperoxide optimiert werden.

3.1.5.3 pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz und Umsatzrate der Derivatisierungsreaktion

Zur Klärung der Frage, ob die oben beschriebenen Trennelektrolyten (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) für die Nachsäulenderivatisierung der Hydroperoxide und die anschließende LIF-Detektion geeignet sind, wurden Vorversuche durchgeführt. Bei diesen wurde nicht, wie in der Kapillarelektrophorese üblich, mit einer

Spannungsdifferenz zwischen Inlet und Outlet gearbeitet, sondern auf das druckgetriebene System des Geräts zurückgegriffen. Dieses ermöglicht neben der hydrodynamischen Injektion auch die Reinigung und Konditionierung der Kapillare, bzw. kann unter elektrophoretischen Bedingungen dem EOF entgegenwirken und diesen reduzieren.

Die nachfolgenden Versuche wurden, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, in einer 40 cm langen fused-silica Kapillare durchgeführt, die mit einer 10/17 cm langen, das Detektionsfenster enthaltenden Reaktionskapillare gekoppelt war. Der Elektrolyt bestand aus 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, 750 mg/l Brij 35, 35 mM SDS und 0.8 mM PES und wurde durch Zugabe von konzentrierter Natronlauge auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt. Der injizierte Probepfropfen wurde mit einem Überdruck von 20 psi, ohne Anlegen einer Spannung, zum Detektor transportiert. Beim Eintritt des Probepfropfens in die Reaktionskapillare reagieren die enthaltenen Hydroperoxide zu dem oben beschriebenen Biphenylderivat, welches bei Anregung mit einem He-Cd-Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$) ein Emissionsmaximum von $\lambda = 415 \text{ nm}$ zeigt. Durch diese einfache Versuchsführung kann unter praxisnahen Bedingungen um den Faktor 20-40 schneller gearbeitet werden, da ein Analysenlauf nur ca. 1-2 min dauert. Neben der Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme sollten während dieser Untersuchungen die wichtigsten Reaktionsparameter für die Optimierung ermittelt werden.

Um die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz und der Derivatisierungsreaktion (Abbildung 3.25, Kurve A) zu bestimmen, wurde eine 1 mM Lösung eines Fettsäurehydroperoxids in Methanol injiziert und das Detektorsignal nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt. Beobachtet wurde ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz im untersuchten Bereich von pH 6-10. Da dieser Anstieg sowohl von der Derivatisierungsreaktion als auch von den Fluoreszenz-Eigenschaften des gebildeten Biphenylderivats (PES-Dimer) abhängig sein konnte, wurde eine 1 mM Lösung des synthetisch hergestellten PES-Dimers unter den gleichen Bedingungen injiziert (Kurve B). Auch hier wurde ein entsprechender Verlauf der Fluoreszenz gefunden. Zum Vergleich der beiden Meßreihen wurden die Fluoreszenzintensitäten auf pH 10 normiert (Intensitätswert = 1.00). Die Meßreihen (A) und (B) zeigen keine Abhängigkeit der Derivatisierungsreaktion vom pH-Wert. Aus den unterschiedlichen Signalfächern von (A) und (B) (vgl. Originaldaten in den Abbildungen 5.29 und 5.30, Anhang) konnte eine Umsatzrate von ca. 50-60 % für diese Reaktion geschätzt

werden. Die Konzentration des zur Derivatisierung eingesetzten PES hatte bei pH 10 im untersuchten Bereich von 0.4-1.2 mM keinen Einfluß auf die Signalintensität. Der für die UV-Detektion optimierte Boraxpuffer (pH 9.3) zeigte bei einer PES-Konzentration von 0.4 mM im Vergleich zum Phosphatpuffer (pH 6.9) ein 8-fach größeres Fluoreszenzsignal (vgl. Abbildung 5.32, Anhang).

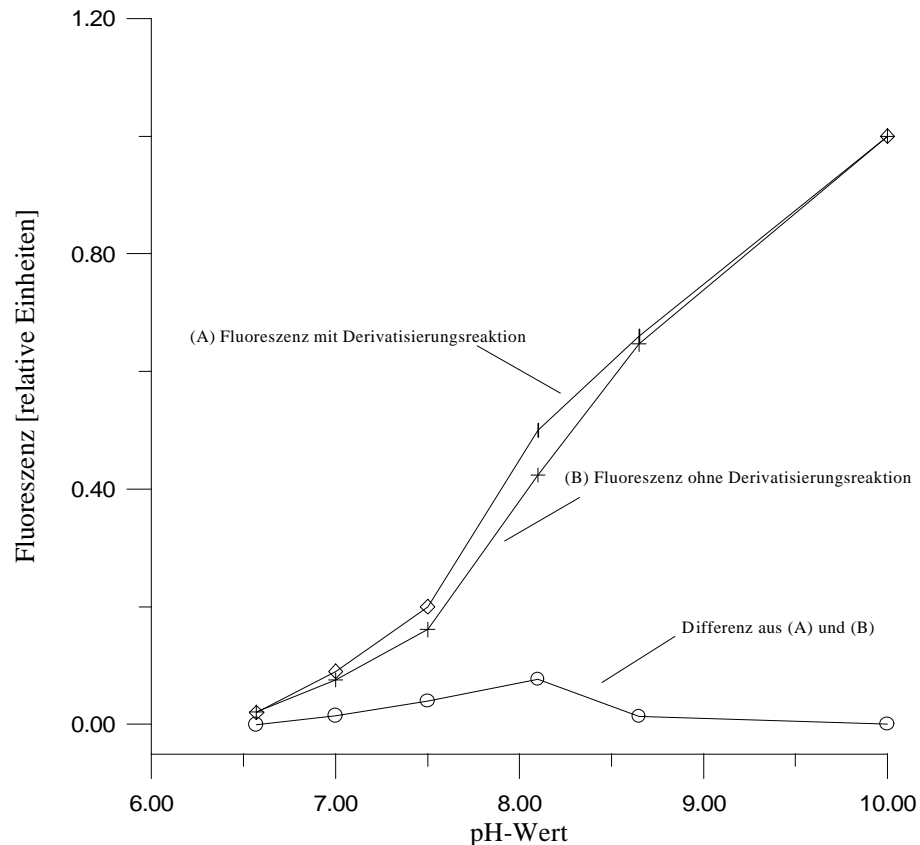


Abbildung 3.25: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz mit und ohne Derivatisierungsreaktion

3.1.5.4 Optimierung unter reversed-flow MEKC-Bedingungen

Die Optimierung der LIF-Detektion unter reversed-flow MEKC-Bedingungen erfolgte mit einer 40/10/57 cm langen fused-silica Kapillare, das heißt, die Trennung wurde in einer 40 cm langen fused-silica Kapillare durchgeführt, die mit einer 10/17 cm langen, das Detektorfenster enthaltenden Reaktionskapillare gekoppelt war. Der mittels UV-Detektion optimierte Trennelektrolyt (Abschnitt 3.1.1), der 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 720 mg/l Brij 35, 30 mM SDS und 1 % Aceton enthielt, mußte für die LIF-Detektion noch mit p-Hydroxyphenylessigsäure (PES) versetzt werden. Als geeignete Konzentration

konnte in Vorversuchen 0.4 mM PES ermittelt werden. Die Anregung des durch die post-column-Reaktion aus PES gebildeten Biphenylderivats erfolgte mit einem He-Cd-Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$), das emittierte Licht wurde mit einem Filter im Bereich von 415 nm gemessen. Erste Detektionsversuche zeigten einen starken Verlust an Fluoreszenzintensität durch das zur Steigerung der Trennleistung eingesetzte Aceton. Nach Reduzierung des Acetongehalts auf 0.5 % wurde das im unteren Teil der Abbildung 3.26 dargestellte Elektropherogramm erhalten, das die Trennung eines Gemisches der isomeren Hydroperoxide HPOE, HPODE und HPOTE zeigt.

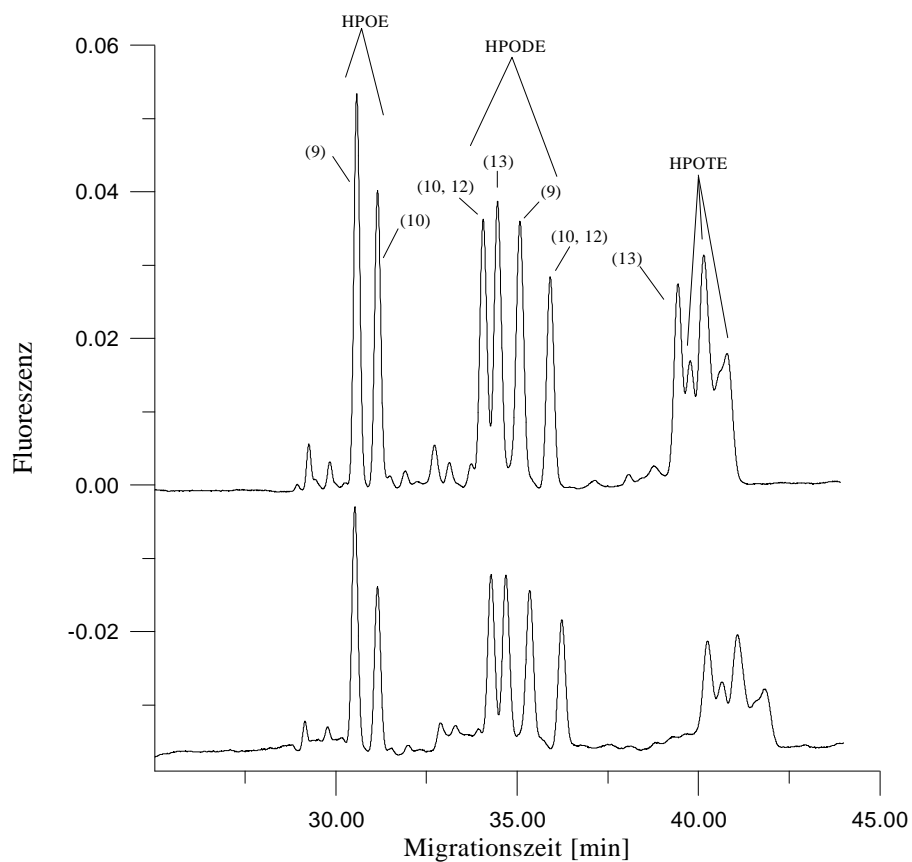


Abbildung 3.26: Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion der isomeren Hydroperoxide von HPOE, HPODE und HPOTE; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH6.3), 30 % (v/v) Ethanol + 0.5 % Aceton, 720 mg/l Brij 35 und 30 mM SDS, 0.4 mM PES; fused-silica Kapillare 40/10/57 cm; oberes Elektropherogramm wurde mit acetonfreiem Elektrolyten im Outletgefäß aufgenommen

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde Aceton nur dem Inlet-Elektrolyten zugesetzt. Durch den zum Inlet gerichteten EOF wurde der Elektrolyt des acetonfreien Outletgefäßes in die Kapillare gezogen. Auf diese Weise konnte die Wirkung des Acetons bei der post-column-Reaktion und / oder LIF-Detektion stark

reduziert und die Fluoreszenzintensität erhöht werden (oberes Elektropherogramm Abbildung 3.26). Die Anwendung eines derartigen „Elektrolyt-Gradienten“ war in der CE-Literatur noch nicht beschrieben worden.

Um den Einfluß des „Elektrolyt-Gradienten“ auf die Trennung der Analyten besser zu verstehen, wurde das in Abschnitt 3.1.1.5 beschriebene Verfahren zur Bestimmung des elektroosmotischen Flusses angewendet. Aus dem ermittelten Wert von ca. 1.7 cm/min für eine 57 cm lange Kapillare folgt, daß nach ca. 10 min der Puffer der 17 cm langen Reaktionskapillare und nach etwa 24 min, das ist die Zeit bis zum Eintreffen der ersten Analyten an der Reaktionskapillare, auch ein Teil des Puffers der Trennkapillare ausgetauscht war. Da ein Mangel an Aceton jedoch die bereits erreichte Trennung nicht wieder verschlechtert, wirkt sich der Pufferaustausch nicht negativ auf die Effizienz des Trennsystems aus. Der Vergleich der Abbildungen 3.5 und 3.26 zeigt, daß keine Bandenverbreiterung durch die Nachsäulenderivatisierungsreaktion auftritt. Zusätzlich sind in Tabelle 3.2 die wichtigsten Trennparameter der MEKC mit UV- und LIF-Detektion gegenübergestellt.

Verbindung	MEKC-UV-DAD			MEKC-LIF		
	Migrationszeit [min] ^{a)}	R _S	N [10 ⁵]	Migrationszeit [min] ^{b)}	R _S	N [10 ⁵]
10-HPOE (8E)	17.0	–	1.43	30.6	–	1.60
9-HPOE (10E)	17.4	1.9	1.32	31.1	1.9	1.60
9-HPODE (10E,12Z)	19.2	8.8	1.29	34.1	8.6	1.35
10-HPODE (8E,12Z) oder 12-HPODE (9Z,13E)	19.4	1.0	1.14	34.5	1.0	1.26
13-HPODE (9Z,11E)	19.8	1.7	0.99	35.1	1.5	1.14
10-HPODE (8E,12Z) oder 12-HPODE (9Z,13E)	20.3	2.1	1.10	35.9	2.1	1.43
13-HPOTE (9Z,11E,15Z)	22.5	8.6	1.06	39.4	8.7	1.37
Nicht zugeordnet: 9-, 10-, 12-, 15- oder 16-HPOTE	22.7	0.8	1.26	39.8	0.8	1.61
	22.9	0.9	0.86	40.1	0.8	0.84
	23.3	1.0	0.70	40.8	1.0	0.45

a) vgl. Abb. 3.5; b) vgl. Abb. 3.31

Tabelle 3.2: Vergleich der Trennparameter der MEKC mit UV-DAD- und LIF-Detektion

Da zur Immobilisierung der Mikroperoxidase-11 unterschiedliche Amin-Kapillaren eingesetzt wurden, mußte geprüft werden, ob sich dies auf die Eigenschaften der Reaktionskapillaren auswirkte. Die in Abbildung 3.27 dargestellten Elektrophero-

gramme zeigen nur einen geringen Responseunterschied. Der beobachtete Auflösungsverlust bei steigendem Response ist auf eine stärkere Wechselwirkung von Analyt und Immobilisat zurückzuführen. Die Stabilität der Reaktionskapillaren im Analysenbetrieb beträgt mehr als eine Woche, bei der Lagerung im Kühlschrank ist nach einigen Monaten kein Responseverlust festzustellen. Mit dieser neuen MEKC-LIF-Methode war gegenüber der MEKC-UV-DAD-Methode eine Verbesserung der Nachweisgrenze für nicht konjugierte Fettsäurehydroperoxide um den Faktor 10 auf ca. 10-15 μM (3σ) möglich. Die gerätebedingte, ungenaue hydrodynamische Injektion und die leicht unterschiedlichen Eigenschaften der Reaktionskapillaren lassen aber keine Bestimmung der Hydroperoxidgehalts zu. Der für eine

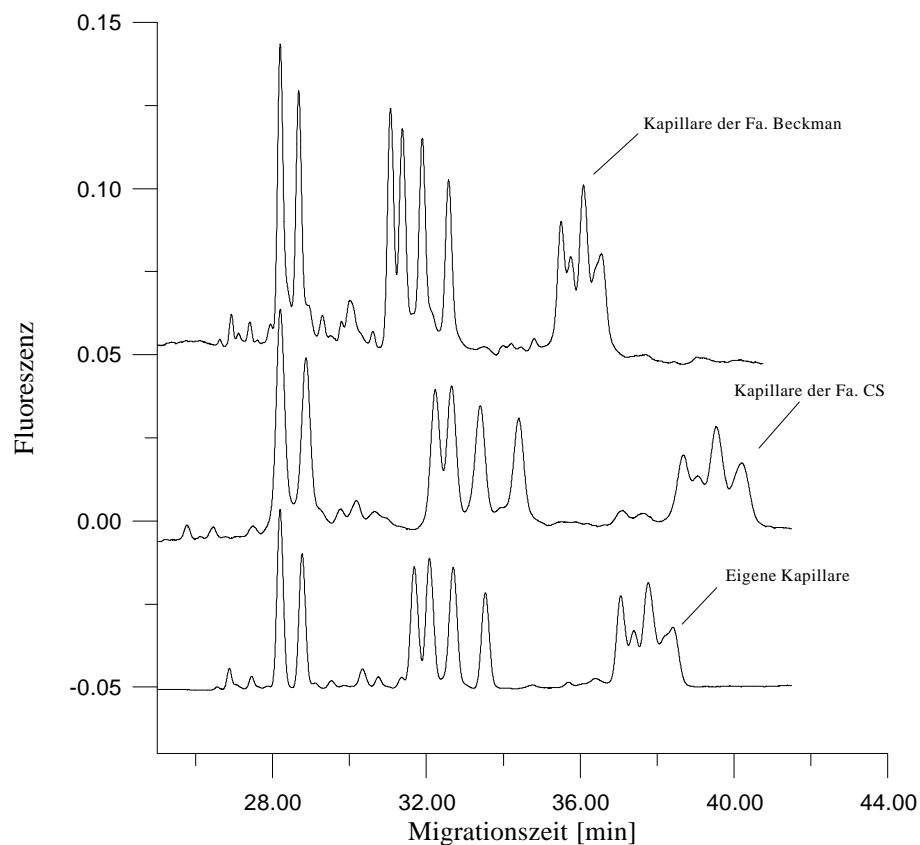


Abbildung 3.27: Vergleich verschiedener Reaktionskapillaren; zeitlich normiert auf erstes Signal

Flächennormierung ideale interne Standard (ISTD) wäre aufgrund der komplexen Anforderungen des Trenn- und Detektionssystems ein isomerenreines, anionisches lipophiles Hydroperoxid, mit dem sowohl die Injektionsmenge als auch die Enzymreaktion standardisiert werden könnte. Versuche mit verschiedenen

Fettsäurehydroperoxiden waren aufgrund von Comigrationen erfolglos. Im Falle des reversed-flow Systems konnte die ungenaue Injektion durch den Einsatz von Naphthalin-1,5-disulfonsäure bzw. Amino-G-Säure als ISTD (ähnliche Fluoreszenzparameter) korrigiert werden.

Die Verwendung des Brij 35-freien Puffersystems ist aufgrund des niedrigen pH-Wertes und der daraus resultierenden geringen Fluoreszenzausbeute nicht geeignet. Der um 0.3 Einheiten reduzierte pH-Wert des Puffers ermöglichte zwar eine gute Trennung (vgl. Abbildung 3.3), führte jedoch durch seine geringe Signalintensität und der Erhöhung der Analysendauer auf über 60 min zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

3.1.5.5 Optimierung unter normal-flow MEKC-Bedingungen

Die Übertragung der neuen LIF-Detektionsmethode auf das normal-flow Trennsystem sollte nach den in den Vorversuchen erhaltenen Ergebnissen zu einer deutlichen Verbesserung des Nachweisvermögens und der Selektivität beitragen. Dabei sollten insbesondere die Vorteile des Boraxpuffers ausgenutzt werden, die unter anderem im hohen pH-Wert (gute Fluoreszenzausbeute), den schnellen Analysenzeiten und der einfachen Konditionierung der Kapillaren liegen. Der mittels UV-Detektion optimierte Elektrolyt bestand aus 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN und 0.4 mM PES. Die Trennung erfolgte in einer fused-silica Kapillare mit einer Länge von 60/10/77 cm. In Abbildung 3.28 ist das Elektropherogramm zu sehen, das mit dem Standardgemisch der isomeren Hydroperoxide (HPOE, 1.1 mM; HPODE, 1.9 mM; HPOTE, 1.4 mM in Methanol) erhalten wurde. Überraschenderweise gelang im Vergleich zum Elektropherogramm in Abbildung 3.26 nur eine Gruppentrennung von HPOE, HPODE und HPOTE, in der lediglich eine Antrennung der isomeren Hydroperoxide von HPOE und HPODE zu erkennen ist. Zwar ergab sich in Übereinstimmung mit den Vorversuchen ein ca. 4-fach höherer Response gegenüber der reversed-flow MEKC, doch trotz intensiver Bearbeitung konnte keine Verbesserung der Auflösung erreicht werden. Zur Kontrolle wurden die Reaktionskapillaren unter reversed-flow Bedingungen getestet, wobei aber keine Abweichung von früheren Ergebnissen festgestellt wurde. Somit waren zunächst keine Gründe erkennbar, die zu der wesentlich schlechteren Auflösung des normal-flow Systems führten.

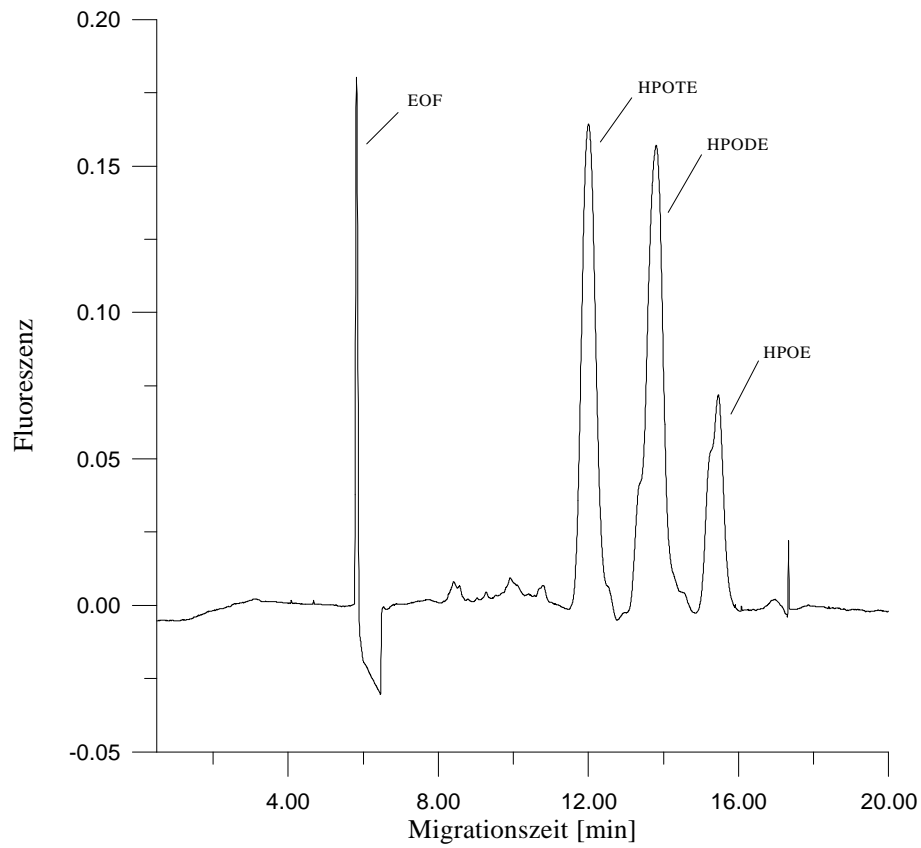


Abbildung 3.28: Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion der isomeren Hydroperoxide HPOE, HPODE und HPOTE; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN, 0.4 mM PES; fused-silica Kapillare 60/10/77 cm; Feldstärke 390 V/cm

3.1.5.6 Theoretische Grundlagen und Simulation der Nachsäulenderivatisierung

Um die im vorangegangenen Abschnitt aufgetretenen Probleme bei der Nachsäulenderivatisierung in der normal-flow MEKC besser zu verstehen, war eine genauere Untersuchung des Verlaufs von Trennung und Nachsäulenderivatisierungsreaktion notwendig. Dabei half die Vorstellung, daß unter idealen Verhältnissen die Trennung in der MEKC auf sehr schmalen Substanzzonen basiert, deren Verbreiterung in der Regel nur durch Longitudinaldiffusion erfolgt. Gegenüber den MEKC-UV-DAD-Methoden werden die Substanzzonen bei den MEKC-LIF-Methoden nicht direkt detektiert, sondern treten nach Verlassen der Trennkapillare in die Reaktionskapillare ein und reagieren dort enzymkatalysiert mit dem im Puffer enthaltenen PES. Das entstehende Biphenylderivat (PES-Dimer) ermöglicht die

Fluoreszenzdetektion. Bei genauer Betrachtung dieses Verlaufs ergeben sich für die beiden verwendeten Trennsysteme die nachfolgend aufgeführten Fragen, die sowohl theoretisch als auch praktisch bearbeitet wurden:

1. Welchen Einfluß hat die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Bandenverbreiterung?
2. Wie wirkt sich die relative Migrationsgeschwindigkeit der Edukte (Hydroperoxide) und Produkte (PES-Dimer) auf die Bandenverbreiterung aus?
3. Wie groß muß der Abstand der Peakmaxima sein, um bei einer eventuell auftretenden Bandenverbreiterung noch eine ausreichende Auflösung zu gewährleisten?
4. Reicht die Diffusion zum schnellen Transport der Hydroperoxidmoleküle an die mit MP-11 belegte Kapillarwand aus?

Der praktische Ansatz bestand in der Erfassung wichtiger Parameter der unterschiedlichen Trennsysteme, während sich der theoretische Teil auf die Entwicklung einer rechnergestützten Simulation konzentrierte, die das Verhalten der Hydroperoxidzonen in der Reaktionskapillare illustrieren sollte.

Die fehlende Bandenverbreiterung bei der reversed-flow MEKC setzt entweder eine sehr schnelle, am Anfang der Reaktionskapillare stattfindende Reaktion voraus oder eine fast gleiche Migrationsgeschwindigkeit der Hydroperoxide und des entstehenden Reaktionsproduktes. Eine langsam ablaufende Reaktion oder stark unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeiten sollten mit einer erheblichen Bandenverbreiterung verbunden sein. Nicht zu vernachlässigen scheint auch die Diffusion der Hydroperoxidmoleküle zur Kapillarwand zu sein, um dort mit dem immobilisierten Enzym zu reagieren. Eine langsame Diffusion der Hydroperoxide würde eine erhebliche Bandenverbreiterung nach sich ziehen. Die Signaltbreite des reversed-flow MEKC-Systems betrug bei einer Migrationszeit von 30-40 min für 50 cm Trennstrecke ca. 0.5-0.6 min. Dies entspricht einer Substanzzone von ungefähr 0.8 cm Länge. Bei dieser Migrationsgeschwindigkeit verbringen die Hydroperoxide ein Viertel der Gesamtzeit (7.5 min) in der Reaktionskapillare, deren Länge 10 cm beträgt. Eine Hydroperoxidzone belegt somit 1/15 der Reaktionskapillare, und es dauert ca. 30 Sekunden, bis sie eine Strecke zurückgelegt hat, die ihrer Länge gleich ist. In dieser Zeit kann jedes Hydroperoxidmolekül durch

Diffusion ($D_s = \sqrt{2 \cdot D \cdot t}$ mit $D \approx 6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$) eine 700 μm lange Strecke zurückzulegen, was dem 14-fachen Kapillardurchmesser entspricht.

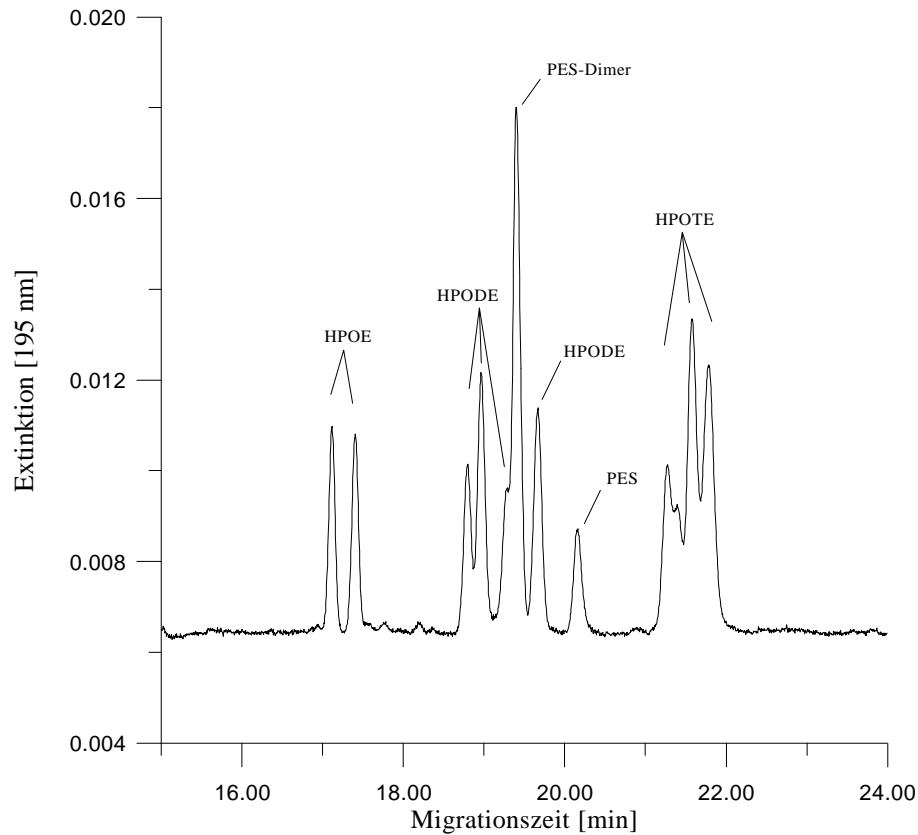


Abbildung 3.29: Migrationsverhalten von PES und PES-Dimer unter reversed-flow Bedingungen im Vergleich zu HPOE, HPODE und HPOTE; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol + 0.5 % Aceton, 720 mg/l Brij 35 und 30 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm

Aus den unter normal-flow Bedingungen erhaltenen Daten (Signalbreite: 0.017-0.033 min, Migrationszeit: 12-16 min für 70 cm Trennstrecke) ergab sich, daß ein ausreichender Umsatz der Hydroperoxide an der Wand der Reaktionskapillare möglich ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroperoxide mit dem immobilisierten Enzym konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Da die Diffusion offenbar nicht der entscheidende Parameter war, wurde im weiteren Verlauf die relative Migrationsgeschwindigkeit der Hydroperoxide zu PES und PES-Dimer ermittelt. Abbildung 3.29 zeigt eine reversed-flow MEKC-Trennung des Standardgemisches, das mit PES und PES-Dimer versetzt war. Man erkennt deutlich die Überlagerung des PES-Dimers mit den isomeren HPODE, welche die mittlere Migrationsgeschwindigkeit der untersuchten Hydroperoxide besitzen. Betrachtet man

dagegen das Migrationsverhalten unter normal-flow Bedingungen (Abbildung 3.30), so zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen PES und PES-Dimer und ebenfalls eine stark veränderte relative Migrationsgeschwindigkeit der Hydroperoxide zum PES-Dimer. Diese Änderung ist vermutlich der Grund für den starken Auflösungsverlust bei der Nachsäulenderivatisierung unter normal-flow MEKC-Bedingungen. Versuche, die Eigenmobilität des Monomers durch Variation der funktionellen Gruppen (vgl. Abbildung 3.31) und damit auch des entsprechenden Dimers zu ändern, brachten keinen nennenswerten Erfolg. So wirkten sich die

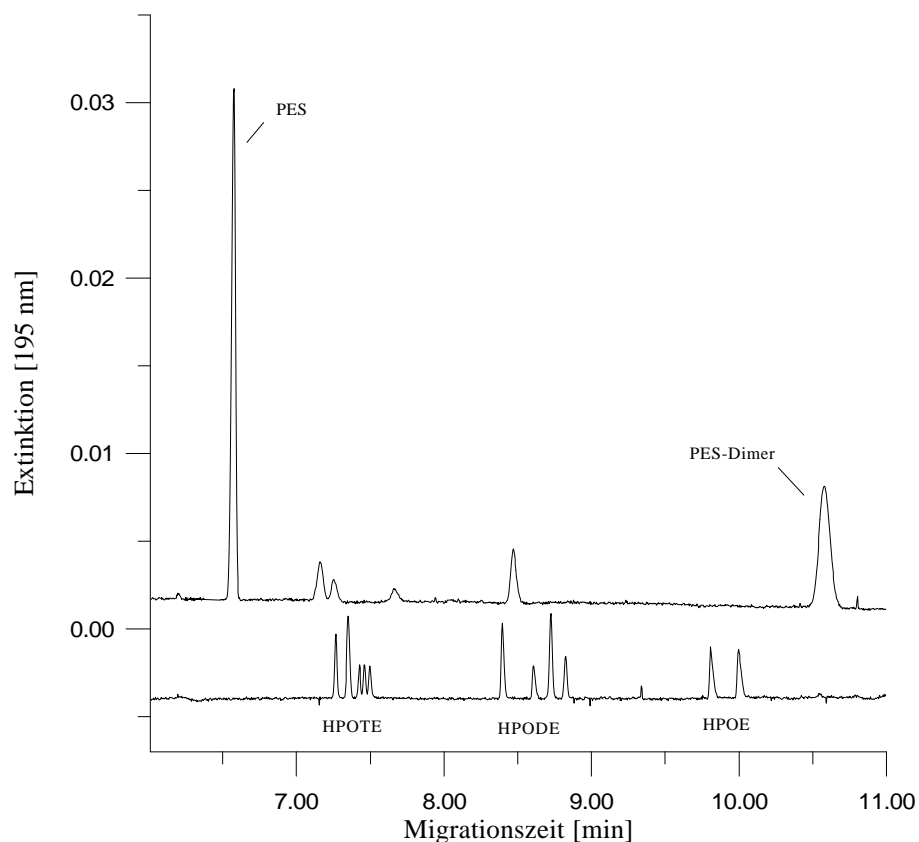


Abbildung 3.30: Selektivität des normal-flow Puffer gegenüber PES und PES-Dimer im Vergleich zu HPOE, HPODE u. HPOTE; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Detektion bei 195 nm

unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten der Monomeren nicht im gewünschten Maße auf die der Dimeren aus. Das verwendete Puffersystem zeigte zwar ausreichende Selektivität für die verwendeten PES-Analoga, verbesserte aber die Löslichkeit der gebildeten Dimeren im Elektrolyten nicht, um eine schnellere Migration zu erreichen. Diese reduzierte Selektivität ist durch die geringe

Micellenkonzentration des Puffers zu erklären, der aus diesem Grund keine gute Selektivität für stärker hydrophobe Substanzklassen zeigt. Somit ist die Eigenmobilität der verschiedenen Dimeren sehr ähnlich der des PES-Dimers. Unter den verwendeten Analoga ergab das PBS-Dimer eine sehr geringe Fluoreszenzausbeute. PES-Methylether und PES-Methylether-Methylester zeigten aufgrund der methylierten phenolischen Funktion keine Fluoreszenz. Alle anderen verwendeten PES-Analoga lieferten in erster Näherung gleiche Fluoreszenzausbeuten, jedoch keine Verbesserung der Auflösung. Die entsprechenden Elektropherogramme sind im Kapitel 5.7.4 (Anhang) abgebildet.

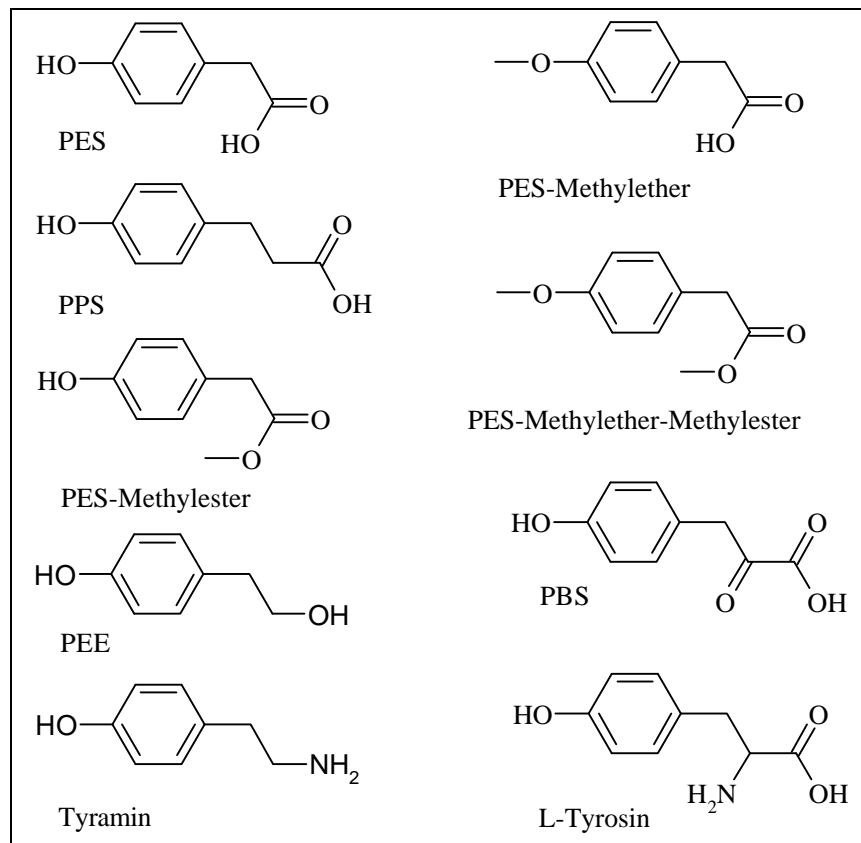


Abbildung 3.31: PES-Analoga

Die vorangegangenen praktischen Messungen wurden durch theoretische Berechnungen mit dem in Kapitel 5.1 genauer erläuterten Simulationsprogramm unterstützt. Dazu wurde ein von der Trennkapillare migrierendes Hydroperoxidpaar in Form zweier Gaußpeaks angenommen, für das eine Basislinientrennung vorlag. Mit Hilfe eines Algorithmus, der die schrittweise Vorwärtsbewegung der Peaks (Hydroperoxide: blau und grün, PES-Dimer: rot) um eine definierte Strecke

(Analogie zu einem theoretischen Boden der Trennstrecke), den Umsatz pro Boden und die Migrationsgeschwindigkeiten der Hydroperoxide und des PES-Dimer berücksichtigte, wurde der Übertritt in die Reaktionskapillare und die weitere Migration zum Detektorfenster simuliert. Abbildung 3.32 zeigt den Idealfall einer solchen Simulation mit optimal gewählten Parametern. Bei einem schnellen Umsatz von 10 % pro Boden und angenommenen gleichen Geschwindigkeiten der Hydroperoxide und des PES-Dimers kam es zu keiner sichtbaren Bandenverbreiterung.

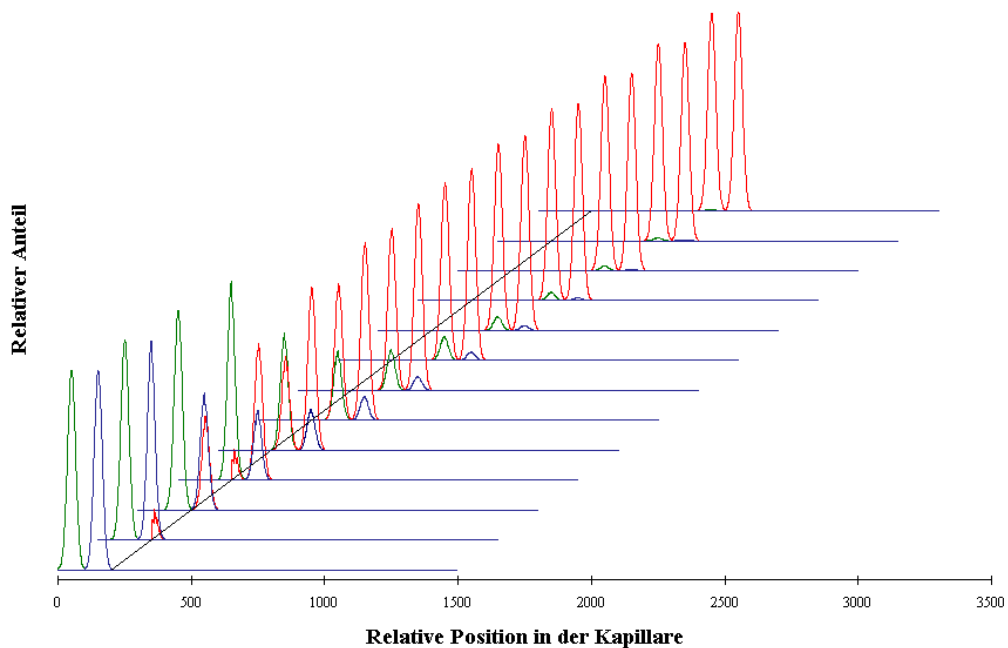


Abbildung 3.32: Simulation der Nachsäulenderivatisierung mit optimalen Parametern: 10% Umsatz pro Boden; Hydroperoxide (blau und grün) und PES-Dimer (rot) besitzen die gleiche Geschwindigkeit

Abbildung 3.33 zeigt dagegen die Simulation bei einem deutlich geringeren Umsatz von 1 % pro Boden und einer Geschwindigkeitsdifferenz zwischen Hydroperoxiden und PES-Dimer von 10 %. Zu Beginn der Simulation sind noch keine Anzeichen einer Bandenverbreiterung zu erkennen. Ab der rot eingezeichneten Linie allerdings nimmt die Auflösung der Signale deutlich ab. Vergleicht man das Ergebnis in Abbildung 3.33 mit dem einer realen Messung, bei der weder das Puffersystem noch die Immobilisierung optimiert waren, erkennt man eine gute Übereinstimmung: bei dem in Abbildung 3.23 gezeigten Elektropherogramm sind die beiden isomeren HPOE nur leicht durch die auftretende Bandenverbreiterung angetrennt. Generell kann für das neu entwickelte Nachsäulenderivatisierungssystem folgender Schluß

gezogen werden: Bei sehr schnellen Reaktionen hat die Geschwindigkeitsdifferenz der Substanzzonen keinen großen Einfluß auf die Auflösung. Liegt jedoch eine Reaktion vor, deren Umsatzrate klein ist, so beeinflusst die unterschiedliche Geschwindigkeit der Zonen maßgeblich die Trennung.

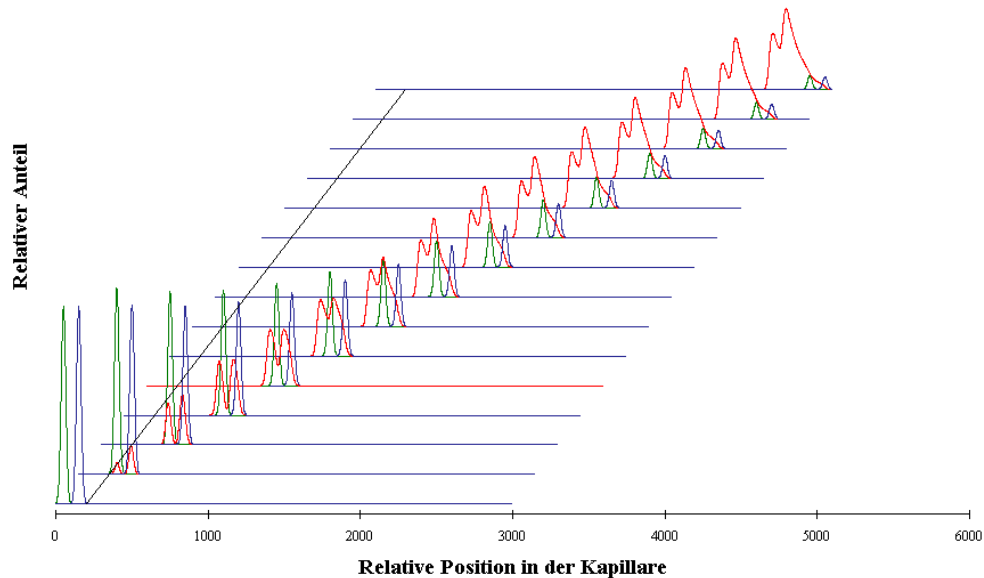


Abbildung 3.33: Simulation der Nachsäulenderivatisierung: 1 % Umsatz pro Boden und 10 % Geschwindigkeitsdifferenz der Hydroperoxide (blau und grün) und des PES-Dimers (rot)

3.1.6 Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenzen

Zur eindeutigen qualitativen und quantitativen Bestimmung sollte in der Kapillarelektrophorese aufgrund schwankender Injektionsvolumina und instabiler Migrationszeiten ein interner Standard (ISTD) verwendet werden. Neben den üblichen Anforderungen an einen internen Standard (Stabilität, hoher Response, schnelle Migration) mußte dieser aufgrund der eingesetzten Flüssig-Flüssig-Extraktionen während der Probenaufbereitung die gleichen physikalischen Eigenschaften aufweisen wie die Analyten, um eine gleiche Phasenverteilung zu gewährleisten. Besondere Probleme ergaben sich bei der reversed-flow MEKC, die durch das verwendete dynamische Coating und der starken pH-Abhängigkeit große Migrationszeit-Schwankungen aufwies. Bereits *Schmitz und Gäb* ^[188] berichteten über Schwankungen von bis zu 40 %. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die in Abschnitt 3.1.1.4 beschriebene Konditionierung der Kapillaren eine Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten von ca. 10 % erreicht werden. Nur in

Ausnahmefällen erwiesen sich Kapillarchargen als unbrauchbar. Es ergaben sich dann trotz gleicher Trennbedingungen extrem lange Migrationszeiten und starke Bandenverbreiterungen, die vermutlich auf produktionsbedingte Ablagerungen an der Innenwand zurückzuführen waren. Als geeigneter interner Standard für die reversed-flow MEKC wurde Nervonsäure (C 24:1) ermittelt.

Das normal-flow MEKC-System hingegen erwies sich als besonders robust. Hohe pH-Werte des Puffers bewirkten bei vollständig dissoziierten Silanolgruppen der Kapillaroberfläche einen stabilen EOF. Somit lag die Standardabweichung der Migrationszeiten für gleiche Kapillarchargen unterhalb 1 % und bei Verwendung verschiedener Chargen unterhalb 5 %. Die etwas höhere Standardabweichung der Peakflächen von bis zu 8 %, bei Verwendung eines externen Standards ist zum Teil auf Verdunstung der Probe im Probengefäß zurückzuführen. Die Verwendung von cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (C 22:6) als internen Standard reduzierte die Abweichung signifikant auf ca. 2 %. Zusätzlich muß bei der quantitativen Analyse berücksichtigt werden, daß die einzelnen Analytzone, anders als bei druckgetriebenen chromatographischen Systemen, mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch den Detektor strömen und daher eine Flächendiskriminierung der schnelleren Analyten gegenüber den langsameren auftritt. Aus diesem Grund erfolgte für alle Signale mittels Gerätesoftware eine Zeit- und Flächennormierung.

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde in Anlehnung an die Kalibriergeradenmethode der DIN 32645 durchgeführt^[189]. In Tabelle 3.3 sind diese für biologisch relevante Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren aufgeführt. Die Detektion der nicht oxidierten Fettsäuren erfolgte bei 195 nm. Fettsäurehydroperoxide bzw. die korrespondierenden Hydroxyfettsäuren wurden bei 195 und 234 nm erfaßt. Für konjugierte Isomere wurde erwartungsgemäß bei 234 nm eine kleinere Nachweisgrenze ermittelt.

Eine weitere Empfindlichkeitssteigerung bei der UV-Detektion wurde durch die Verwendung von Bubble-Cells erreicht. Je nach verwendeter Trenntechnik und Beschaffenheit der Detektionszellen konnte die Empfindlichkeit ohne Auflösungsverlust um den Faktor 2 bis 7 erhöht werden (vgl. Abschnitt 3.1.4.1).

Die MEKC-LIF-Methode ermöglichte zwar eine selektive Detektion der Fettsäurehydroperoxide, konnte jedoch bedingt durch die spezifische Nachsäulenderivatisierungsreaktion keine Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren erfassen. Mittels LIF-Detektion konnten die Nachweisgrenzen der nicht konjugierten

Hydroperoxide um den Faktor 10 auf 10-15 μM (3σ) gesenkt. Für die konjugierten Isomeren wurden jedoch gleiche Werte ermittelt wie bei der UV-Detektion bei 234 nm. Die Empfindlichkeit der LIF-Detektion hätte durch die Verwendung eines Puffersystems mit einem höheren pH-Wert gesteigert werden können, jedoch mußte zum Erhalt der Auflösung in der reversed-flow MEKC ein niedriger pH eingestellt werden. Auf den Einsatz der LIF-Detektion unter normal-flow Bedingungen mußte aufgrund der schlechten Auflösung verzichtet werden (vgl. Abschnitt 3.1.5.5).

Verbindung	Nachweisgrenze UV-Detektion reversed-flow [μM]		Nachweisgrenze UV-Detektion normal-flow [μM]		Nachweisgrenze LIF-Detektion reversed-flow [μM]
	195 nm	234 nm	195 nm	234 nm	
OE	80	–	25	–	–
ODE	36	–	14	–	–
OTE	36	–	8	–	–
ETE	–	–	5	–	–
HPOE / HOE	100 / –	– / –	27 / 26	– / –	10 / –
HPODE / HODE	– / –	8 / –	16 / 15	8 / 7	12 / –
HPOTE / HOTE	– / –	15 / –	9 / 9	6 / 5	15 / –
HPETE / HETE	– / –	– / –	4 / 4	7 / 7	– / –

Tabelle 3.3: Nachweisgrenzen relevanter Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren

3.2 HPLC-Methoden für Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren

3.2.1 RP-HPLC-Trennung an einer Fluoralkylphase (Fluofix)

Zur RP-HPLC-Trennung von Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxiden werden in der Regel RP-8 oder RP-18-Materialien verwendet. Als mobile Phase dienen Gemische aus Wasser und Methanol bzw. Acetonitril, welche den Gebrauch verschiedener Nachsäulenderivatisierungsreaktionen ermöglichen. Diese steigern nicht nur das Nachweisvermögen, sondern erhöhen deutlich die Selektivität der Methode. Da bisher die Isomerentrennung von Fettsäurehydroperoxiden mittels RP-HPLC nicht gelang, sollte in diesem Teil der Arbeit versucht werden, mit neuen RP-Phasen eine bessere Auflösung zu erzielen.

Die Trennung von ungesättigten Fettsäuren und deren Hydroperoxide wurde am Beispiel des oben beschriebenen Standardgemisches untersucht. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Die Durchführung erfolgte mit einem Waters-Alliance-HPLC-System. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus 0.1 % Phosphorsäure und Acetonitril verwendet. Als stationäre Phase wurde ein neu entwickeltes Säulenmaterial benutzt. Dieses Material besteht aus hochreinem Silicagel, das mit fluorierten Alkylketten modifiziert ist. Die sogenannte Fluofix-Säule der Firma NEOS zeichnet sich durch unterschiedliche Affinität zu Molekülen mit planarem oder räumlichem Aufbau aus (sterische Trennung) und besitzt hohe Stabilität im Bereich von pH 2-7 ^[190]. Zur Optimierung der Trennparameter erfolgte die Detektion mit einem UV-Detektor bei 195 und 234 nm. Um eine spätere Verwendung von Nachsäulenderivatisierungstechniken (Fluoreszenz- und Chemilumineszenzdetektion) zu ermöglichen, wurde die Trennung der ungesättigten Fettsäuren und deren Hydroperoxide zunächst bei isokratischer Elution mit ACN und 0.1 %-iger Phosphorsäure durchgeführt. Nach optimierter Laufmittelzusammensetzung von ACN/0.1 %-iger H₃PO₄ = 60:40 (v/v) wurde die in Abbildung 3.34 gezeigte Trennung der Fettsäuren und der Fettsäurehydroperoxide als Gruppen bei 40 °C innerhalb von 16 min erreicht. Erwartungsgemäß wurden die weniger polaren Fettsäuren nach den Hydroperoxiden eluiert. Eine Antrennung der Hydroperoxidisomeren gelang unter isokratischen Bedingungen nur bei deutlicher

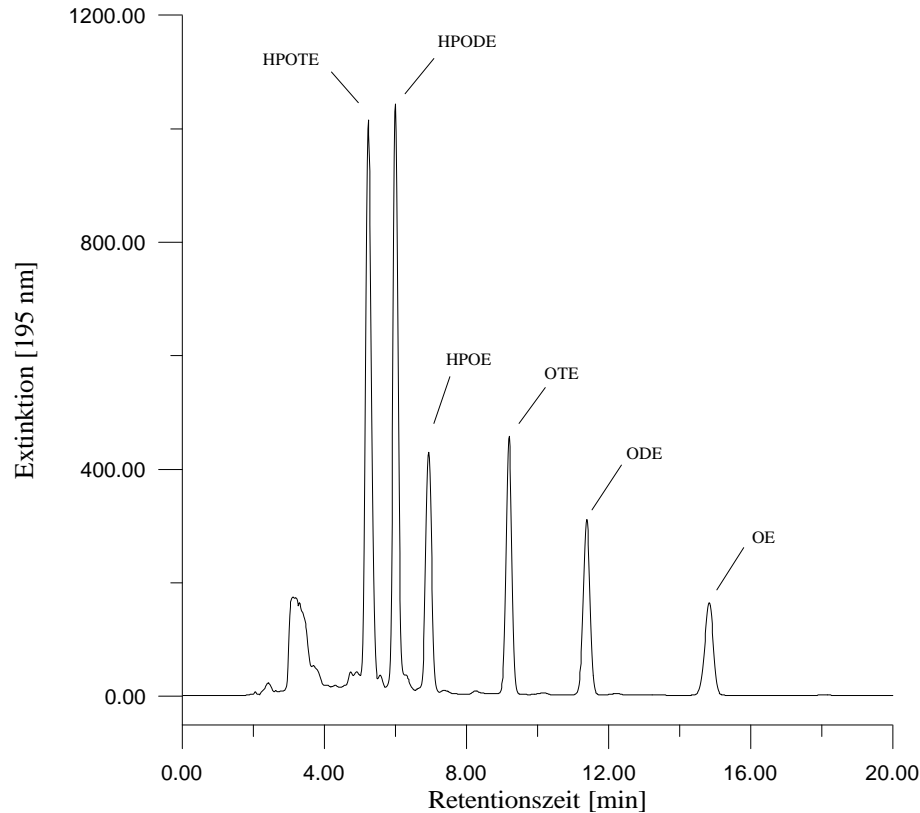


Abbildung 3.34: Isokratische HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl- (OE; 0.25 mM), Linol- (ODE; 0.15 mM) und Linolensäure (OTE; 0.13 mM) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide aus Öl- (HPOE; 0.5 mM), Linol- (HPODE; 0.9 mM) und Linolensäure (HPOTE; 0.7 mM) an einer Fluofix-Säule; Eluent ACN/0.1 %-ige H₃PO₄ = 60:40 (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm

Reduzierung des ACN-Anteils im Eluenten. Bei einer Laufmittelzusammensetzung von unter 40 % ACN konnte erstmals die Trennung der HPOTE-Isomeren beobachtet werden. Allerdings verlängerte sich die Elution der lipophileren Analyten bei gleichzeitig einsetzender Bandenverbreiterung auf über 70 min, so daß die detektierten Signale der Fettsäuren schlecht zu erfassen waren. Ein weiteres Problem resultierte aus der in biologischen Proben enthaltenen stark lipophilen Bestandteilen, welche unter den oben beschriebenen Bedingungen nicht mehr von der Säule eluiert wurden. Zur Lösung dieser Probleme ergaben sich zwei mögliche Ansätze: die Verwendung eines Stufen-Gradienten nach Elution der angetrennten Fettsäurehydroperoxidisomeren, welcher nur die teilweise Bestimmung der Lipidkomponenten ermöglicht bzw. eines linearen Gradienten zur Erfassung aller relevanten Verbindungen. Der Einsatz eines Stufen-Gradienten erwies sich aufgrund der langen Analysenzeiten und Konditionierung als sehr zeitaufwendig, ermöglichte jedoch die Verwendung von Nachsäulenderivatisierungstechniken. Dagegen ließ sich mit einem

linearen Gradienten die Analysenzeit auf ca. 45 min verkürzen (Abbildung 3.35). Die Elution erfolgte zunächst isokratisch bei einer Laufmittelzusammensetzung von ACN/0.1 %-iger $\text{H}_3\text{PO}_4 = 30:70$ (v/v), nach 5 min wurde der ACN-Anteil innerhalb von 60 min auf 100 % erhöht. Der Fluß betrug 1 ml/min. Im Chromatogramm ist die Trennung von vier der sechs möglichen HPOTE- und der beiden HPOE-Isomeren zu erkennen. Durch den erhöhten ACN-Anteil erscheinen die Fettsäuren als schlanke Peaks. Eine Trennung der HPODE-Isomeren gelang zu keiner Zeit.

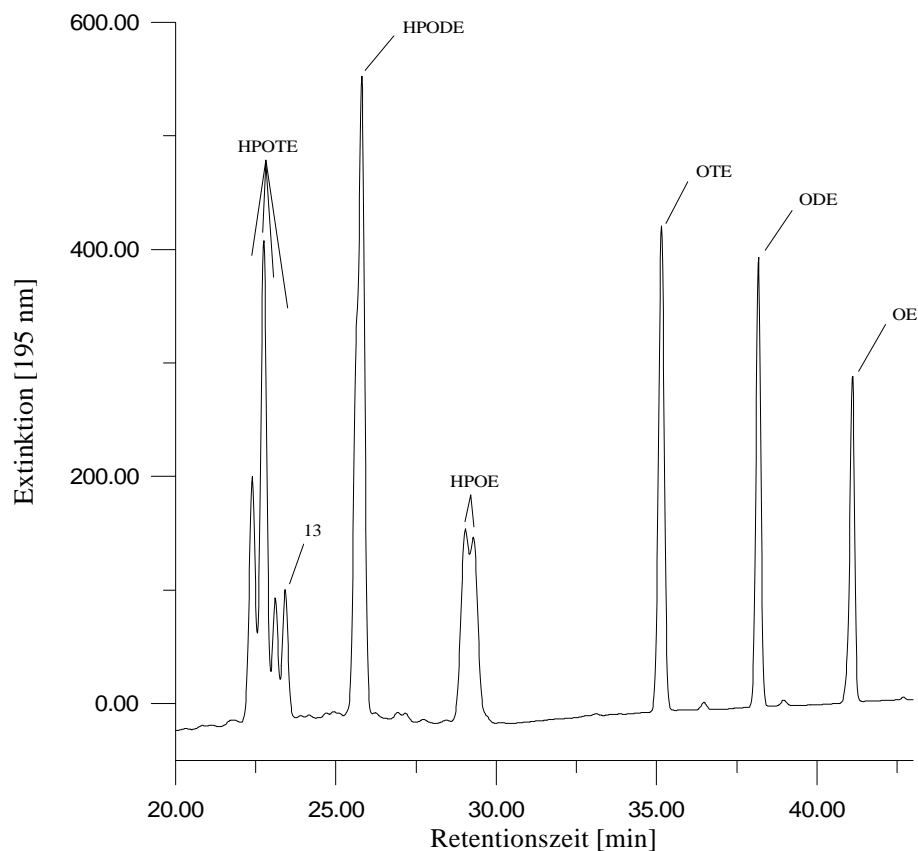


Abbildung 3.35: Gradienten-HPLC-Trennung des Standardgemisches an einer Fluofix-Säule; Eluent 70 % 0.1 % H_3PO_4 und 30 % ACN (v/v), 5 min isokratisch, in 60 min auf 100 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm

3.2.1.1 Optimierung der Gradientenelution

Das in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Gradientensystem sollte nun zur Bestimmung von Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxiden und korrespondierenden Hydroxyfettsäuren eingesetzt werden. Nach Optimierung des Gradienten durch Verlängerung des isokratischen Anteils auf 10 min mit ACN/0.1 %-iger $\text{H}_3\text{PO}_4 = 30:70$ (v/v) konnte das in Abbildung 3.36 gezeigte Chromatogramm erhalten werden. Für die sechs

Hydroxyfettsäuren der Linolensäure (HOTE) lassen sich vier Peaks beobachten, die deutlich von den vier Signalen der korrespondierenden Hydroperoxide (HPOTE) separiert sind. Die HPOTE-Signalgruppe wird durch den Peak der nicht getrennten Hydroxyfettsäuren der Linolsäure (HODE) überlagert. Sowohl für die Isomeren von

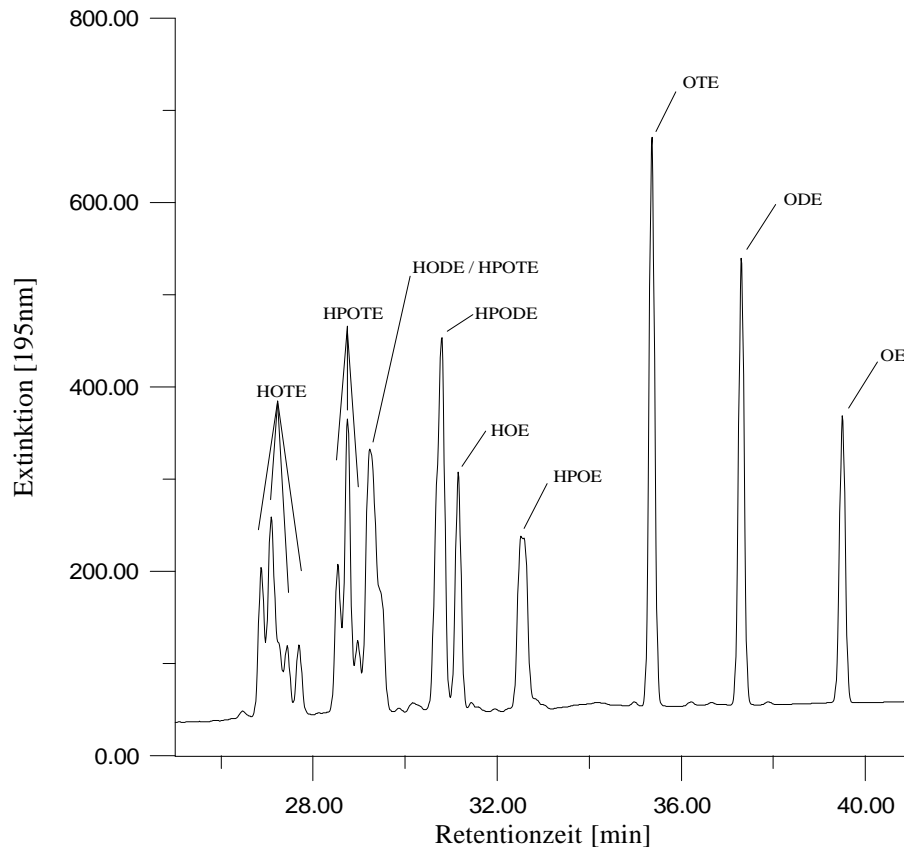


Abbildung 3.36: Gradienten-HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl- (OE; 0.25 mM), Linol- (ODE; 0.15 mM) und Linolensäure (OTE; 0.13 mM) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide aus Öl- (HPOE; 0.5 mM), Linol- (HPODE; 0.9 mM) und Linolensäure (HPOTE; 0.7 mM) sowie der durch Reduktion mit Natriumborhydrid gebildeten korrespondierenden Hydroxyfettsäuren der Öl- (HOE; 0.5 mM), Linol- (HODE; 0.9 mM) und Linolensäure (HOTE; 0.7 mM) an einer Fluofix-Säule; Eluent 70 % 0.1 % H_3PO_4 und 30 % ACN (v/v), 10 min isokratisch, in 60 min auf 100 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm

HOE als auch von HPODE konnte keine Trennung erzielt werden. Die in Abbildung 3.35 gezeigte Antrennung der HPOE-Isomeren geht aufgrund von Bandenverbreiterungseffekten verloren. Abbildung 3.37 zeigt die isokratische Trennung des gleichen Standardgemisches bei einer Eluentenzusammensetzung von 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN. Unter diesen Bedingungen läßt sich die Gruppentrennung der Fettsäurehydroperoxide und der Hydroxyfettsäuren in

ca. 11 min durchführen. Die Elution der entsprechenden Fettsäuren erfolgt zwischen 14 und 25 min. Die hier gezeigten simultanen Trennungen von ungesättigten Fettsäuren, den entsprechenden Hydroperoxiden und Hydroxyfettsäuren sind in dieser oder in analoger Weise mit HPLC- oder GC-Methoden bisher noch nicht beschrieben worden. Lediglich die in dieser Arbeit entwickelten MEKC-Methoden übertreffen in Auflösung und Analysenzeit die oben beschriebenen Ergebnisse. Ein Nachteil der MEKC liegt jedoch in der geringeren Nachweisgrenze und geringerer Robustheit des Analysensystems.

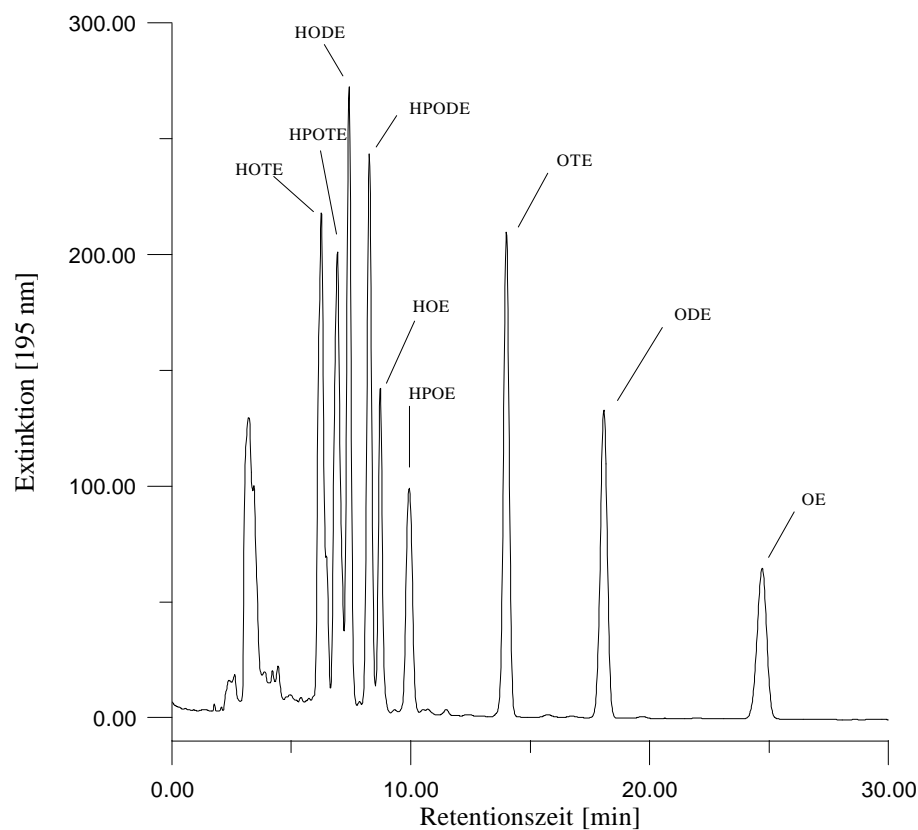


Abbildung 3.37: Isokratische HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide sowie der durch Reduktion mit Natriumborhydrid gebildeten korrespondierenden Hydroxyfettsäuren an einer Fluofix-Säule; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195nm

3.2.2 Fast HPLC-Trennung an einer RP-18-Phase

Ziel der modernen HPLC ist die Reduzierung der Analysenzeiten. Durch den Einsatz nichtporöser und monodisperser Phasen mit kleinem Partikeldurchmesser konnten die Analysenzeiten konventioneller Säulen auf ein Fünftel reduziert werden

(fast HPLC) ^[191, 192, 193]. Der Vorteil nichtporöser Phasen liegt zum einen in der Reduzierung des Totvolumens auf die Hälfte, was theoretisch zu einer Halbierung der Analysenzeiten führt, und zum anderen in der nicht mehr möglichen Diffusion der Analytmoleküle in die Poren der Partikel (schnellerer Massentransfer).

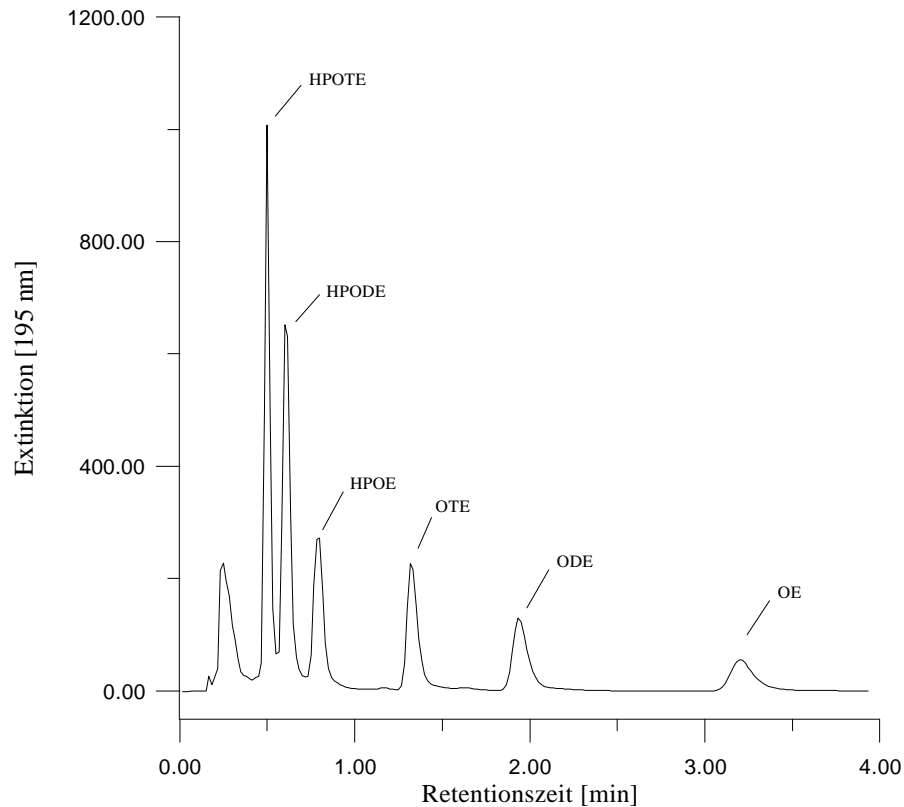


Abbildung 3.38: Fast HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide an einer Rocket-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 42 % 0.1 % H_3PO_4 und 58 % ACN (v/v); Fluß 5 ml/min; Detektion bei 195 nm

Da der Druckabfall indirekt proportional zum Quadrat des Teilchendurchmessers ist und dieser durch die kleinsten Partikel bestimmt wird ^[193], sind Säulenmaterialien mit einer relativ breiten Korngrößenverteilung nicht geeignet. Monodisperse Phasen ermöglichen hohe Flußraten unter üblichen Drücken. Ein weiterer Vorteil ist der nur sehr flache Anstieg der H/u-Kurve (van-Deemter-Kurve) nach Durchlaufen des Minimums, so daß bei hohen Flußraten die Auflösung kaum reduziert wird. Die fast HPLC-Trennung der Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxide erfolgte an einer von der Firma Alltech entwickelten Säule mit einer Länge von 33 mm und einem Durchmesser von 7 mm. Diese Säule, die unter dem Namen Rocket-Säule vertrieben wird, enthält RP-18 Teilchen mit 3 μm Durchmesser und erlaubt Flußraten von bis

zu 5 ml/min. Abbildung 3.38 zeigt die isokratische Trennung des Standardgemisches (Zusammensetzung siehe oben) an einer solchen Rocket-Säule in ca. 3.5 min. Die um den Faktor 7.5 gegenüber der Fluofix-Säule schnellere Trennung zeigte wegen des zu geringen ACN-Anteils für die Signale der lipophileren Fettsäuren keine zufriedenstellenden Effizienzen. Aus diesem Grunde wurde eine

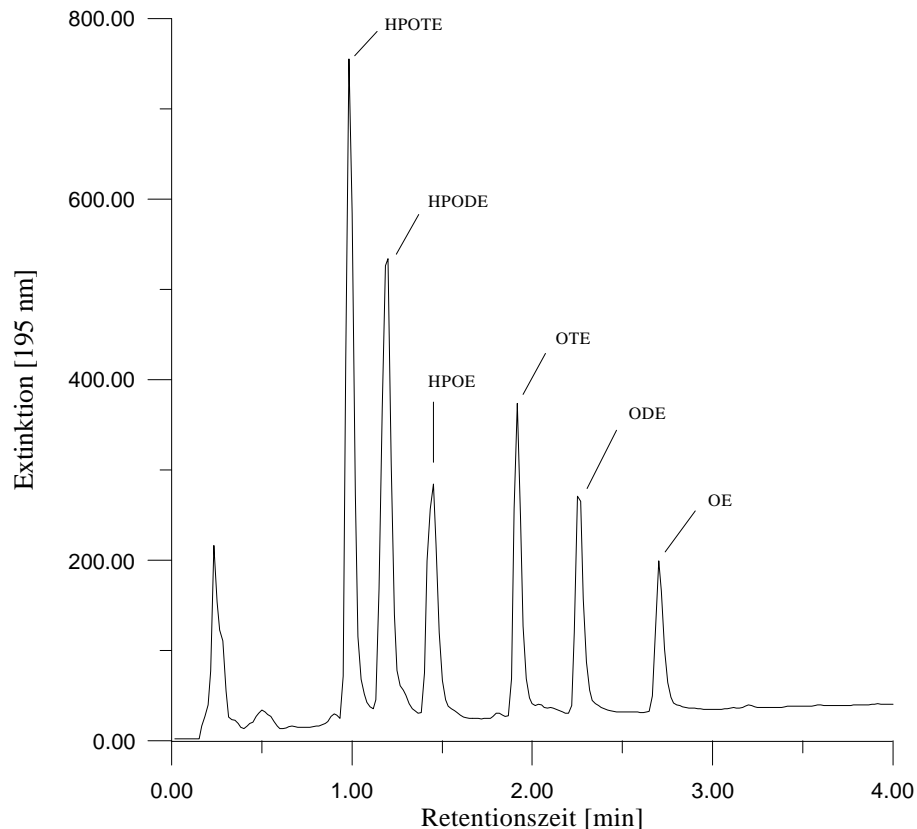


Abbildung 3.39: Fast HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide an einer Rocket-Säule bei Gradientenelution; Eluent 55 % 0.1 % H_3PO_4 und 45 % ACN (v/v) auf 100 % ACN (v/v) in 5 min; Fluß 5 ml/min; Detektion bei 195 nm

Gradientenelution durchgeführt, bei der der ACN-Anteil im Laufmittel (ACN/0.1 %-iger H_3PO_4 = 45:55 (v/v)) in 5 min auf 100 % gesteigert wurde. Der Fluß betrug dabei 5 ml/min. Die Rekonditionierung der Säule war durch Rückstellung der Eluentenzusammensetzung auf den Ausgangswert in 1 min möglich. Abbildung 3.39 zeigt das unter diesen Bedingungen erhaltene Chromatogramm des bekannten Standardgemisches in weniger als 3 min. Dies entspricht einer ca. 10-fach schnelleren Analyse im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Trennungen. Die simultane Trennung von Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxiden und Hydroxyfettsäuren, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, gelang mit

dieser Säule nicht. Somit beschränkte sich die Verwendung der fast HPLC-Technik auf die Reaktionskontrolle bei der Synthese der Referenzsubstanzen bzw. auf die Analyse einfacher oxidiertes Öle, die keinem weiteren Abbau unterlagen.

3.2.3 Fluoreszenzdetektion

Die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen reversed-phase Trennungen der Fettsäurehydroperoxide sollten im weiteren Verlauf mit der von *Heinmöller* ^[122] bereits erfolgreich für pflanzliche Proben eingesetzten Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion gekoppelt werden, um die Selektivität und Empfindlichkeit der Methoden zu erhöhen. Erste Vorversuche, in denen die Derivatisierungsreaktion an den Eluenten angepaßt wurde, waren in Bezug auf die Nachweisgrenze vielversprechend (vgl. Kapitel 3.2.5). Doch zeigte sich nach Injektion biologischer Proben (z.B. extrahierte Serumlipide) eine Überlagerung der Hydroperoxide und Matrixkomponenten mit einer Eigenfluoreszenz. Hierdurch war eine eindeutige Identifizierung und Gehaltsbestimmung der Hydroperoxide nicht möglich.

3.2.4 Chemilumineszenzdetektion

Um die in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Probleme zu lösen, wurde in Anlehnung an *Yasuda und Narita* ^[194] ein Isoluminol/MP11-Nachsäulenderivatisierungssystem in Verbindung mit der Chemilumineszenzdetektion eingesetzt. Nach Optimierung aller wichtigen Parameter bestand die Reagenzlösung aus 150 ml 50 mM Boraxpuffer (mit NaOH-Plätzchen auf pH 10.3 eingestellt), 100 ml Methanol, 3 mg MP-11 und 7 mg Isoluminol. Vor Verwendung wurde die Lösung 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um eine konstante Chemilumineszenz und ein geringes Basislinienrauschen zu gewährleisten. Nach dieser Zeit konnte die Reagenzlösung ohne Verlust an Reaktivität für mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur Nachsäulenderivatisierung wurde ein Zwei-Pumpen-System verwendet, dessen Eluenten- und Reagenzflüsse jeweils 1 ml/min betragen. Die Flüsse wurden über ein T-Stück unmittelbar vor dem Detektor zusammengeführt. Die entwickelten Gradienten-Methoden zur Trennung der Lipidhydroperoxide konnten aufgrund der sich ändernden Eluentenzusammensetzung nicht angewendet werden.

3.2.5 Nachweisgrenzen

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte in Anlehnung an die DIN 32645 ^[189]. Die dazu notwendigen Kalibrierfunktionen befinden sich im Anhang (Kapitel 5.7.3). Als universelle Bestimmungsmethode für konjugierte Fettsäurehydroperoxide eignet sich die UV-Detektion bei 234 nm, für ungesättigte Fettsäuren und nicht konjugierte Fettsäurehydroperoxide muß die Detektion bei 195 nm durchgeführt werden. Die Nachweisgrenzen der Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide, die durch UV-Detektion bei 195 nm und unter Verwendung einer Fluofix-Säule bestimmt wurden, sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Fettsäure / Fettsäurehydroperoxid	Nachweisgrenze [µM]
OE	0.92
ODE	0.25
OTE	0.15
HPOE	0.60
HPODE	0.81
HPOTE	0.74

Tabelle 3.4: Nachweisgrenzen der Öl-, Linol- und Linolensäure sowie deren Hydroperoxide; Trennung an einer Fluofix-Säule; UV-Detektion bei 195 nm

Die zur Reduzierung der Analysenzeiten eingesetzte Rocket-Säule der Firma Alltech zeigte für die lipophileren Analyten OE, ODE und OTE geringfügig schlechtere Nachweisgrenzen (Tabelle 3.5). Dagegen konnte die Empfindlichkeit des Detektionssystems gegenüber den Hydroperoxiden HPOE, HPODE und HPOTE leicht verbessert werden. Die Nachweisgrenzen bei isokratischer Trennung waren für die Fettsäuren wesentlich schlechter. Dies war auf die Peakbreite zurückzuführen, die mit steigender Retardation stark zunahm. Die Nachweisgrenzen der konjugierten Isomeren lagen im Regelfall um den Faktor 2-3 niedriger, da bei 234 nm das Signal-Rauschverhältnis deutlich geringer war als bei 195 nm. Durch die geringe Selektivität der UV-Detektion erwies sich die Messung von Realproben als sehr schwierig. Aufgrund zahlreicher UV-aktiver Probenbestandteile kam es häufig zu recht komplexen Chromatogrammen. Abhilfe schuf hier die Verwendung eines für

Fettsäure / Fettsäurehydroperoxid	Nachweisgrenze [μM]	
	Gradient	Isokratisch
OE	2.2	8.5
ODE	3.7	6.2
OTE	2.3	3.1
HPOE	0.91	0.95
HPODE	0.48	0.44
HPOTE	0.28	0.24

Tabelle 3.5: Nachweisgrenzen der Öl-, Linol- und Linolensäure sowie deren Hydroperoxide; Trennung an einer Rocket-Säule bei Gradientenelution; UV-Detektion bei 195 nm

Hydroperoxide selektiven und empfindlicheren Chemilumineszenzdetektions-Systems. Tabelle 3.6 zeigt die Nachweisgrenzen der Hydroperoxide HPOE, HPODE und HPOTE. In diesem Falle erfolgte die Bestimmung der Fettsäuren simultan mittels vorgeschalteter UV-Detektion.

Fettsäurehydroperoxid	Nachweisgrenze [nM]
HPOE	110
HPODE	140
HPOTE	188

Tabelle 3.6: Nachweisgrenzen der Hydroperoxide aus Öl-, Linol- und Linolensäure; Trennung an einer Fluofix-Säule; Chemilumineszenzdetektion

Die Nachweisgrenzen der Fettsäurehydroperoxide bei Fluoreszenzdetektion wurden nach dem 3σ -Konzept bestimmt (Tabelle 3.7).

Fettsäurehydroperoxid	Nachweisgrenze [μM]
HPOE	0.55
HPODE	0.28
HPOTE	0.18

Tabelle 3.7: Nachweisgrenzen der Hydroperoxide aus Öl-, Linol- und Linolensäure; Trennung an einer Fluofix-Säule; Fluoreszenzdetektion

3.3 Hydrolyse von nichtoxidierten und oxidierten Lipiden

Um eine aussagekräftige Analytik auf der Stufe der Fettsäuren durchführen zu können, mußten die in biologischem Probenmaterial enthaltenen oxidierten und nichtoxidierte Phospholipide und Triglyceride hydrolysiert werden.

3.3.1 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Spaltung von Phospholipiden und Triglyceriden stellt eine der elegantesten und mildesten Möglichkeiten zur Hydrolyse von Lipiden dar. Durch den Einsatz von verschiedenen Lipasen können beide Lipidklassen nebeneinander hydrolysiert und die dabei freigesetzten Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren selektiv bestimmt werden. Die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse einer nichtoxidierten Lipid-Standardlösung mit verschiedenen Lipasen erfolgte in Anlehnung an die Literatur ^[144, 199, 195]. Für eine spätere einfache Routine wurden die Methoden im Mikromaßstab optimiert. Zur Bestimmung der Reaktivität der verschiedenen Lipasen wurde eine Reaktionsmischung, bestehend aus Enzym, ca. 500 nmol Phospholipid bzw. Triglycerid (z.B. 1 ml einer 500 µM methanolischen Standardlösung, vgl. Abschnitt 2.6 und 2.7), 200 µl 0.4 M Glycylglycinpuffer pH 7.5 und 20 mM CaCl₂, eingesetzt. CaCl₂ hat hierbei die Aufgabe der Enzymaktivierung, da viele Lipasen und Phosphatasen bei der Umsetzung auf die Anwesenheit von Metallkationen wie Mg²⁺ oder Ca²⁺ angewiesen sind ^[83, 85- 88]. Um eine vollständige Umsetzung zu erreichen, wurde mit Enzymüberschuß gearbeitet. Nach Beendigung der Reaktion wurde die wäßrige Phase mit Chloroform extrahiert und die freigesetzte Ölsäure mit Hilfe der in 3.1 und 3.2 beschriebenen MEKC- und HPLC-Methoden quantifiziert. Als interner Standard wurde Linolensäure verwendet, da diese aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften ein vergleichbares Extraktionsverhalten wie die freigesetzte Ölsäure aufweist. Die Lipasen SAM II, Lipozym, LPL, SP 525 und die Lipasen aus *Aspergillus niger* und *mucor javanicus* (Herkunft vgl. Chemikalienliste) besaßen im Glycylglycinpuffer für die Hydrolyse von Phosphatidylglyceriden eine gute Aktivität. Die Wiederfindung in Bezug auf den internen Standard (ISTD) lag im Bereich von 88 % bis 106 %. Die absolute Wiederfindung (ESTD) betrug jedoch nur 22 % bis 65 % (Tabelle 3.8). Hierbei hob sich das Enzym SP 525 mit einer Wiederfindung von ca. 65 % deutlich von den anderen Enzymen ab. SP 525 ist eine

Triacylglycerol-Hydrolase (EC 3.1.1.3), welche im organischen Medium auch als Carboxylesterase eine Veresterung von Glycerin bewirkt. Die Positionsspezifität des Enzyms ist von den eingesetzten Reaktanden abhängig^[196,197]. So zeigt es für einige Reaktionen eine 1,3-Positionsspezifität, während in anderen die Lipase unspezifisch reagiert. Die optimale Reaktionstemperatur für SP 525 liegt bei 37 °C^[199]. Das Enzym ist im pH-Bereich von 3.5 bis 9.5 aktiv, das Optimum liegt bei pH 7.5^[199]. Als optimale Enzymkonzentration konnten 0.4 mg SP 525 in 200 µl Glycylglycinpuffer ermittelt werden^[199].

Enzym	DOPC		OETG	
	Wiederfindung von OE mit ISTD [%]	Wiederfindung von OE mit ESTD [%]	Wiederfindung von OE mit ISTD [%]	Wiederfindung von OE mit ESTD [%]
SAM II	92	28	94	14
Lipozym	89	32	129	63
SP 525 (Novozym)	102	85	41	35
LPL	86	28	93	75
Lipase <i>hog pancreas</i>	77	19	104	64
Lipase <i>Aspergillus niger</i>	105	23	62	50
Lipase <i>penicillum roqueforte</i>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Lipase <i>candida lipolytica</i>	n. n.	n. n.	33	28
Lipase <i>mucor javanicus</i>	24	37	82	76
PPL	57	39	68	65
Boehringer Enzymmischung	–	–	89	75

- nicht durchgeführt, n.n. nicht nachgewiesen

Tabelle 3.8: Wiederfindung von Ölsäure (OE) bei enzymatischer Hydrolyse von Dioleilphosphatidylcholin (DOPC) und Triolein (OETG) unter Verwendung von ISTD und ESTD

Um die literaturbekannte Standardmethode zur enzymatischen Hydrolyse der Triglyceride^[144,195] in den Mikromaßstab zu überführen, wurden dieselben Reaktionsbedingungen und Konzentrationen wie zuvor gewählt. Dabei zeigten die Enzymmischung der Firma Boehringer sowie die Lipoproteinlipase (LPL) der Firma Amano die besten Aktivitäten und Wiederfindungsraten. Von den Enzymsuspensionen der Firma Boehringer wurden 50 µl Esterase und 10 µl Lipase in 200 µl Glycylglycinpuffer verwendet, LPL wurde in einer Konzentration von 0.5 mg in 200 µl Glycylglycinpuffer eingesetzt. Mikro- und Standardmethode zeigten im

Vergleich mit einer früheren Arbeit ^[144] übereinstimmende Wiederfindungsraten. Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob durch die Enzyme auch die oxidierten Fettsäuren von Phospholipiden und Triglyceriden abgespalten werden. Dazu wurden in dieser Arbeit synthetisierte Hydroperoxidstandards analog zur enzymatischen Hydrolyse von DOPC und OETG untersucht. Die Ergebnisse für Dioleylphosphatidylcholinhydroperoxid (HPDOPC) sind in der Tabelle 3.9 dargestellt. Bei der enzymatischen Hydrolyse wurde neben den Hydroperoxiden der Ölsäure (HPOE) auch nichtoxidierte Ölsäure (OE) nachgewiesen, welche die nicht ganz vollständige Reinheit des Standards anzeigt. Die im Standard enthaltenen Hydroxyfettsäuren (HOE) können bei der Synthese und Lagerung entstanden sein ^[198].

Wiederfindung von HPOE mit ISTD [%]	Wiederfindung von HOE mit ISTD [%]	Wiederfindung von OE mit ISTD [%]	Summe von OE, HPOE und HOE mit ISTD [%]
76.9	10.4	7.8	95.1
80.3	10.7	8.1	99.1
77.9	10.4	7.8	96.1
83.1	10.6	8.1	101.8
78.7	10.5	7.9	97.1
79.4 ± 2.4	10.5 ± 0.12	7.9 ± 0.1	97.8 ± 2.6

Tabelle 3.9: Enzymatische Hydrolyse des synthetisierten HPDOPC mit dem Enzym SP 525 in 0.4 M Glycylglycinpuffer

Die enzymatische Hydrolyse der Hydroperoxide des Trioleins (HPOETG) ergab mit der Enzymmischung der Firma Boehringer und mit der LPL der Firma Amano übereinstimmende Ergebnisse (92.1 ± 2.9 % HPOE und 8.0 ± 0.2 % OE). Hier konnte im Gegensatz zum HPDOPC-Standard die Bildung von Hydroxyfettsäuren nicht festgestellt werden.

3.3.2 Alkalische Hydrolyse

Die erfolgreiche Umesterung von Triglyceriden und Phosphatidylcholinen sowie deren Oxidationsprodukten mit Natriummethylat wurde bereits in der Literatur beschrieben ^[131, 199]. Als Vergleichsmethode zur enzymatischen Umsetzung der Phosphatidylcholine und deren Oxidationsprodukten ^[199] wurde in dieser Arbeit die Hydrolyse mit Natronlauge untersucht. Die bei der Reaktion entstehenden freien

Fettsäuren sowie Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren konnten mit den oben beschriebenen MEKC- und HPLC- Systemen gut getrennt werden.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde der synthetisierte HPDOPC-Standard eingesetzt. Mit diesem wurde das Verhältnis von 1N Natronlauge und Methanol ermittelt, welches zur maximalen Bildung der freien Fettsäuren und deren Oxidationsprodukten erforderlich war. Hierzu wurden 10-500 µl der 1:10 verdünnten Standardlösung (13 mg Lipid / 10 ml Methanol) mit 500 µl Methanol und 500 µl einer 1N Natronlauge versetzt und 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Probe wurde anschließend mit 50 µl Ameisensäure angesäuert und direkt mittels HPLC untersucht.

	OE [%]	HPOE [%]	HOE [%]
DOPC	102.3 ± 1.7	-	-
HPDOPC	8.9 ± 0.1	81.1 ± 1.1	10.0 ± 1.2

Tabelle 3.10: Wiederfindung in % bei der Hydrolyse von DOPC und HPDOPC mit 1N Natronlauge

Die Hydrolyse der DOPC- und HPDOPC-Standardlösungen mit 1N Natronlauge verliefen annähernd quantitativ. Anhand der Ergebnisse (Tabelle 3.10) ließ sich feststellen, daß ca. 9 % der Ölsäure, die am Phosphatidylcholin gebunden war, trotz einer Bestrahlungsdauer von 120 Stunden nicht oxidiert wurde. Desweiteren konnten 10 % Hydroxyfettsäuren ermittelt werden, die vermutlich durch intramolekulare Reaktion entstanden sind.

3.3.3 Vergleich der alkalischen und enzymatischen Hydrolyse von HPDOPC

Die Konzentrationen der bisher untersuchten Standardlösungen der Lipide lagen oberhalb der in den Realproben vorkommenden. Deshalb wurde sowohl die enzymatische als auch die alkalische Hydrolyse im Konzentrationsbereich unterhalb 500 µM überprüft. Dabei zeigte sich bei der enzymatischen Hydrolyse eine enzymbedingte Reduktion der Fettsäurehydroperoxide zu den korrespondierenden Hydroxyfettsäuren. Im Konzentrationsbereich oberhalb 500 µM beträgt dieser Anteil ca. 10 % bezogen auf den Hydroperoxidgehalt der Probe und ist somit zu vernachlässigen. Dagegen werden bei kleineren Konzentrationen (bis ca. 100 µM

HPDOPC) unabhängig von der HPDOPC-Konzentration annähernd konstant ca. 40 μM Hydroxyfettsäure gebildet (Tabelle 3.11). Dies entspricht bis zu 40 % des

Konzentration HPOE in HPDOPC [μM]	Wiederfindung von HPOE mit ESTD [μM]	Wiederfindung von HPOE mit ESTD [%]	Wiederfindung von HOE mit ESTD [μM]	Wiederfindung von HOE mit ESTD [%] ^{a)}
26	5	18	16	494
53	34	64	17	261
105	62	59	38	288
132	85	64	38	235
158	114	72	35	181
211	151	72	38	145
264	211	80	47	144
527	364	69	83	127
1318	824	63	150	92

a) HOE-Anteil im HPDOPC-Standard ca. 10 %

Tabelle 3.11: Freisetzung von HPOE und HOE bei der enzymatischen Hydrolyse von HPDOPC mit SP 525

freigesetzten Hydroperoxids. Im Bereich zwischen 20 und 50 μM beträgt der Abbau des eingesetzten Hydroperoxids bereits bis zu 60 %. Die mittels HPLC- und UV-Detektion bestimmten Wiederfindungen konnten bei Anwendung der Chemilumineszenzdetektion bestätigt werden. Die konstante Bildung der

Konzentration HPOE in HPDOPC [μM]	Wiederfindung von HPOE mit ESTD [μM]	Wiederfindung von HPOE mit ESTD [%]	Wiederfindung von HOE mit ESTD [μM]	Wiederfindung von HOE mit ESTD [%] ^{a)}
26	29	112	5	163
53	57	108	8	132
105	115	108	15	119
132	143	108	18	112
158	161	102	22	110
211	228	108	29	110
264	301	114	38	116
527	550	104	75	115
1318	1285	79	213	131

a) HOE-Anteil im HPDOPC-Standard ca. 10 %

Tabelle 3.12: Freisetzung von HPOE und HOE bei der alkalischen Hydrolyse von HPDOPC mit Natronlauge

Hydroxyfettsäuren bei unterschiedlichen Hydroperoxidkonzentrationen läßt sich durch ein geringes Reduktionspotential der Lipasen erklären. Somit ist die Verwendung der enzymatischen Hydrolyse nur für Fettsäurehydroperoxidkonzentrationen oberhalb von 500 μM zu empfehlen. Vergleicht man dagegen die in Tabelle 3.12 zusammengefaßten Ergebnisse der alkalischen Hydrolyse von HPDOPC, so läßt sich für HPOE über den gesamten Konzentrationsbereich eine gleichmäßige Wiederfindung von etwas mehr als 100 % (ESTD) feststellen. Mit der Annahme, daß der HOE-Anteil im HPDOPC-Standard ca. 10 % beträgt, ergibt sich für HOE über einen großen Konzentrationsbereich eine Wiederfindung von 110 bis 120 % (ESTD). In Abbildung 3.40 sind die aus dem HPDOPC-Standard mit den beiden Methoden freigesetzten Hydroperoxide gegeneinander aufgetragen. Man erkennt eine höhere Wiederfindung mit ESTD bei der alkalischen Hydrolyse, da hier keine Fettsäuren auf der Enzymoberfläche oder in der Interphase verbleiben können. Die Wiederfindung mit ISTD liegt sowohl für die enzymatische als auch für die alkalische Hydrolyse bei annähernd 100 %.

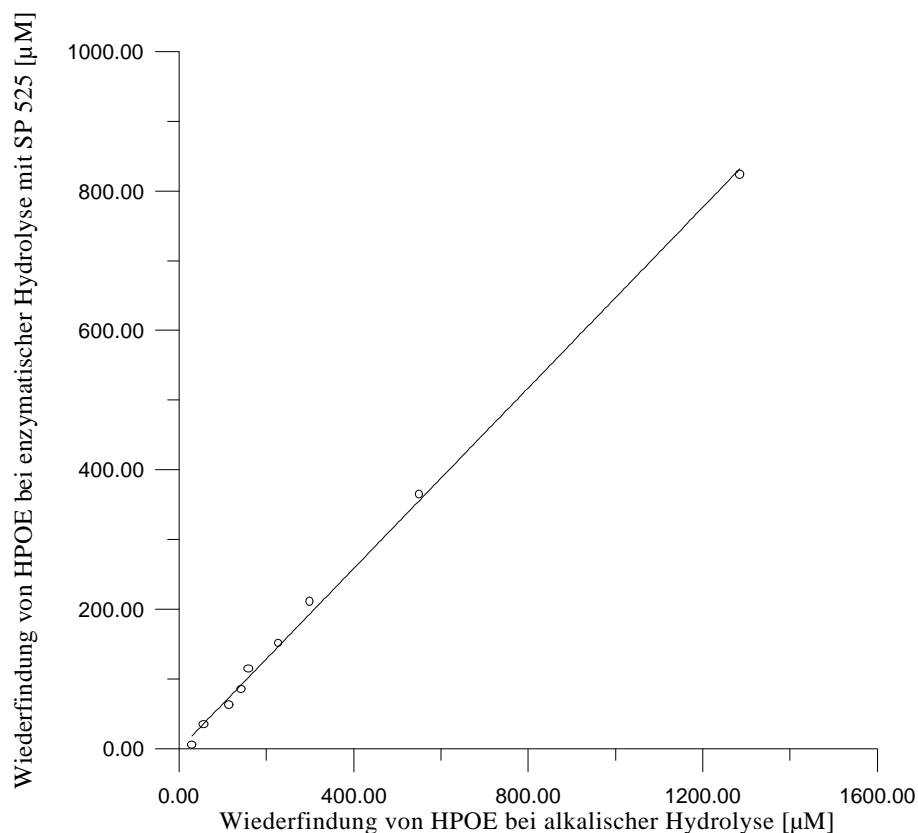


Abbildung 3.40: Vergleich der enzymatischen und alkalischen Hydrolyse von HPDOPC (ESTD)

Da in natürlichen Lipiden ein großer Teil der Fettsäuren auch an Triglyceride und Cholesterin gebunden ist, sollte die Selektivität der alkalischen und enzymatischen Hydrolyse überprüft werden. Dazu wurden unter gleichen Bedingungen Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), Trilinolenin (OTETG) und Cholesteryllinoleat hydrolysiert. Bei der alkalischen Hydrolyse wurde die Freisetzung von 91 % Ölsäure, 20 % Linolensäure und 2 % Linolsäure (ISTD) nachgewiesen. Die enzymatische Hydrolyse von Trilinolenin mit SP 525 ergab ca. 40 % der theoretisch am Triglycerid gebunden Linolensäure. Vermutlich greift das Enzym bevorzugt eine Position des Triglycerids an. Die weitere Hydrolyse vollzieht sich, wenn überhaupt, nur sehr langsam. Bei der Reaktion des Cholesterinesters mit SP 525 wurde unter den gewählten Bedingungen keine Linolsäure freigesetzt. Somit stellt sowohl die alkalische als auch die enzymatische Hydrolyse eine selektive Methode zur Fettsäurespaltung aus Phospholipiden und Triglyceriden dar. Um sicherzustellen, daß bei der Hydrolyse keine Hydroperoxide gebildet werden, wurde sowohl mittels UV-Detektion als auch unter Verwendung der empfindlicheren Chemilumineszenzdetektion die Hydrolyse überwacht. Selbst nach zwei Stunden bei 37 °C und intensivem Schütteln konnten keine Hydroperoxide nachgewiesen werden.

3.4 Anwendungsbeispiele

3.4.1 Untersuchung von Ölen

3.4.1.1 Bestimmung von α - und γ -Linolensäure in Hanfsamen

Hanfsamen zählt zu den ernährungsphysiologisch hochwertigen Ölfrüchten und besitzt einen ungewöhnlich hohen Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Das aus Hanfsamen gewonnene Öl besteht zu über 90 % aus ungesättigten Fettsäuren und enthält die lebensnotwendigen essentiellen Fettsäuren Linolsäure (50-70 %), α -Linolensäure (15-25 %) sowie die selten auftretende γ -Linolensäure (2-4 %). Innerhalb des menschlichen Fettstoffwechsels ist γ -Linolensäure das erste Umwandlungsprodukt von Linolsäure. Voraussetzung für die Umwandlung ist das Enzym Δ -6-Desaturase.

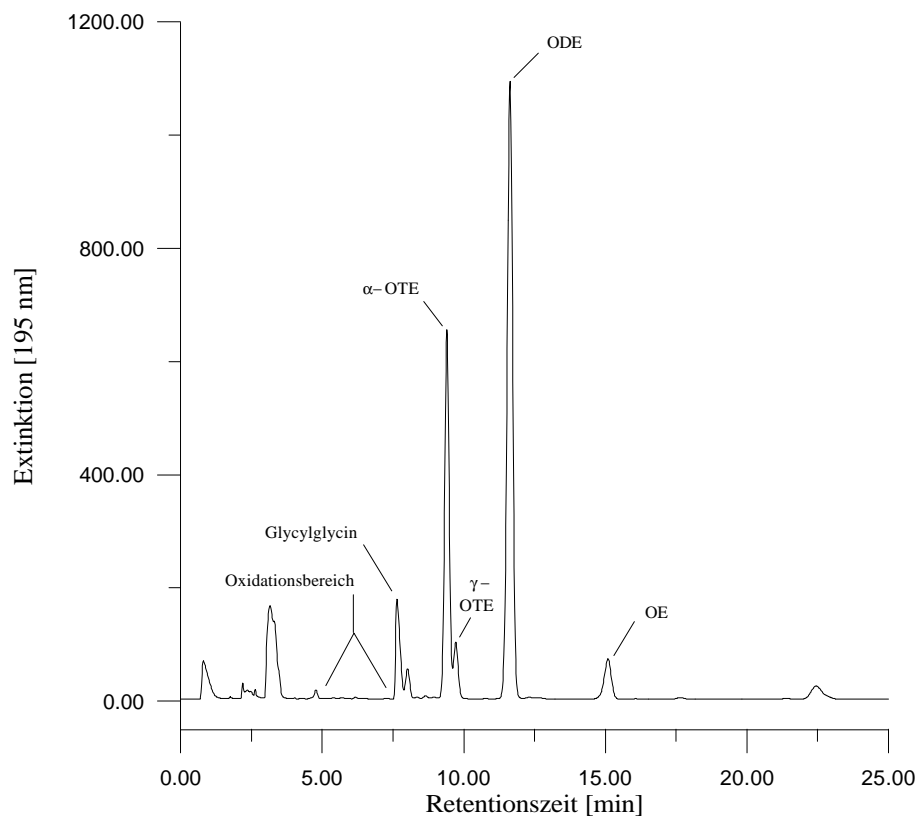


Abbildung 3.41: HPLC-Untersuchung der in Hanfsamen enthaltenen ungesättigten Fettsäuren; Fluofix-Säule; isokratische Elution; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm

Kommt es zu einer Fehlfunktion des Enzyms oder ist es nicht vorhanden, kann die Umwandlung nicht stattfinden, und es folgen Störungen im weiteren Verlauf des Fettstoffwechsels. Um dem entgegenzuwirken, wird die Aufnahme von γ -Linolensäure empfohlen.

In einer Versuchsreihe wurden verschiedene Hanfsamen auf das Verhältnis von α - und γ -Linolensäure untersucht. Dazu wurden 4-5 Samenkörner (~70 mg) in einem Mörser zerrieben und nach Einwaage in ein Eppendorfgefäß mit 1300 μ l Dichlormethan versetzt und unter Sauerstoffausschluß zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln extrahiert. Nach Zentrifugation wurden 1000 μ l des Überstandes abgenommen und wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben enzymatisch hydrolysiert. Die erhaltenen Proben wurden mittels HPLC und CE untersucht. Abbildung 3.41 zeigt die HPLC-Trennung der in Hanföl enthaltenen ungesättigten Fettsäuren an einer Fluofix-Säule innerhalb von 25 min. Neben der Trennung der α - und γ -Linolensäure sind Linol- und Ölsäure als weitere Hauptbestandteile zu erkennen. Erwartungsgemäß konnten keine Hydroperoxide in den frischen Samenkörnern nachgewiesen werden.

Probe	GC		HPLC		CE	
	α -OTE	γ -OTE	α -OTE	γ -OTE	α -OTE	γ -OTE
1	—	—	82.5	17.5	80.6	19.4
2	—	—	91.3	8.7	88.8	11.2
3	—	—	90.6	9.4	88.3	11.7
4	—	—	90.9	9.1	88.6	11.4
5	86.8	13.2	87.1	12.9	85.1	14.9
6	81.9	18.1	—	—	80.5	19.6
7	—	—	85.4	14.6	82.7	17.3
8	—	—	83.9	16.1	—	—
9	88.6	11.4	87.8	12.2	85.4	14.7
10	84.6	15.4	83.3	16.7	81.2	18.8
11	—	—	92.1	7.9	90.0	10.0

- nicht durchgeführt; GC-Gehalte wurden von Frau Dr. Mölleken (BUGH Wuppertal) ermittelt

Tabelle 3.13: Verhältnis von α - und γ -Linolensäure in Prozent in verschiedenen Hanfsamensorten; Untersuchung mittels GC-, HPLC- und CE-Methoden

Tabelle 3.13 enthält die Mittelwerte von α - und γ -Linolensäure aus jeweils drei Messungen, die sich auf 100 % Linolensäuregehalt addieren. Die eingesetzten Bestimmungsmethoden zeigen eine zufriedenstellende Übereinstimmung.

3.4.1.2 Bestimmung der Oxidationsprodukte nach thermischer Belastung

Um die Oxidationsempfindlichkeit der aus dem Saatgut gewonnen Hanföle zu untersuchen, wurden Proben wie in Abschnitt 2.4 beschrieben thermisch belastet und nach unterschiedlicher Belastungsdauer analysiert. Abbildung 3.42 zeigt die MEKC-Untersuchung eines 168 Stunden auf 220 °C erhitzten Öles.

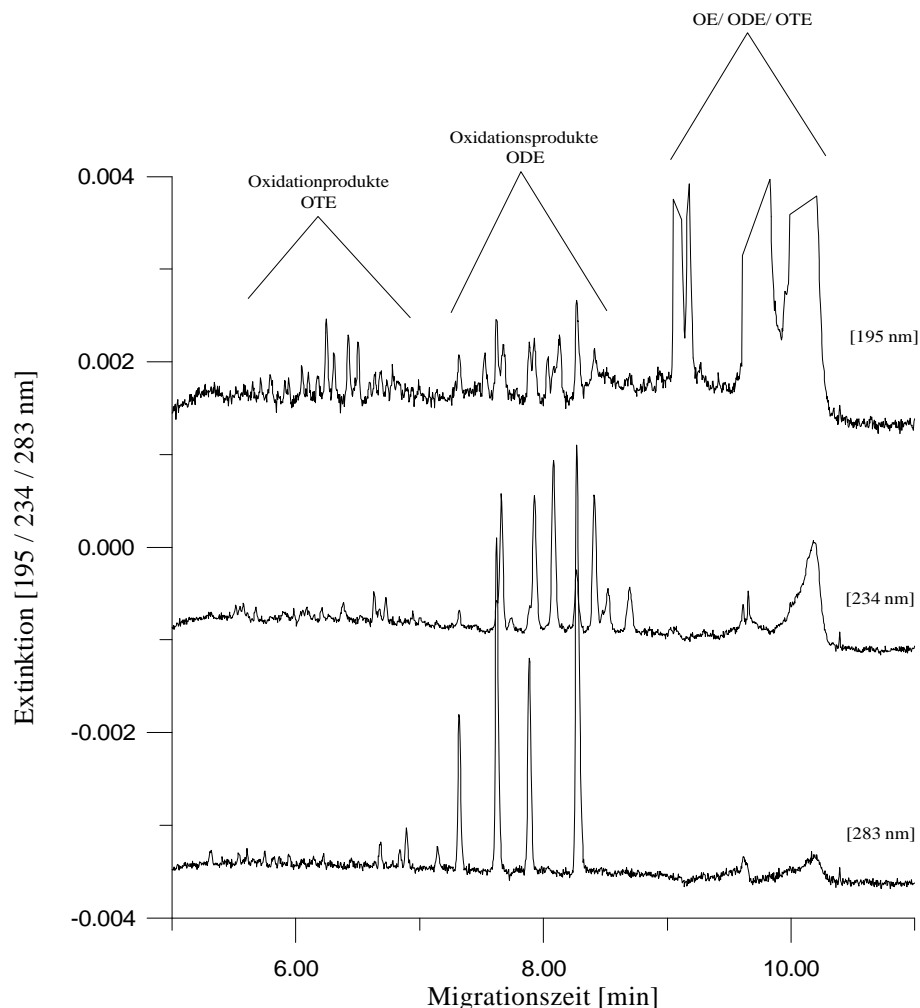


Abbildung 3.42: MEKC-Untersuchung der oxidierten Fettsäuren eines 168 Stunden auf 220°C erhitzten Hanföls (Sorte C); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195, 234 und 283 nm

Deutlich ist hierbei die Bildung von Hydroperoxiden der mehrfach ungesättigten Fettsäuren ODE und OTE zu erkennen. Die Oxidation von Ölsäure (OE) zu HPOE ließ sich in keiner der untersuchten Proben nachweisen. Obwohl in den meisten Ölen auch Linolensäure (OTE) enthalten war, konnten nur in Hanföl Sorte C nach 168 Stunden Hydroperoxide der Linolensäure detektiert werden. Dies ist vermutlich auf eine direkte Abbaureaktion der HPOTE zurückzuführen. Die Bildung von Hydroxyfettsäuren konnte ebenfalls nur in Hanföl Sorte C nach 240 Stunden beobachtet werden. Bei einer Detektionswellenlänge von 195 nm sind neben den Hauptsignalen der Fettsäuren zahlreiche Oxidationsprodukte erkennbar. Zur Bestimmung der konjugierten HPODE-Isomeren wurde die Detektion bei 234 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge sind die Signale von 9-HPODE (10E,12Z), 13-HPODE (9Z,11E), 9-HPODE (10E,12E) und 13-HPODE (9E,11E) deutlich zu erkennen. Darüber hinaus konnten weitere Produkte der Autoxidation bei 283 nm beobachtet werden, die aber aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht genauer charakterisiert werden konnten. In der Literatur^[200, 201] finden sich jedoch Hinweise auf Ketodiene, die in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Zum Vergleich mit

Probe	Belastungs- dauer [Stunden]	Hydroperoxid- gehalt pro mg Öl
Hanföl Sorte A	168	24 µg HPODE
Hanföl Sorte B	168	30 µg HPODE
Hanföl Sorte C	168	44 µg HPODE 2.5 µg HPOTE
Hanföl Sorte C	240	30 µg HPODE
Sojaöl	168	3 µg HPODE
Sojaöl	240	16 µg HPODE
Distelöl	168	59 µg HPODE
Distelöl	240	67 µg HPODE
Walnußöl	168	25 µg HPODE
Walnußöl	240	37 µg HPODE

Tabelle 3.14: Fettsäurehydroperoxidgehalt thermisch belasteter Öle

Diesen Ergebnissen mit Hanfsamenöl wurden einige andere Öle ähnlich behandelt und durch CE untersucht. In Tabelle 3.14 sind die im einzelnen gemessenen

Hydroperoxidkonzentrationen der Öle aufgeführt. Das Sojaöl wies mit 16 µg Hydroperoxid pro mg Öl die geringste Oxidationsempfindlichkeit auf. Distelöl hingegen wurde durch den hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren mit einem Gehalt von 67 µg Hydroperoxid pro mg Öl am stärksten oxidiert. Die verschiedenen Hanfölsorten zeigten eine eher mittlere Empfindlichkeit. Wegen einsetzender Verharzung einiger Öle wurden nicht alle Proben bei 240 Stunden gemessen. Die Untersuchung des Fettsäurehydroperoxidgehalts in Distelöl wurde bereits früher^[159] mittels MEKC-LIF-Detektion durchgeführt. Nach Injektion der aufgearbeiteten Probe (vgl. Abschnitt 2.3) konnte das in Abbildung 3.43 dargestellte Elektropherogramm erhalten werden. Dieses zeigt die vier isomeren Hydroperoxide der Linolsäure, die ebenfalls durch UV-Detektion bei 234 nm selektiv nachgewiesen werden können (vgl. Abbildung 3.42). Die Zuordnung der einzelnen Isomeren erfolgte durch Aufstocken der Probe mit authentischen Standards.

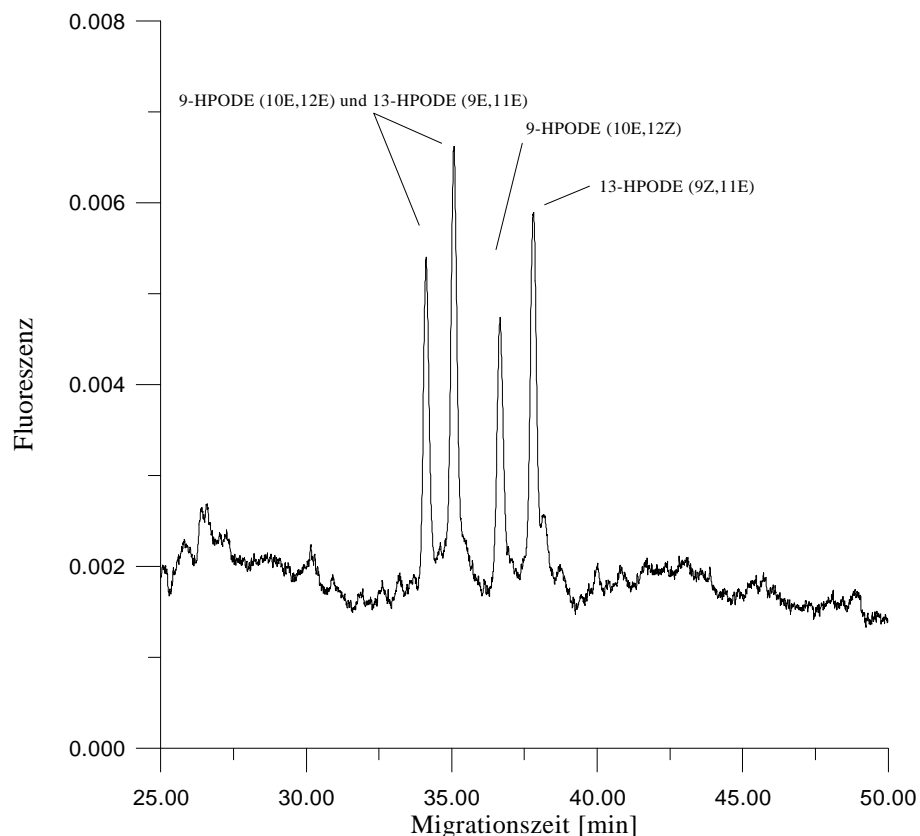


Abbildung 3.43: MEKC-LIF-Untersuchung einer 240 Stunden bei 60 °C autoxydierten Distelölprobe; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol + 0.5 % Aceton im Outletgefäß, 720 mg/l Brij 35 und 30 mM SDS, 0.4 mM PES; fused-silica Kapillare 40/10/57 cm

3.4.2 Photosensibilisierte Oxidation von Soja- und Eilecithin-Rohware

Die bei der enzymatischen Hydrolyse der oxidierten Sojalecithin-Rohware freigesetzten Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxide (vgl. 2.7.2) wurden mit der in Abschnitt 3.1.2.1 beschriebenen MEKC-Methode untersucht. Das in Abbildung 3.44 aufgeführte Elektropherogramm zeigt die normal-flow MEKC-Trennung der Fettsäuren und Fettsäurehydroperoxide nach einer Bestrahlungsdauer von 29 Stunden. Das Isomerenverhältnis der Hydroperoxide gleicht dem, welches bei der Oxidation der freien Fettsäuren mit Singulett-Sauerstoff erhalten wird.

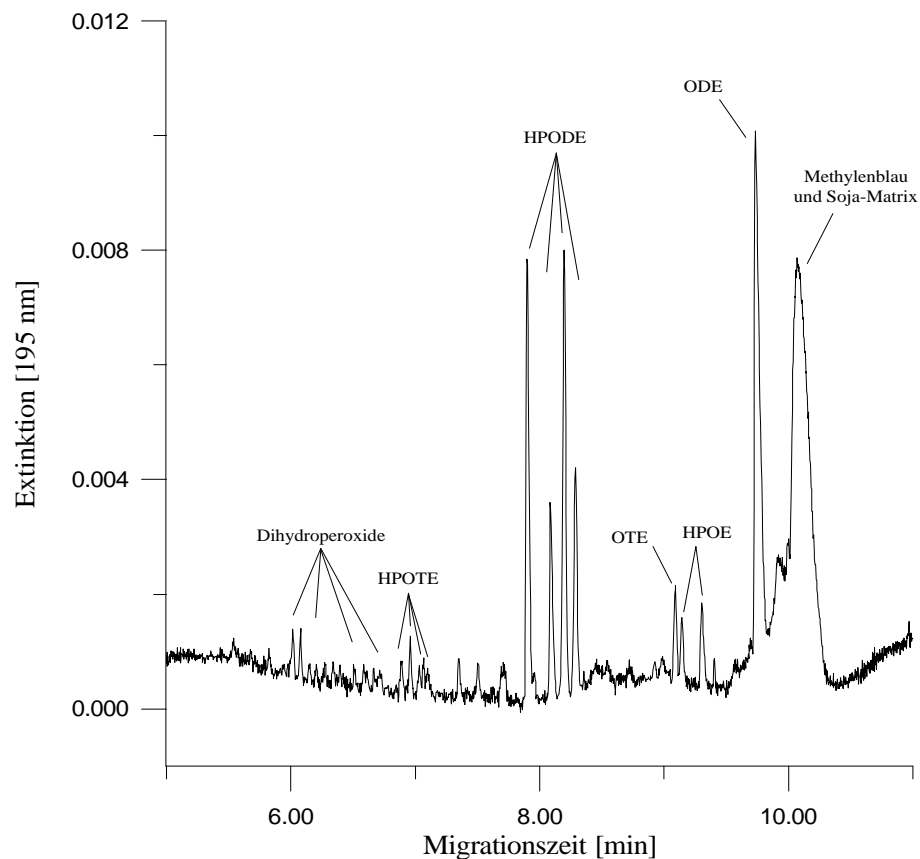


Abbildung 3.44: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 29 Stunden Bestrahlung enzymatisch freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2,4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

Bei kürzeren Migrationszeiten treten weitere Oxidationsprodukte auf, die durch Aufstocken mit Referenzsubstanzen der Klasse der Di-Hydroperoxide zugeordnet werden konnten. Die Sojalecithin-Matrix, die nur über eine geringe Polarität verfügt, hält sich überwiegend innerhalb der Micellen auf und migriert am Ende des

micellaren Fensters bei etwa 10 min. Die Abbildungen 5.42 und 5.43 (Anhang) zeigen die photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin nach 45 bzw. 90 Stunden Bestrahlungszeit. Das sich ändernde Isomerenverhältnis der HPODE ist darauf zurückzuführen, daß nur die nicht konjugierten Fettsäurehydroperoxide zu Di-Hydroperoxiden umgesetzt werden. Die Oxidation von Eilecithin wurde ebenfalls mittels normal-flow MEKC untersucht. Die Durchführung erfolgte analog zur Untersuchung der oxidierten Sojalecithin-Rohware. Abbildung 3.45 zeigt das Elektropherogramm der Lecithinprobe nach 73stündiger Behandlung mit Singulettstauerstoff und anschließender enzymatischer Hydrolyse. Im Hydrolysat

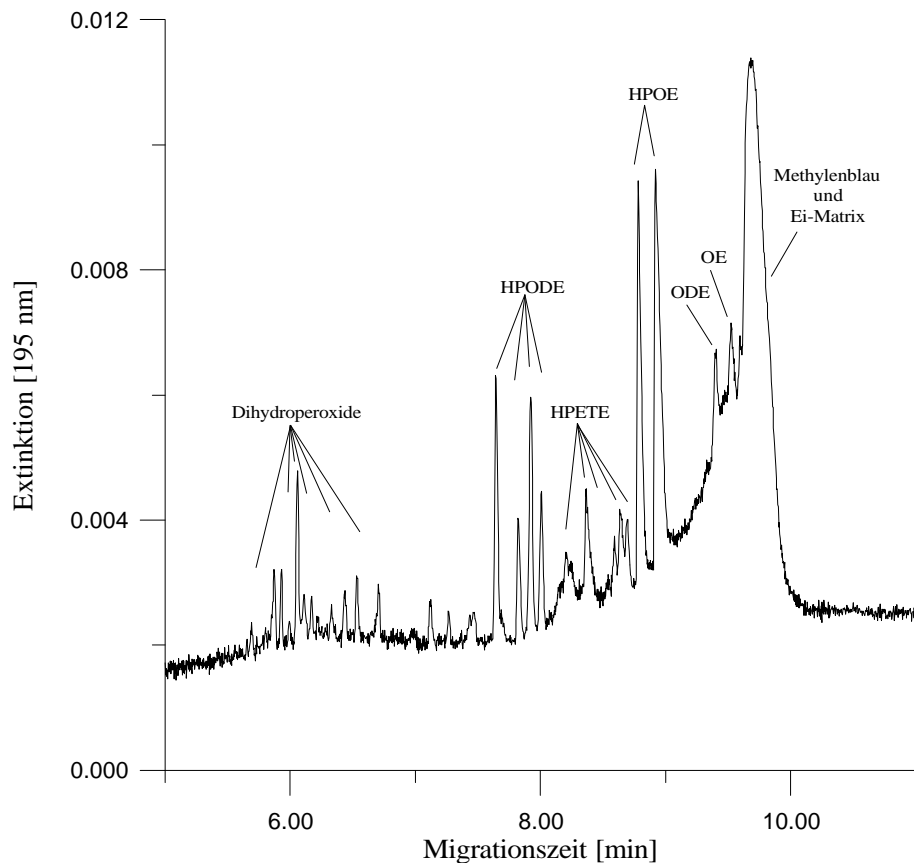


Abbildung 3.45: Photosensibilisierte Oxidation von Eilecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 73 Stunden enzymatisch freigesetzten Fettsäuren und deren Hydroperoxide; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm

ließen sich neben den Fettsäuren die gebildeten HPOE, HPODE und HPETE eindeutig identifizieren. Die Hydroperoxide wiesen ebenfalls das bei der Oxidation der freien Fettsäuren gefundene Isomerenverhältnis auf. Zusätzlich wurde die Bildung einer Vielzahl von weiteren Oxidationsprodukten beobachtet, bei denen es

sich vermutlich um Di-Hydroperoxide handelt. Das breite Signal bei etwa 10 min stammt von unpolaren Komponenten der Ei-Matrix, die sich überwiegend in den Micellen aufhalten und somit im verwendeten Trennsystem am Ende des micellaren Fensters erscheinen. Neben den MEKC- wurden auch HPLC-Methoden zur Untersuchung der photosensibilisierten Oxidation von Soja- und Eilecithin eingesetzt.

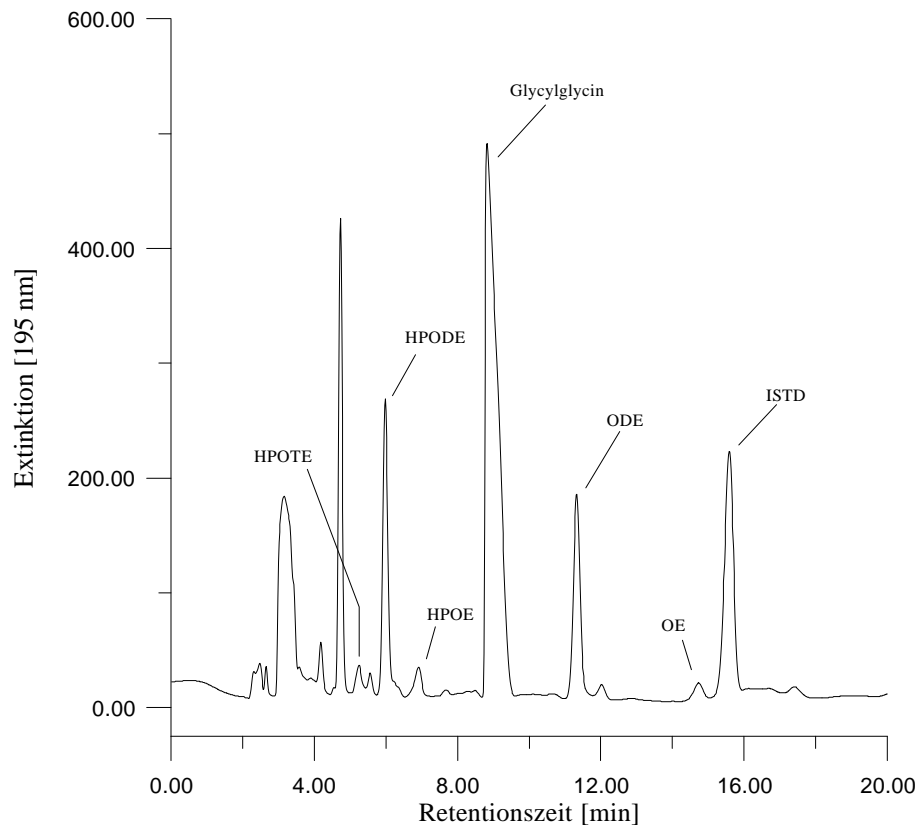


Abbildung 3.46: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; HPLC-Trennung der nach 29 Stunden Bestrahlung enzymatisch freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H₃PO₄ und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm

Dabei wurde als interner Standard ω -6-Ölsäure verwendet, die nicht an den Phosphatidylcholinen des Soja- und Eilecithins gebunden ist und mit der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen HPLC-Methode gut von der natürlichen ω -9-Ölsäure (OE) zu trennen war (Abbildung 3.46). Der zeitliche Verlauf der Oxidation von Sojalecithin ist in Abbildung 3.47 dargestellt. Die leichte Oxidation der gebundenen Linolsäure läßt sich an der schnellen Zunahme der HPODE-Konzentration erkennen. Nach einer Oxidationszeit von 75 Stunden wurde ein Maximum erreicht, anschließend fiel die Konzentration wieder ab. Dieser Abfall ist durch verschiedene Abbaureaktionen der

Monohydroperoxide (z.B. Mehrfachoxidation) zu erklären. Produkte einer Mehrfachoxidation konnten bereits bei der Synthese des HPODE-Standards beobachtet werden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich vermutlich um Di-Hydroperoxide und Carbonylverbindungen. Bei der Bildung der Hydroperoxide der Linolensäure wurde ein ähnlicher Reaktionsverlauf beobachtet. Hier wurde bereits nach ca. 30 Stunden das Konzentrationsmaximum erreicht, nach 75 Stunden waren keine Hydroperoxide der Linolensäure (HPOTE) mehr nachweisbar. Dagegen wurden die Hydroperoxide der Ölsäure (HPOE) auch bei längeren Bestrahlungszeiten nicht merklich abgebaut.

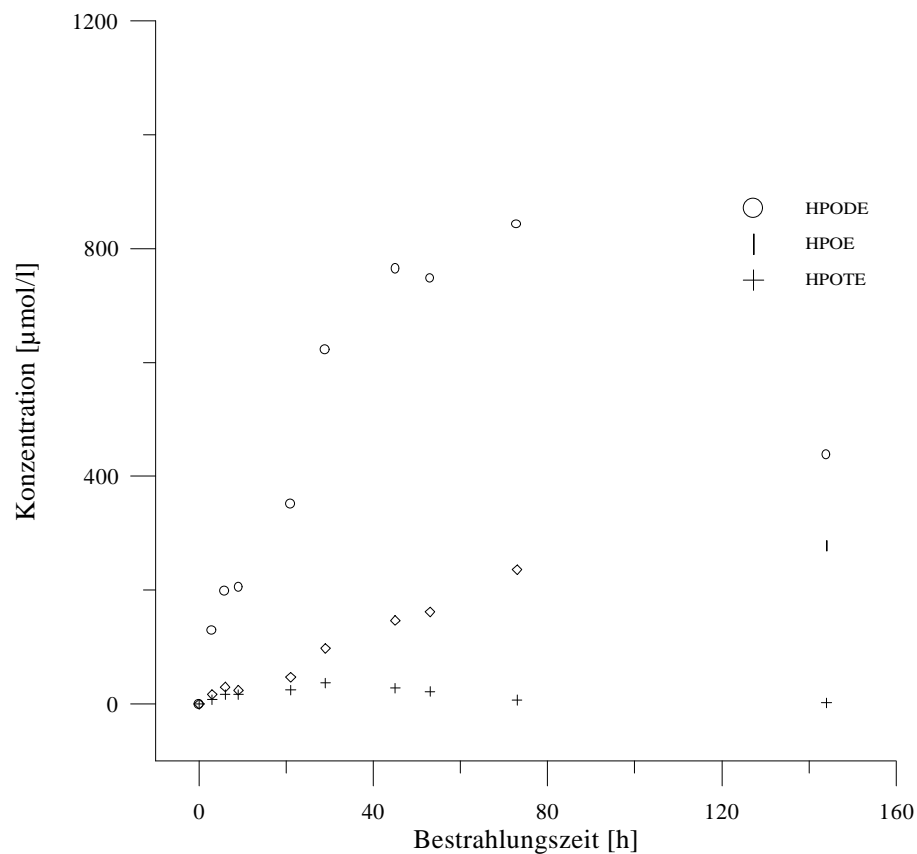


Abbildung 3.47: Zeitlicher Verlauf der Oxidation von Sojalecithin

Bei der Oxidation des Eilecithins zeichnete sich ein ähnliches Bild wie bei der Sojalecithin-Rohware ab. Die Hydroperoxide der Ölsäure bildeten sich langsam und zeigten, wie bei der Synthese des HPOE-Standards, eine höhere Stabilität. Die Bildung der Hydroperoxide der Linolsäure verlief im Vergleich dazu deutlich schneller. Bei einer Bestrahlungsdauer von ca. 50 Stunden erreichte die HPODE-Konzentration ein Maximum und fiel anschließend wieder ab.

3.4.3 Untersuchung von Synovia und Serum

Die in dieser Arbeit entwickelten HPLC- und CE-Methoden zur Bestimmung von Fettsäuren, isomeren Fettsäurehydroperoxiden und korrespondierenden Hydroxyfettsäuren ^[157,202] wurden auch zur Untersuchung von menschlichem Blutserum und Synovialflüssigkeit eingesetzt. Wie bereits von *Spiteller* ^[67] und anderen Arbeitsgruppen erörtert (vgl. auch Abschnitt 1.5), lösen die bei Zellverletzungen enzymatisch gebildeten LOO[•]- und LO[•]-Radikale Reaktionen aus, die zur Entstehung weiterer Lipidhydroperoxide führen. Die im Körper gegenüber der Arachidonsäure (ETE) in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegende Linolsäure (ODE) bildet während dieses Prozesses vorwiegend 9-HPODE und 13-HPODE. Die HPODE-Isomeren werden in biologischen Matrices rasch zu den korrespondierenden Hydroxyfettsäuren 9-HODE und 13-HODE reduziert und reichern sich, da sie nur einem langsamen Abbau unterliegen, im Körper an. Der entsprechende Anteil an HPETE bzw. HETE ist zwar sehr viel geringer, doch ist ihre Rolle bei der Bildung von Hormonvorläufersubstanzen zu beachten.

Bisher wurden als Indikatoren für die Lipidperoxidation (LPO) vor allem Malondialdehyd oder Isoprostane, die nur aus Arachidonsäure gebildet werden, herangezogen, welche als Endprodukte einer stark verzweigten Reaktionskette in sehr geringen Konzentrationen entstehen. Mit der Entwicklung zuverlässiger Analysenmethoden für Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren werden in jüngster Zeit auch diese Verbindungen als LPO-Indikatoren verwendet. Der Einsatz dieser neuen Analysenmethoden bietet hierbei die Möglichkeit, primäre Oxidationsprodukte schnell zu erfassen. Mittels MEKC lassen sich auch einzelne Isomere bestimmen, um so Aussagen über die Bildungsmechanismen und -wege zu erhalten.

3.4.3.1 Bestimmung von oxidierten Fettsäuren in Lipiden der Synovialflüssigkeit

Um Matrixeinflüsse zu bestimmen, wurde die von *Prof. Dr. O. Adam* (Walther-Straub-Institut, München) zur Verfügung gestellte Synovia mit DOPC-Standardlösung aufgestockt und nach enzymatischer Verseifung mittels HPLC und MEKC analysiert. In Bezug auf die Ölsäure ergab sich eine Wiederfindung von 87-89 %. Zur Bestimmung der LPO-Produkte wurden pro Analyse mindestens

2-5 ml Synovia eingesetzt und mittels der im Abschnitt 2.5.3 beschriebenen Methode extrahiert. Die Gehaltsbestimmung der Hydroperoxide war aufgrund der zahlreichen Signale im Elutionsbereich der LPO-Produkte und der nicht ausreichenden Empfindlichkeit des UV-Meßsystems nicht durchführbar. Auch die Erfassung der Hydroxyfettsäuren erwies sich aufgrund der Matrix als sehr schwierig. Als Mittelwert verschiedener Proben wurde eine Konzentration von $1.6 \mu\text{g/g} \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ HODE in Synovialflüssigkeit bestimmt. Wegen mangelndem Probenmaterial (die Abnahme von Gelenkflüssigkeit ist für den Patienten sehr unangenehm und schmerzhaft) konnten keine weiteren Untersuchungen, wie z.B. Aufstockversuche mit HPDOPC bzw. HPODE oder die Verwendung des später entwickelten Nachsäulenderivatisierungssystems, durchgeführt werden. Da aber weder in Blutserum noch in LDL nennenswerte Peroxidkonzentrationen gemessen werden konnten (Reduktion durch Glutathion-Peroxidase), wird auch im Falle der Synovia von einer Unbeständigkeit der Hydroperoxide ausgegangen. Die Bestimmung der LPO-Produkte mittels MEKC gelang aufgrund der geringen Konzentrationen nicht. Es wurde lediglich ein dem Eilecithin verwandtes Fettsäuremuster erhalten (nicht gezeigt).

3.4.3.2 Bestimmung von oxidierten Fettsäuren in Serumlipiden

Zur Bestimmung von oxidierten Fettsäuren in Serumlipiden wurde, wie in Abschnitt 2.5 und 2.8.2 beschrieben, frisch abgenommenes Blut aufgearbeitet und hydrolysiert. Der Einsatz des Serums ohne vorherige Extraktion der Serumlipide war nicht möglich, da die agglomerierenden Bestandteile eine direkte Verwendung ausschlossen. Da die Stabilität der LPO-Produkte nicht bekannt war ^[203], wurde auf eine Lagerung des Serums verzichtet, um eventuellen Abbaureaktionen vorzubeugen. Zur Analyse wurden 200 μl bzw. 2000 μl Serum verwendet, die Lipidfraktionen wurden alkalisch hydrolysiert (vgl. Abschnitt 2.8.2). Vorversuche hatten bereits gezeigt, daß der Einsatz der Fluoreszenzdetektion nicht möglich war, da im Elutionsbereich der LPO-Produkte Matrixkomponenten mit Eigenfluoreszenz koeluierten. Da in den Lipidfraktionen der Seren nur Spuren von Hydroperoxiden nachgewiesen werden konnten, sollten Aufstockversuche mit einer HPDOPC-Stammlösung höhere Lipidhydroperoxid-Konzentrationen vorgeben. Nach dem Aufstocken wurden die Lipidfraktionen enzymatisch oder alkalisch hydrolysiert und

mittels HPLC untersucht. Dabei konnte keine deutliche Zunahme der HPOE-Konzentration beobachtet werden. Vielmehr stieg der Anteil der korrespondierenden Hydroxyfettsäure HOE im gleichen Verhältnis an, was auf eine Glutathion-Peroxidase-Aktivität schließen ließ. Der Einsatz entsprechender Enzymhemmer, wie z.B. N-Ethylmaleimid (NEM) ^[194], verbesserte diese Ergebnisse nicht. Dementsprechend ergaben sich für männliche und weibliche Testpersonen (3) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Hydroperoxidkonzentration. Der mittlere Gehalt an HPODE der untersuchten Seren betrug ca. 0.003 µg/g (1 pmol HPODE pro Gramm Serum) und lag somit im Bereich der Nachweisgrenze des Meßsystems.

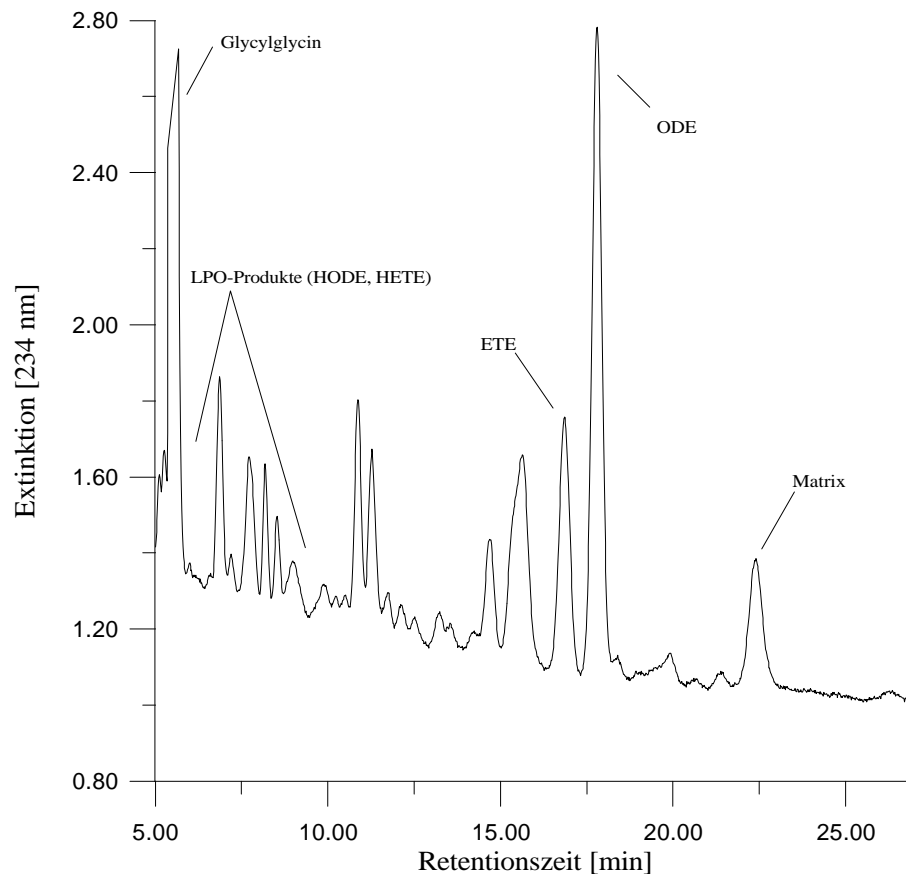


Abbildung 3.48: HPLC-Muster der nichtoxidierten und oxidierten Fettsäuren in Serumlipiden eines gesunden Probanden an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H₃PO₄ und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 234 nm

Die Erfassung der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HODE und HETE war mittels UV-Detektion bei 234 nm nur eingeschränkt möglich, da es auch hier zu Überlagerungen mit Matrixsignalen kam (Abbildung 3.48). Der Gehalt an HODE (9- und 13-HODE) wurde zu 1.7 – 1.8 µg/g Serum bestimmt und entspricht in erster

Näherung dem von *Jira et al.* [70] für das 9-HODE-Isomer angegebenen Wert von 0.3 – 1.8 µg/g LDL (isoliert aus dem Serum 22-60 Jahre alter männlicher und weiblicher Probanden). Die mittels HPLC bestimmten Konzentrationen lagen weit unterhalb der Nachweisgrenze der MEKC-Methode. Daher waren Angaben in Bezug auf die einzelnen Isomeren nicht möglich

3.4.4 Untersuchung von LDL

Die Bestimmung von Produkten der Lipidperoxidation in LDL wurden mit einem freundlicherweise von *M. Nauck* (Medizinische Universitätsklinik Freiburg) zur Verfügung gestellten Material durchgeführt. Dieses wurde aus dem Serum eines

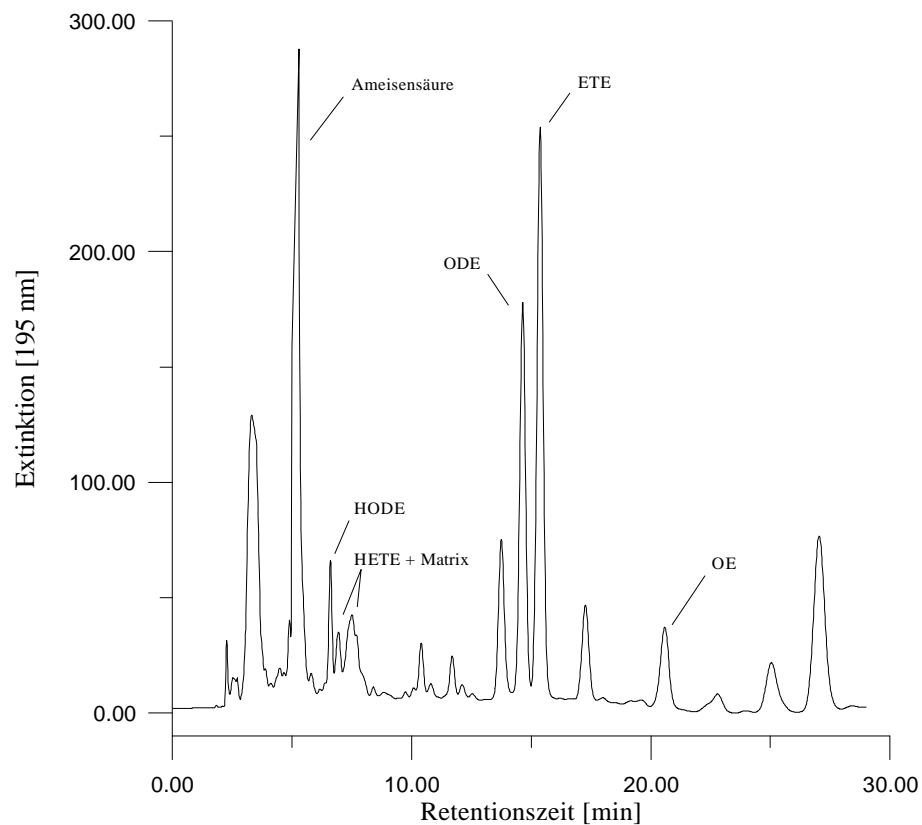


Abbildung 3.49: HPLC-Muster der nichtoxidierten und oxidierten Fettsäuren in LDL eines Patienten mit stark erhöhtem Cholesterin an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H₃PO₄ und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm

Patienten mit einer ausgeprägten Stoffwechselerkrankung gewonnen und enthielt 808 mg/dl Cholesterin [204]. Zur Analyse der Oxidationsprodukte wurden 100-500 µl LDL mit 500 µl 1N NaOH und 500 µl Methanol versetzt und nach der in Kapitel 2.8

beschriebenen Methode hydrolysiert. Dabei konnten sowohl die Hydroperoxide als auch die korrespondierenden Hydroxyfettsäuren der Linol- und Arachidonsäure sicher nachgewiesen werden. Aufstockversuche mit den entsprechenden Standardlösungen der oxidierten Lipide (HPDOPC / HPOE bzw. HDOPC / HOE) ergaben Wiederfindungsraten von 92-104 %. Im Gegensatz zum Serum konnte somit gezeigt werden, daß in LDL keine Reduktion der Hydroperoxide zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren erfolgt. In Abbildung 3.49 sind neben dem erwarteten Fettsäuremuster deutliche Signale von HODE und HETE zu erkennen.

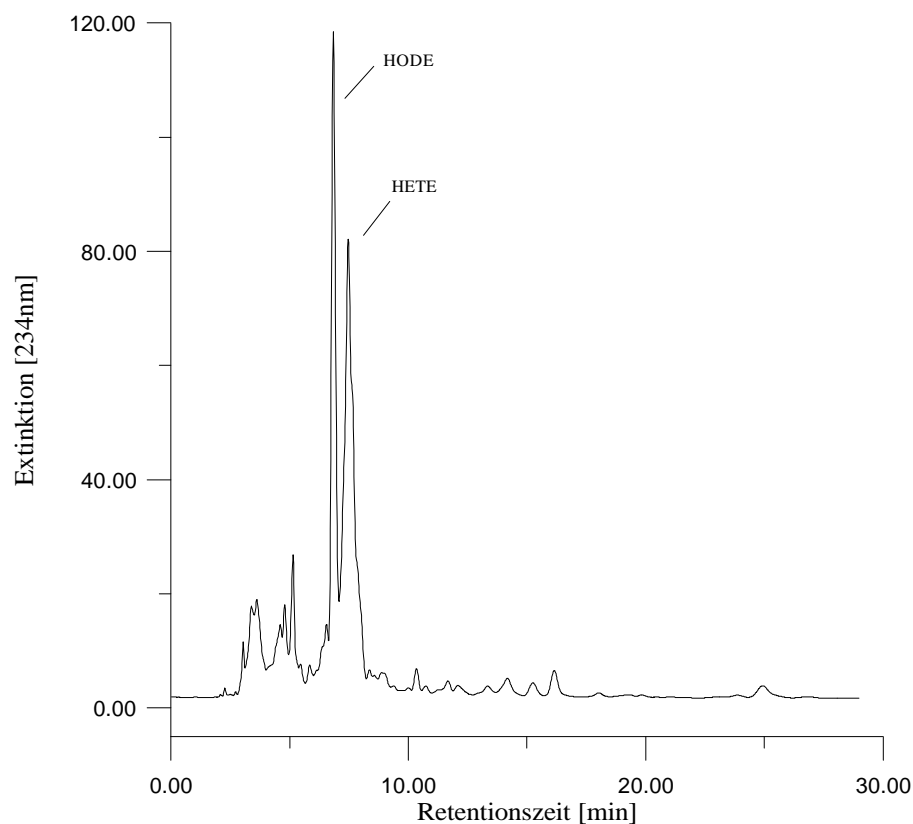


Abbildung 3.50: HPLC-Bestimmung von HODE und HETE in LDL an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H₃PO₄ und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 234 nm

Bei letzteren liegt eine Überlagerung durch Matrixkomponenten vor. Zur Quantifizierung der konjugierten Hydroxyfettsäure-Derivate wurde die Messung bei 234 nm durchgeführt. Ein zusätzlicher positiver Effekt bestand darin, daß bei dieser Wellenlänge deutlich geringere Matrixstörungen auftraten (Abbildung 3.50).

Abbildung 3.51 zeigt die Chemilumineszenzspur derselben Probe. Zu erkennen sind die in der Probe enthaltenen Fettsäurehydroperoxide HPODE und HPETE, welche

mittels UV-Detektion nicht zu quantifizieren waren. Der Hydroperoxidgehalt wurde zu 0.03 μg HPODE und 0.05 μg HPETE pro Gramm LDL bestimmt. Der Gehalt der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HODE und HETE lag mit 18 μg bzw. 27 μg pro Gramm LDL ca. 600-fach höher.

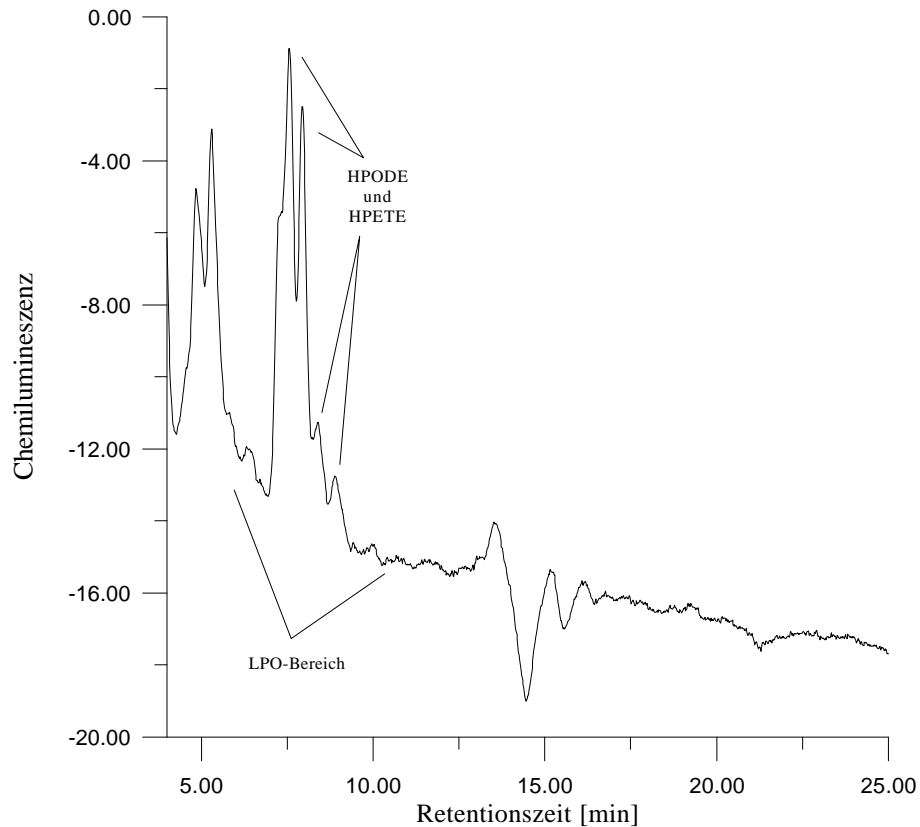


Abbildung 3.51: HPLC-Bestimmung von HPODE und HPETE in LDL an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Chemilumineszenzdetektion

Die Oxidation des LDL mit 2,2'-Azobis-(2,4-dimethylvaleronitril) (AMVN) in Anlehnung an *Kambayashi et al.* ^[205] in einer wäßrigen LDL-Emulsion (Erhalt der liposomalen Struktur) ergab das typische Muster von Fettsäurehydroperoxiden der enthaltenen ungesättigten Fettsäuren. Neben HPODE wurde auch HPETE gebildet (vgl. Abbildung 5.44 und 5.45, Anhang). Während und nach der radikalischen Oxidation konnten keine Hydroxyfettsäuren beobachtet werden.

Die bereits mit der HPLC untersuchten Proben wurden mittels MEKC nach Reduzierung des Lösungsmittelvolumens auf 100 μl analysiert. Abbildung 3.52 zeigt natürliches LDL (rot), mit dem Radikalstarter AMVN oxidiertes LDL und LDL nach Aufstocken mit HPODE und HPETE. In natürlichem LDL konnten neben den

9- und 13-HODE-Isomeren, die in einem Verhältnis von 1:1 vorlagen, fünf HETE-Isomere nachgewiesen werden. Dies läßt auf eine radikalische Bildung der Hydroperoxide mit einem nachfolgenden Abbau zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren schließen. Der direkte Nachweis der Hydroperoxide war mit der MEKC-Methode nicht möglich. Die durch radikalische Oxidation gebildeten Hydroperoxide sind im unteren Elektropherogramm dargestellt. Die Bandenverbreiterung im Bereich von 8 bis 10 min trat nur in den mit AMVN versetzten Proben auf. Zur zusätzlichen Absicherung wurde die oxidierte Probe noch mit HPODE und HPETE aufgestockt (mittleres und oberes Elektropherogramm). Die Zuordnung der HPETE-Isomeren war aufgrund von Matrixstörungen nicht eindeutig möglich.

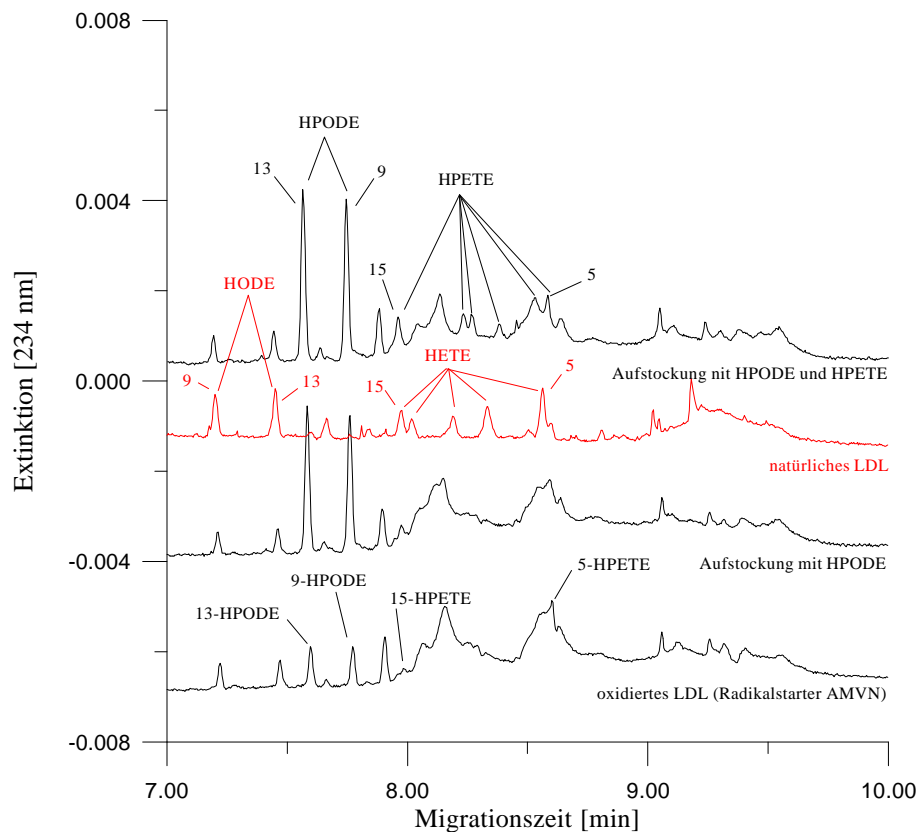


Abbildung 3.52: MEKC-Bestimmung von Fettsäurehydroperoxiden und Hydroxyfettsäuren in LDL vor und nach radikalischer Oxidation; natürliches LDL (rot), oxidiertes LDL und mit HPODE und HPETE aufgestocktes LDL; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 234 nm

Der Gehalt der Probe betrug ca. 18 µg 9- und 13-HODE pro Gramm LDL. Die Bestimmung der HETE-Isomeren konnte wegen fehlender Referenzsubstanzen nicht genau erfolgen. Mit der Annahme gleicher Responsefaktoren für die einzelnen

Isomeren wurde ein Gehalt von ca. 30 µg HETE pro Gramm LDL abgeschätzt. Die mittels HPLC und MEKC bestimmten HODE-Gehalte stimmen gut überein. Sie zeigen auch eine gute Übereinstimmung mit Werten von *Jira et al.* ^[70], die für Probanden mit erhöhtem Cholesterinspiegel im Bereich von 14–23 µg/g LDL lagen. Die Lagerung der LDL-Probe bei 4-8 °C im Kühlschrank über 12 Monate führte zu einer starken Erhöhung des HODE-Gehalts auf 48 µg/g LDL. Aus diesem Grund empfiehlt sich die Gehaltsbestimmung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Isolierung der LDL-Fraktion aus Vollblut, wobei bis zur Isolierung der LDL-Fraktion ebenfalls eine möglichst geringe Zeit verstreichen sollte, um noch nicht bekannten Abbaureaktionen vorzubeugen.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden MEKC- und HPLC-Methoden zur Bestimmung von ungesättigten Fettsäuren und den davon abgeleiteten Hydroxy- und Hydroperoxyfettsäuren entwickelt. Die Quantifizierung dieser Verbindungen erfolgte durch den Einsatz von UV/VIS- und UV/VIS-Diodenarray-Detektoren nach enzymatischer und chemischer Hydrolyse von Phospholipiden und Triglyceriden aus biologischem Probenmaterial. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit und der Selektivität wurden Nachsäulenderivatisierungsreaktionen in Verbindung mit Fluoreszenz- bzw. Chemilumineszenzdetektion eingesetzt.

Ein Schwerpunkt lag in der Optimierung der chromatographischen und elektrophoretischen Trennung. Die MEKC ermöglichte sowohl unter reversed-flow- als auch unter normal-flow-Bedingungen eine Auftrennung der isomeren Hydroxy- und Hydroperoxyderivate der Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure. Das normal-flow System hatte aber deutliche Vorteile hinsichtlich der Analysenzeiten und der theoretischen Bodenzahlen (ca. 10^6 m^{-1}). Für die MEKC-Methoden wurden Nachweisgrenzen von 4 bis $100 \mu\text{M}$ routinemäßig erreicht. Um die Nachweisempfindlichkeit der UV/VIS-Detektion zu steigern, wurden „Bubble-Cells“ eingesetzt, welche den Response für alle Analyten um den Faktor 5-7 erhöhten. Zur Anwendung der LIF-Detektion wurde auf eine früher entwickelte Nachsäulenderivatisierungstechnik zurückgegriffen, bei der die Hydroperoxyfettsäuren und p-Hydroxyphenylelessigsäure (PES) in Anwesenheit von Mikroperoxidase-11 (MP-11) selektiv ein Produkt erzeugen, dessen Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$) gemessen wird. Das zur Derivatisierung benötigte MP-11 war an der Wand einer Reaktionskapillare immobilisiert, die totvolumenfrei mit einer Trennkapillare (fused-silica) gekoppelt wurde. Eine Computersimulation der Vorgänge in der Reaktionskapillare ergab, daß ein Verlust der Trennung nur dann vermieden werden kann, wenn entweder der Umsatz sehr schnell ist oder das gebildete fluoreszierende Produkt eine ähnliche Mobilität wie die Hydroperoxide besitzt. In Versuchen wurde gezeigt, daß unter optimalen reversed-flow-Bedingungen das Produkt von PES tatsächlich mit den Hydroperoxiden migriert und PES für die Nachsäulenreaktion das beste Reagenz unter mehreren käuflichen Analoga darstellt.

Zur Bestimmung der aus Triglyceriden und Phospholipiden freigesetzten Fettsäuren und Hydroxy- und Hydroperoxyfettsäuren wurden auch RP-HPLC-Methoden mit UV-Detektion bei 195 und 234 nm eingesetzt. Durch die Verwendung einer Fluoralkylphase (Fluofix) gelang die Antrennung einzelner Isomere der oxidierten Fettsäuren. Mit der fast HPLC ließen sich die Analysenzeiten auf unter vier Minuten reduzieren. Die Linearität der Methoden erstreckte sich über mehrere Größenordnungen von der Nachweisgrenze (0.2 bis 0.9) bis zu einer Konzentration von 1500 µM. Für den sicheren Nachweis der Hydroperoxyfettsäuren in komplexen Matrices wurden Empfindlichkeit und Selektivität durch den Einsatz von Nachsäulenderivatisierungsreaktionen weiter verbessert.

Die erarbeiteten Methoden wurden zur Bestimmung der in biologischem Probenmaterial vorliegenden nichtoxidierten und oxidierten Lipide eingesetzt. Neben Ölen, Soja- und Eilecithin wurden auch Proben mit komplexerer Matrix wie Blutserum, Synovia und LDL (Low-Density-Lipoprotein) untersucht. Bei der Hydrolyse der Phosphatidylcholine stellte sich heraus, daß die Lipasen einen Teil der Hydroperoxide abbauen, was besonders bei geringen Hydroperoxidkonzentrationen die Wiederfindung stark herabsetzt; für solche Proben war die alkalische Hydrolyse mit Natronlauge geeigneter als die enzymatische. Die MEKC hatte gegenüber der HPLC den Vorteil, störende Matrixbestandteile von den Analyten abzutrennen. Aus diesem Grund gelang die MEKC-Bestimmung isomerer Hydroxyfettsäuren der Linol- und Arachidonsäure in natürlichem LDL bei 234 nm durch UV-Detektion. Die Konzentrationen der Hydroxyfettsäuren wurden zu ca. 18 µg HODE und 30 µg HETE pro Gramm LDL bestimmt und waren damit etwa 600mal so hoch wie die der Hydroperoxide. Da die Hydroxyfettsäuren in biologischer Matrix offenbar nur langsam abgebaut werden, sind sie bessere Marker für die Lipidperoxidation als die Hydroperoxide.

5 Anhang

5.1 Simulation der Nachsäulenderivatisierung mittels MS VISUAL BASIC

Die in Abschnitt 3.1.5.6 beschriebenen Simulationen wurden mittels Visual Basic (VB) und dem Algorithmus der VB-Prozedur „Simulation_I“ berechnet ^[206]. Die zu berücksichtigenden Parameter der Edukt- (E,E2), Produkt- (P) sowie der Reaktionsgeschwindigkeit (Umsatz, %) konnten im Hauptfenster (Abbildung 5.1) des Programms eingestellt werden.

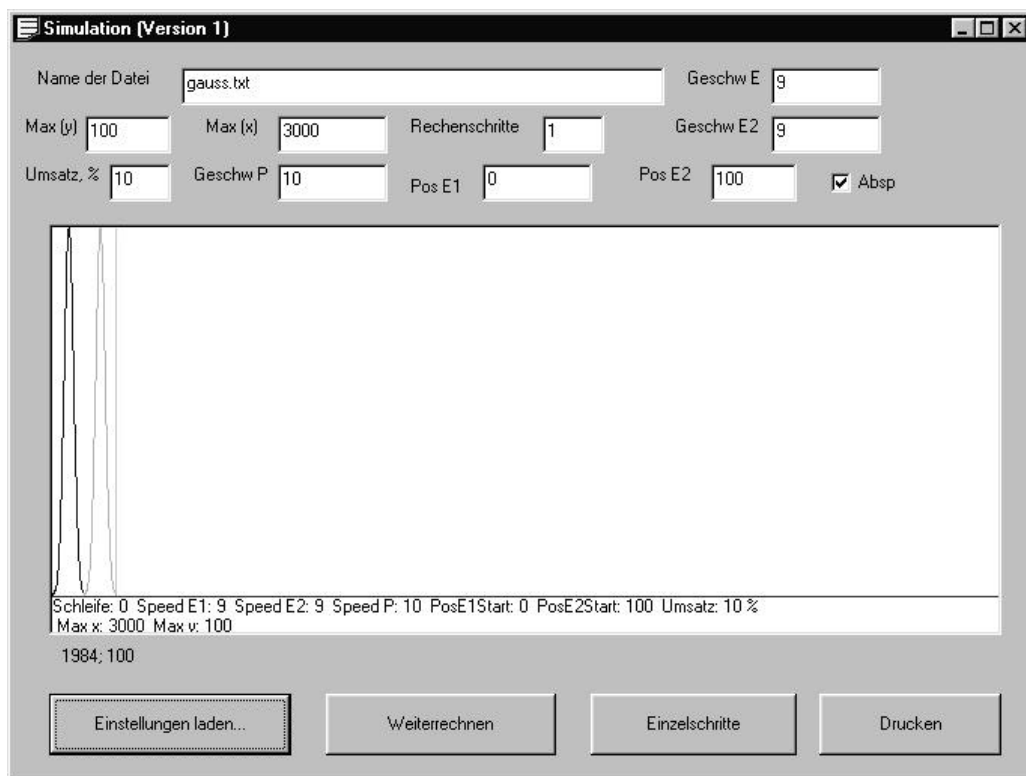


Abbildung 5.1: Hauptfenster der Anwendung mit geladenen Einstellungen

Dabei stellen die eingegeben Zahlenwerte relative Geschwindigkeiten zueinander dar. Die Eingabe der Werte (9) und (10) in die Felder E und P ergab einen Geschwindigkeitsunterschied zwischen Edukt und Produkt von 10 %. Die Felder Max (x) und Max (y) gaben die Größe der Achsen an. Über (Absp.) konnten die berechneten Daten als Bitmap-Datei gespeichert werden. Hierbei bestimmte das Feld (Rechenschritte), wie oft dies geschah und wie oft die Bildschirmanzeige erneuert wurde. Die Startpositionen der beiden Gaußkurven konnten durch (Pos E1) und

(Pos E2) bestimmt werden. Bei der Eingabe der Werte (0) und (100) in diese Felder lagen zwei Gaußkurven gerade Basislinien getrennt vor. Während der verwendeten Routine wurden die jeweiligen Signale in einzelne Punkte unterteilt und in Felder abgelegt, die durch einen Algorithmus vorwärts bewegt wurden. Im Programm konnten dazu einzelne Werte der Arrays mit Faktoren entsprechend multipliziert und die erhaltenen Werte in ein neues Feld eingetragen werden. Im speziellen wurden dazu die globalen Arrays *Liste A*, *Liste A2* und *Liste B* deklariert und über eine weitere Prozedur die Felder *Liste A*, *Liste A2* mit Werten (aus Gauß-Tabelle) aufgefüllt, so daß je Feld eine idealisierte Gaußkurve (6σ) nachgebildet wurde.

Sub rechnen()

```

For i = Val(Form1.Text3.Text) To -99 Step -1                                ①
    ListeA(i + Val(Form1.Text7.Text)) = ListeA(i)
    ListeA2(i + Val(Form1.Text8.Text)) = ListeA2(i)
Next i
If Val(Form1.Text6.Text) > -1 Then                                        ②
    For i = Val(Form1.Text3.Text) To -99 Step -1
        ListeB(i + Val(Form1.Text6.Text)) = ListeB(i)
    Next i
Else
    For i = -99 To Val(Form1.Text3.Text) Step 1
        ListeB(i + Val(Form1.Text6.Text)) = ListeB(i)
    Next i
End If
For i = Val(Form1.Text3.Text) To -99 Step -1                            ③
    If i > 200 Then
        ListeB(i) = ListeB(i) + ListeA(i) * CDbI(Form1.Text5.Text) / 100
        ListeA(i) = ListeA(i) - ListeA(i) * CDbI(Form1.Text5.Text) / 100
        ListeB(i) = ListeB(i) + ListeA2(i) * CDbI(Form1.Text5.Text) / 100
        ListeA2(i) = ListeA2(i) - ListeA2(i) * CDbI(Form1.Text5.Text) / 100
    End If
Next i
End Sub

```

Mit jedem Rechenschritt wurde nun der Inhalt der Elemente der Felder *Liste A* und *Liste A2* um eine bestimmte Anzahl von Elementen verschoben und durch

(*Form1.Text3*) die Anzahl der Elemente, die bei der Simulation berücksichtigt wurden, bestimmt.

① Da die Edukte A und A2 auch unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen konnten, war die Anzahl der Elemente, um die die Edukte verschoben werden konnten, unterschiedlich. Die Geschwindigkeiten von Edukt A und Edukt A2 wurden aus den Textfeldern (*Form1.Text7*) und (*Form1.Text8*) ausgelesen. Die Geschwindigkeit des Produktes B wurde aus dem Textfeld (*Form1.Text6*) entnommen. Da seine Geschwindigkeit auch negative Werte annehmen konnte, war eine Fallunterscheidung mittels „If Then Else“ erforderlich.

② Ab dem Element 200 (gestrichelte senkrechte Linie; Abbildung 5.1) erfolgte für die Edukte A und A2 eine Umwandlung in das Produkt B.

③ Der Umsatz pro Rechenschritt wurde durch den Inhalt des Textfeldes (*Form1.Text5*) festgelegt. Zum Erhalt der kompletten Simulation wurde die Routine (*rechnen*) so oft ausgeführt, bis der Produktpeak an der Stelle angelangt war, die durch (*Form1.Text3*) vorgegeben wurde. Die Ausgabe der Simulation konnte wahlweise als Bitmap oder ASCII Datei erfolgen.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

β	Phasenverhältnis
μ_{eff}	effektive Mobilität
μ_{eof}	elektroosmotische Mobilität
μ_{ep}	elektrophoretische Mobilität
10-HPODE	10-Hydroperoxyoctadeca-8e,12(Z)-diensäure
10-HPOE	10-Hydroperoxyoctadeca-8(E)-ensäure
10-HPOTE	10-Hydroperoxyoctadeca-8e,12(Z),15(Z)-triensäure
12-HPODE	12-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),13(E)-diensäure
12-HPOTE	12-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),13(E),15(Z)-triensäure
13-HPODE	13-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E)-diensäure
13-HPOTE	13-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E),15(Z)-triensäure
13S-HPODE	13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E)-diensäure
13S-HPOTE	13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E),15(Z)-triensäure
15-HPOTE	15-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),12(Z),16(E)-triensäure
16-HPOTE	16-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),12(Z),14(E)-triensäure
9-HPODE	9-Hydroperoxyoctadeca-10(E),12(Z)-diensäure
9-HPOE	9-Hydroperoxyoctadeca-10(E)-ensäure
9-HPOTE	9-Hydroperoxyoctadeca-10(E),12(Z),15(Z)-triensäure
ACN	Acetonitril
AMPD	2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol
AMVN	2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril)
BHT	2,6-Di- <i>tert.</i> -butyl-4-methylphenol
Brij 35	Polyoxyethylenlaurylether
CE	Kapillarelektrophorese
CEKC	Cyclodextrin elektrokinetische Chromatographie
CMC	Kritische micellare Konzentration
CZE	Kapillarzonenelektrophorese

DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT 135	Distortionless Polarisation Transfer (Einstrahlungswinkel 135°)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EOF	Elektroosmotischer Fluß
ESTD	Externer-Standard
FS-Kapillare	fused-silica Kapillare
GC	Gaschromatographie
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPDOPC	Dioleoylphosphatidylcholinhydroperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPODE	Isomere Hydroperoxide der photooxidierten Linolsäure
HPOE	Isomere Hydroperoxide der photooxidierten Ölsäure
HPOETG	Isomere Hydroperoxide des photooxidierten Trilinoleoylglycerin
HPOTE	Isomere Hydroperoxide der photooxidierten Linolensäure
ID	Kapillarinne Durchmesser
ISTD	Interner Standard
LDL	low-density lipoproteine
L_{eff}	Länge der Kapillare vom Inlet bis zum Detektor
L_{ges}	Gesamtlänge der Kapillare
LIF-Detektor	Laserinduziertefluoreszenz-Detektor
LOOH	Lipidhydroperoxid
LPO	Lipidperoxidation
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
MP-11	Mikroperoxidase-11
NMR	nuclear magnetic resonance
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC

ODE	Linolsäure
OE	Ölsäure
OETG	Trilinoleoylglycerin
OTE	Linolensäure
PBS	p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure
PEE	p-Hydroxyphenylethanol
PES	p-Hydroxyphenylessigsäure
PPS	p-Hydroxyphenylpropionsäure
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon®)
PVA	Polyvinylalkohol
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
SDS	Natriumdodecylsulfat
THF	Tetrahydrofuran
t_{eof}	Migrationszeit des EOF
t_m	Migrationszeit
t_{mc}	Migrationszeit der Micelle
UV-DAD	UV-Diodenarray-Detektor
v/v	Volumenanteil

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: 5-Cholesten-3 β -ol (Cholesterin)	3
Abbildung 1.2: Wichtige Vertreter der Phosphoglyceride	4
Abbildung 1.3: Chalottenmodell eines 1-Stearoyl-2-oleoyl-3-phosphatidylcholins	5
Abbildung 1.4: Triacylglycerin (Triglycerid)	6
Abbildung 1.5: Wichtige Vertreter der im humanen Organismus vorkommenden Fettsäuren	8
Abbildung 1.6: Aufbau einer biologischen Membran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell	10
Abbildung 1.7: Strukturmodell der Lipoproteine	13
Abbildung 1.8: Täglicher Umsatz des Lipoproteincholesterin beim Menschen	15
Abbildung 1.9: Pathogenese der Atherosklerose (Querschnitt durch eine Arterie)	19
Abbildung 1.10: Angriffspunkte der Phospholipasen	25
Abbildung 2.1: Bestrahlungsapparatur	31
Abbildung 2.2: Skizze des Verbindungsstücks mit Trenn- und Reaktionskapillare	44
Abbildung 3.1: Trennung der Fettsäuren (OE, ODE, OTE) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide (HPOE, HPODE, HPOTE); fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm	47
Abbildung 3.2: Trennung des Standardgemisches nach Optimierung der Brij 35-Konzentration; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 720 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm	49
Abbildung 3.3: Trennung des Standardgemisches nach Optimierung der Trennspannung, der Trenntemperatur und des pH-Wertes; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm	50
Abbildung 3.4: Trennung des Standardgemisches nach Verlängerung der Kapillare; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.0), 30 % (v/v) Ethanol, und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 50/57 cm; Detektion bei 195 nm	51
Abbildung 3.5: Optimierung der Trennung des Standardgemisches durch Zusatz von 1 % Aceton; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 750 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm	53
Abbildung 3.6: Trennung der Fettsäuren (OE, ODE, OTE), der 13S-Hydroperoxide der Linol- und Linolensäure und deren korrespondierenden 13S-Hydroxyfettsäuren; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 800 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS, 1 % Aceton; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm	54
Abbildung 3.7: Trennung des Standardgemisches mittels PVA-belegter Kapillare 40/47 cm; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol, 800 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; Detektion bei 195 nm	56

- Abbildung 3.8: Trennung des Standardgemisches der Hydroperoxide; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2 % ACN; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Feldstärke 638 V/cm; Detektion bei 195 nm 60
- Abbildung 3.9: Trennung des Standardgemisches; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 62
- Abbildung 3.10: Trennung des Standardgemisches; Elektrolyt: 10 mM Megluminpuffer (pH 9.0), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 63
- Abbildung 3.11: Trennung konjugierter Hydroperoxide der Linol- (HPODE; 1.9mM) und Linolensäure (HPOTE; 1.4 mM); Elektrolyt: 10 mM Megluminpuffer (pH 9.0), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 234 nm 64
- Abbildung 3.12: Trennung des Standardgemisches unter Verwendung einer PEG-Kapillare; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; anodische und kathodische Detektion bei 195nm 66
- Abbildung 3.13: Trennung der isomeren Hydroperoxide HPOE, HPODE, HPOTE und der korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HOE, HODE und HOTE; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm und 234 nm 68
- Abbildung 3.14: Trennung von Öl- (OE; 0.25 mM), Linol- (ODE; 0.15 mM) und Linolensäure (OTE; 0.13 mM), der mit Singulett-Sauerstoff hergestellten Hydroperoxide HPOE (0.5 mM), HPODE (0.9 mM) und HPOTE (0.7 mM) und der durch Reduktion mit Natriumborhydrid erhaltenen korrespondierenden Hydroxyfettsäuren HOE (0.5 mM), HODE (0.9 mM) und HOTE (0.7 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 69
- Abbildung 3.15: Trennung von Arachidonsäure (ETE; 0.8 mM) und deren Hydroperoxide HPETE (0.9 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 70
- Abbildung 3.16: Trennung von Arachidonsäure (ETE; 0.8 mM) und der durch Reduktion der HPETE-Isomeren mit Natriumborhydrid erhaltenen Hydroxyfettsäuren (HETE; 0.9 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 71
- Abbildung 3.17: Peaküberlagerungen bei der simultanen Bestimmung von HPOE- und HPETE-Isomeren; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 72

- Abbildung 3.18: Trennung von γ -Linolensäure (γ -OTE; 1.0 mM) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide (γ -HPOTE; 1.4 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 5.7 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm und 234 nm 73
- Abbildung 3.19: Trennung von α -Linolensäure (α -OTE; 1.0 mM) und γ -Linolensäure (γ -OTE; 0.9 mM); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 74
- Abbildung 3.20: Erhöhung der Signalflächen durch Einsatz einer Bubble-Cell in der reversed-flow MEKC; unteres Elektropherogramm ohne, oberes mit Bubble-Cell; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol, 750 mg/l Brij 35 und 35 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm; Slit: 200/100 μ m 75
- Abbildung 3.21: Erhöhung der Signalflächen durch Einsatz einer Bubble-Cell in der normal-flow MEKC; unteres Elektropherogramm ohne, oberes mit Bubble-Cell; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Detektion bei 195 nm; Slit: 200/100 μ m 76
- Abbildung 3.22: Enzymatische Reaktion der Hydroperoxide zum fluoreszierenden Biphenyl 78
- Abbildung 3.23: Elektropherogramm von HPOE, (13)-S-HPODE und (13)-S-HPOTE 79
- Abbildung 3.24: Immobilisierung von MP-11 an der fused-silica Kapillaroberfläche 80
- Abbildung 3.25: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz mit und ohne Derivatisierungsreaktion 83
- Abbildung 3.26: Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion der isomeren Hydroperoxide von HPOE, HPODE und HPOTE; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol + 0.5 % Aceton, 720 mg/l Brij 35 und 30 mM SDS, 0.4 mM PES; fused-silica Kapillare 40/10/57 cm; oberes Elektropherogramm wurde mit acetonfreien Elektrolyten im Outletgefäß aufgenommen 84
- Abbildung 3.27: Vergleich verschiedener Reaktionskapillaren; zeitlich normiert auf erstes Signal 86
- Abbildung 3.28: Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion der isomeren Hydroperoxide HPOE, HPODE und HPOTE; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN, 0.4 mM PES; fused-silica Kapillare 60/10/77 cm; Feldstärke 390 V/cm 88
- Abbildung 3.29: Migrationsverhalten von PES und PES-Dimer unter reversed-flow Bedingungen im Vergleich zu HPOE, HPODE und HPOTE; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.3), 30 % (v/v) Ethanol + 0.5 % Aceton, 720 mg/l Brij 35 und 30 mM SDS; fused-silica Kapillare 40/47 cm; Detektion bei 195 nm 90
- Abbildung 3.30: Selektivität des normal-flow Puffer gegenüber PES und PES-Dimer im Vergleich zu HPOE, HPODE u. HPOTE; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Detektion bei 195 nm 91
- Abbildung 3.31: PES-Analoga 92

- Abbildung 3.32: Simulation der Nachsäulenderivatisierung mit optimalen Parametern: 10% Umsatz pro Boden; Hydroperoxide (blau und grün) und PES-Dimer (rot) besitzen die gleiche Geschwindigkeit 93
- Abbildung 3.33: Simulation der Nachsäulenderivatisierung: 1 % Umsatz pro Boden und 10 % Geschwindigkeitsdifferenz der Hydroperoxide (blau und grün) und des PES-Dimers (rot) 94
- Abbildung 3.34: Isokratische HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl- (OE; 0.25 mM), Linol- (ODE; 0.15 mM) und Linolensäure (OTE; 0.13 mM) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide aus Öl- (HPOE; 0.5 mM), Linol- (HPODE; 0.9 mM) und Linolensäure (HPOTE; 0.7 mM) an einer Fluofix-Säule; Eluent ACN/0.1 %-ige H_3PO_4 = 60:40 (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm 98
- Abbildung 3.35: Gradienten-HPLC-Trennung des Standardgemisches an einer Fluofix-Säule; Eluent 70 % 0.1 % H_3PO_4 und 30 % ACN (v/v), 5 min isokratisch, in 60 min auf 100 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm 99
- Abbildung 3.36: Gradienten-HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl- (OE; 0.25 mM), Linol- (ODE; 0.15 mM) und Linolensäure (OTE; 0.13 mM) und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide aus Öl- (HPOE; 0.5 mM), Linol- (HPODE; 0.9 mM) und Linolensäure (HPOTE; 0.7 mM) sowie der durch Reduktion mit Natriumborhydrid gebildeten korrespondierenden Hydroxyfettsäuren der Öl- (HOE; 0.5 mM), Linol- (HODE; 0.9 mM) und Linolensäure (HOTE; 0.7 mM) an einer Fluofix-Säule; Eluent 70 % 0.1 % H_3PO_4 und 30 % ACN (v/v), 10 min isokratisch, in 60 min auf 100 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm 100
- Abbildung 3.37: Isokratische HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide sowie der durch Reduktion mit Natriumborhydrid gebildeten korrespondierenden Hydroxyfettsäuren an einer Fluofix-Säule; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195nm 101
- Abbildung 3.38: Fast HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide an einer Rocket-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 42 % 0.1 % H_3PO_4 und 58 % ACN (v/v); Fluß 5 ml/min; Detektion bei 195 nm 102
- Abbildung 3.39: Fast HPLC-Trennung des Standardgemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure und der mit Singulett-Sauerstoff erhaltenen Hydroperoxide an einer Rocket-Säule bei Gradientenelution; Eluent 55 % 0.1 % H_3PO_4 und 45 % ACN (v/v) auf 100 % ACN (v/v) in 5 min; Fluß 5 ml/min; Detektion bei 195 nm 103
- Abbildung 3.40: Vergleich der enzymatischen und alkalischen Hydrolyse von HPDOPC (ESTD) 112

- Abbildung 3.41: HPLC-Untersuchung der in Hanfsamen enthaltenen ungesättigten Fettsäuren; Fluofix-Säule; isokratische Elution; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm 114
- Abbildung 3.42: MEKC-Untersuchung der oxidierten Fettsäuren eines 168 Stunden auf 220°C erhitzten Hanföls (Sorte C); Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195, 234 und 283 nm 116
- Abbildung 3.43: MEKC-LIF-Untersuchung einer 240 Stunden bei 60 °C autoxydierten Distelölprobe; Elektrolyt: 70 % (v/v) 60 mM Natriumphosphatpuffer, 30 % (v/v) Ethanol + 0.5 % Aceton im Outletgefäß, 720 mg/l Brij 35 und 30 mM SDS, 0.4 mM PES; fused-silica Kapillare 40/10/57 cm 118
- Abbildung 3.44: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 29 Stunden Bestrahlung enzymatisch freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 119
- Abbildung 3.45: Photosensibilisierte Oxidation von Eilecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 73 Stunden enzymatisch freigesetzten Fettsäuren und deren Hydroperoxide; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 195 nm 120
- Abbildung 3.46: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; HPLC-Trennung der nach 29 Stunden Bestrahlung enzymatisch freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm 121
- Abbildung 3.47: Zeitlicher Verlauf der Oxidation von Sojalecithin 122
- Abbildung 3.48: HPLC-Muster der nichtoxidierten und oxidierten Fettsäuren in Serumlipiden eines gesunden Probanden an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 234 nm 125
- Abbildung 3.49: HPLC-Muster der nichtoxidierten und oxidierten Fettsäuren in LDL eines Patienten mit stark erhöhtem Cholesterin an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 195 nm 126
- Abbildung 3.50: HPLC-Bestimmung von HODE und HETE in LDL an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H_3PO_4 und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Detektion bei 234 nm 127

Abbildung 3.51: HPLC-Bestimmung von HPODE und HPETE in LDL an einer Fluofix-Säule unter isokratischen Bedingungen; Eluent 45 % 0.1 % H ₃ PO ₄ und 55 % ACN (v/v); Fluß 1 ml/min; Chemilumineszenzdetektion	128
Abbildung 3.52: MEKC-Bestimmung von Fettsäurehydroperoxiden und Hydroxyfettsäuren in LDL vor und nach radikalischer Oxidation; natürliches LDL (rot), oxidiertes LDL und mit HPODE und HPETE aufgestocktes LDL; Elektrolyt: 10 mM Boraxpuffer (pH 9.3), 15 mM SDS, 2.4 % ACN; fused-silica Kapillare 60/67 cm; Feldstärke 448 V/cm; Detektion bei 234 nm	129
Abbildung 5.1: Hauptfenster der Anwendung mit geladenen Einstellungen	133
Abbildung 5.2: ¹ H-NMR-Spektrum von HPOE	153
Abbildung 5.3: ¹³ C-NMR-Spektrum von HPOE	153
Abbildung 5.4: ¹ H-NMR-Spektrum von HPODE	154
Abbildung 5.5: ¹³ C-NMR-Spektrum von HPODE	154
Abbildung 5.6: ¹ H-NMR-Spektrum von HODE	155
Abbildung 5.7: ¹³ C-NMR-Spektrum von HODE	155
Abbildung 5.8: ¹ H-NMR-Spektrum von Di-HPODE	156
Abbildung 5.9: ¹³ C-NMR-Spektrum von Di-HPODE	156
Abbildung 5.10: ¹ H-NMR-Spektrum von HPOTE	157
Abbildung 5.11: ¹³ C-NMR-Spektrum von HPOTE	157
Abbildung 5.12: ¹ H-NMR-Spektrum von γ -HPOTE	158
Abbildung 5.13: ¹³ C-NMR-Spektrum von γ -HPOTE	158
Abbildung 5.14: ¹ H-NMR-Spektrum von HPETE	159
Abbildung 5.15: ¹³ C-NMR-Spektrum von HPETE	159
Abbildung 5.16: ¹ H-NMR-Spektrum von HPOETG	160
Abbildung 5.17: ¹³ C-NMR-Spektrum von HPOETG	160
Abbildung 5.18: ¹ H-NMR-Spektrum von HPDOPC	161
Abbildung 5.19: ¹³ C-NMR-Spektrum von HPDOPC	161
Abbildung 5.20: ³¹ P-NMR-Spektrum von HPDOPC	162
Abbildung 5.21: Kalibriergeraden der Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) bei 195 nm	167
Abbildung 5.22: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bei 195 nm	167
Abbildung 5.23: Kalibriergeraden der Hydroperoxide Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bei 234 nm	168
Abbildung 5.24: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) unter Chemilumineszenzdetektion	168
Abbildung 5.25: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bis 20 μ M unter Fluoreszenzdetektion	169
Abbildung 5.26: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bis 120 μ M unter Fluoreszenzdetektion	169

Abbildung 5.27: Kalibriergeraden der Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) unter Verwendung der Fast-HPLC bei 195 nm	170
Abbildung 5.28: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) unter Verwendung der Fast-HPLC bei 195 nm	170
Abbildung 5.29: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz (eigene Kapillare)	171
Abbildung 5.30: pH-Abhängigkeit der Bildungsreaktion und der Fluoreszenz (eigene Kapillare)	171
Abbildung 5.31: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der PES-Konzentration (0.4-1.2mM); pH 10	172
Abbildung 5.32: Responsevergleich von Borax- und Phosphatpuffer (PES-Konzentration 0.4 mM)	172
Abbildung 5.33: Reaktionsmonomer 0.4 mM PES, Kapillare 40/10/57 cm	173
Abbildung 5.34: Reaktionsmonomer 0.4 mM PES-Methylester, Kapillare 40/10/57 cm	173
Abbildung 5.35: Reaktionsmonomer 0.4 mM PPS, Kapillare 40/10/57 cm	174
Abbildung 5.36: Reaktionsmonomer 0.4 mM PEE, Kapillare 40/10/57 cm	174
Abbildung 5.37: Reaktionsmonomer 0.4 mM Tyramin, Kapillare 40/10/57 cm	175
Abbildung 5.38: Reaktionsmonomer 0.4 mM L-Tyrosin, Kapillare 40/10/57 cm	175
Abbildung 5.39: Trennung des Standardgemisches bestehend aus HPOTE, HPODE, HPOE, OTE, ODE, OE unter Verwendung von cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (C 22:6) als ISTD	176
Abbildung 5.40: Simultane Trennung von HPETE, HETE und ETE	176
Abbildung 5.41: Bildung von Di-Hydroperoxiden bei der Synthese von HPODE	177
Abbildung 5.42: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 45 Stunden Bestrahlung freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide	177
Abbildung 5.43: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 90 Stunden Bestrahlung freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide	178
Abbildung 5.44: HPLC-Muster der nichtoxidierten und oxidierten Fettsäuren in LDL nach radikalischer Oxidation; Detektion bei 195 nm	178
Abbildung 5.45: HPLC-Bestimmung von HPODE und HPETE in LDL nach Radikalstart mittels AMVN; Chemilumineszenzdetektion	179

5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Häufig vorkommende gesättigte Fettsäuren	7
Tabelle 1.2: Biologisch relevante ungesättigte Fettsäuren	7
Tabelle 1.3: Lipidzusammensetzung einiger biologischer Membranen (in Gew.% vom Gesamtlipid)	11
Tabelle 1.4: Normale Konzentrationsbereiche der im Serum vorkommenden Lipide	12
Tabelle 1.5: Normale Verteilung der Lipoproteine im menschlichen Serum	12
Tabelle 1.6: Partikelgröße, Dichtebereich und prozentuale Zusammensetzung der menschlichen Serumlipoproteine	13
Tabelle 1.7: Anzahl der verschiedenen Lipidmoleküle im menschlichen Serumlipoprotein	16
Tabelle 1.8: Verteilung der Fettsäurehydroperoxide in Abhängigkeit der Oxidationsmethode	22
Tabelle 2.1: Bestrahlungsdauer und Ausbeuten der Fettsäurehydroperoxide	32
Tabelle 3.1: Vergleich der Trennparameter zwischen Borax- und Meglumpuffer	65
Tabelle 3.2: Vergleich der Trennparameter der MEKC mit UV-DAD- und LIF-Detektion	85
Tabelle 3.3: Nachweisgrenzen relevanter Fettsäuren, Fettsäurehydroperoxide und Hydroxyfettsäuren	96
Tabelle 3.4: Nachweisgrenzen der Öl-, Linol- und Linolensäure sowie deren Hydroperoxide; Trennung an einer Fluofix-Säule; UV-Detektion bei 195 nm	105
Tabelle 3.5: Nachweisgrenzen der Öl-, Linol- und Linolensäure sowie deren Hydroperoxide; Trennung an einer Rocket-Säule bei Gradientenelution; UV-Detektion bei 195 nm	106
Tabelle 3.6: Nachweisgrenzen der Hydroperoxide aus Öl-, Linol- und Linolensäure; Trennung an einer Fluofix-Säule; Chemilumineszenzdetektion	106
Tabelle 3.7: Nachweisgrenzen der Hydroperoxide aus Öl-, Linol- und Linolensäure; Trennung an einer Fluofix-Säule; Fluoreszenzdetektion	106
Tabelle 3.8: Wiederfindung von Ölsäure (OE) bei enzymatischer Hydrolyse von Diolelylphos- phatidylcholin (DOPC) und Triolein (OETG) unter Verwendung von ISTD und ESTD	108
Tabelle 3.9: Enzymatische Hydrolyse des synthetisierten HPDOPC mit dem Enzym SP 525 in 0.4 M Glycylglycinpuffer	109
Tabelle 3.10: Hydrolyse von DOPC und HPDOPC mit 1N Natronlauge	110
Tabelle 3.11: Freisetzung von HPOE und HOE bei der enzymatischen Hydrolyse von HPDOPC mit SP 525	111
Tabelle 3.12: Freisetzung von HPOE und HOE bei der alkalischen Hydrolyse von HPDOPC mit Natronlauge	111
Tabelle 3.13: Verhältnis von α - und γ -Linolensäure in Prozent in verschiedenen Hanfsamen; Untersuchung mittels GC-, HPLC- und CE-Methoden	115
Tabelle 3.14: Fettsäurehydroperoxidgehalt thermisch belasteter Öle	117
Tabelle 5.1: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPOE	163
Tabelle 5.2: ^1H -NMR-Daten von HPOE	163

Tabelle 5.3: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPODE	163
Tabelle 5.4: ^1H -NMR-Daten von HPODE	164
Tabelle 5.5: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPOTE	164
Tabelle 5.6: ^1H -NMR-Daten von HPOTE	164
Tabelle 5.7: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPETE	165
Tabelle 5.8: ^1H -NMR-Daten von HPETE	165
Tabelle 5.9: ^1H -NMR-Daten von HPDOPC	165
Tabelle 5.10: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPDOPC	166

5.5 Chemikalienliste

ω -6 Ölsäure, 99+ %	Aldrich, Steinheim
ω -9 Ölsäure, 99+ %, (OE)	Sigma, Deisenhofen
(S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propionsäure, 99 % (L-Tyrosin)	Fluka, Neu-Ulm
13S-Hydroperoxy-oktadeka-9Z,11E,15Z-triensäure	Syntheseprodukt
13S-Hydroperoxy-oktadeka-9Z,11E-diensäure	Syntheseprodukt
1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) > 99 %	Sigma, Deisenhofen
1-Propanol, p. A.	Merck, Darmstadt
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol, > 97 % (PEE)	Fluka, Neu-Ulm
2-(4-Hydroxyphenyl)-ethylamin, > 99 % (Tyramin)	Fluka, Neu-Ulm
2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril)	Wako, Düsseldorf
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES) > 99 %	Sigma, Deisenhofen
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (AMPD)	Fluka, Neu-Ulm
2-Propanol, p. A.	Merck, Darmstadt
3-(Triethoxysilyl)-propylamin, p. A.	Merck, Darmstadt
4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, > 98 %, (PBS)	Fluka, Neu-Ulm
4-Hydroxyphenylelessigsäure, p. A. (PES)	Merck, Darmstadt
4-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester, 99 % (PES-Methylester)	Fluka, Neu-Ulm
4-Hydroxyphenylpropionsäure, > 99 %, (Phloretinsäure), (PPS)	Fluka, Neu-Ulm
4-Methoxyphenylelessigsäure, > 97 % (PES-Methylether)	Fluka, Neu-Ulm
4-Methoxyphenylelessigsäuremethylester, > 97 % (PES-Methylether-ester)	Aldrich, Steinheim
7-Aminonaphthalin-1,3-disulfonsäure, > 98 %, (Amino G-Säure)	Fluka, Neu-Ulm
Aceton, p. A.	Merck, Darmstadt
Acetonitril, LiChrosolv	SDS, Rastatt
Ammoniaklösung; 25 %	Fluka, Neu-Ulm
Arachidonsäure	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid, p. A.	Merck, Darmstadt
Chloroform für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Cyanacrylat, Sekundenkleber	UHU GmbH, Bühl

DC-Folien Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Deuteriochloroform	Merck, Darmstadt
Dicyclohexylcarbodiimid	Merck, Darmstadt
Diethylether, p. a.	Merck, Darmstadt
Diethylether, techn.	Chemikalienlager
di-Kaliumhydrogenphosphat, p. A.	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat, p. A.	Merck, Darmstadt
Distelöl	Firma Vitus
Eilecithin-Rohware	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure, 100 % p. a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, 96 %, reinst	Merck, Darmstadt
Glycylglycin, > 99 %	Merck, Darmstadt
Hexan für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Hexan, Uvasol	Merck, Darmstadt
Isoluminol (4-Aminophthalsäurehydrazid)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Linolensäure, (OTE)	Sigma, Deisenhofen
Linolensäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
Linolsäure, (ODE)	Sigma, Deisenhofen
Linolsäurecholesterinester	Sigma, Deisenhofen
Linolsäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
Lipase Aspergillus niger	Fluka, Neu-Ulm
Lipase candida lipolytica	Fluka, Neu-Ulm
Lipase hog pancreas	Fluka, Neu-Ulm
Lipase Lipozym	Fluka, Neu-Ulm
Lipase LPL	Amano, Nagoya (Japan)
Lipase mucor javanicus	Fluka, Neu-Ulm

Lipase penicillum roqueforte	Fluka, Neu-Ulm
Lipase PPL	Sigma, Deisenhofen
Lipase SAM II	Amano, Nagoya
Luminol (3-Aminophthalsäurehydrazid)	Aldrich, Steinheim
Meglumin (N-Methyl-D-glucamin), > 99 %	Sigma, Deisenhofen
Methanol gradient grade für HPLC	Merck, Darmstadt
Mikroperoxidase MP-11 immobilisiert auf Amin-Beads	Produkt von K. Heitkamp
Mikroperoxidase MP-11, aus Schweineherz-Cytochrome C, 91 %	Sigma, Deisenhofen
Monoglyme	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylphenylendiamin	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylphenylendiaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Naphthalin-1,5-disulfonsäure, > 97 %	Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat, p. A.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, Reagenz DAB, Ph Eur	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, p. A.	Merck, Darmstadt
Natriummethylat, 30 %-ige Lsg. in Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumtetraborat (Borax)	Merck, Darmstadt
N-Methyl-N-nitroso-4-toluolsäuresulfonamid (Diazald)	Aldrich, Steinheim
Ölsäure, 99+ %	Aldrich, Steinheim
Ölsäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
PES-Dimer	Syntheseprodukt von W. V. Turner
Phthalsäure, p. A.	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylenlaurylether (Brij 30)	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylenlaurylether (Brij 35)	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 37 % p.A.	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure p.A.	Merck, Darmstadt
Schweineleber-Esterase	Boehringer, Mannheim
Sojalecithin-Rohware	Fluka, Neu-Ulm

SP 525 (Novozym)	Novo Nordisk, Kopenhagen
Tetrahydrofuran, p. A.	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Tridest. Wasser	BUGH Wuppertal
Trilinolen	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Triton X 100	Fluka, Neu-Ulm
Tween 80	Fluka, Deisenhofen

5.6 Geräteliste

Kapillarelektrophorese-System	- Beckman P/ACE 5510 Diodenarray-Detektor LIF-Detektor (He-Cd) Steuerungs- und Auswertesoftware P/ACE Station Version 1.1
CE-Kapillaren	- CS-Chromatographie-Service Fused-silica Kapillare ID: 50 µm Amin-Kapillare ID: 50 µm - Beckman Amin-Kapillare ID: 50 µm - Hewlett Packard PVA-Kapillare ID: 50 µm PVA (Ext. Light Path)-Kapillare ID: 50 µm - MPI Mühlheim PVA-Kapillare ID: 50 µm PEG-Kapillare ID: 50 µm
HPLC-System	- Waters 2690 UV-VIS-Detektor Merck Hitachi L-7420 Intelligent CL Detector Jasco CL-825 Steuerungs- und Auswertesoftware Millenium ³² Version 3.5
HPLC-Säule	- Fluorifix-RP-Säule NEOS Company Säulenmaße: 250 mm * 46 mm ID Teilchengröße: 5 µm, Porengröße 120 Å Oberfläche: 300 m ² /g (no end-capping)
NMR-Gerät	- Bruker ARX 400 ¹ H-NMR 400 MHz ¹³ C-NMR 100 MHz
Spleißgerät	- Felten und Guillaume OSG-15 Köln, Deutschland
Schüttler	- Eppendorff Mixer 5432

5.7 Ergänzende Abbildungen

5.7.1 NMR-Spektren

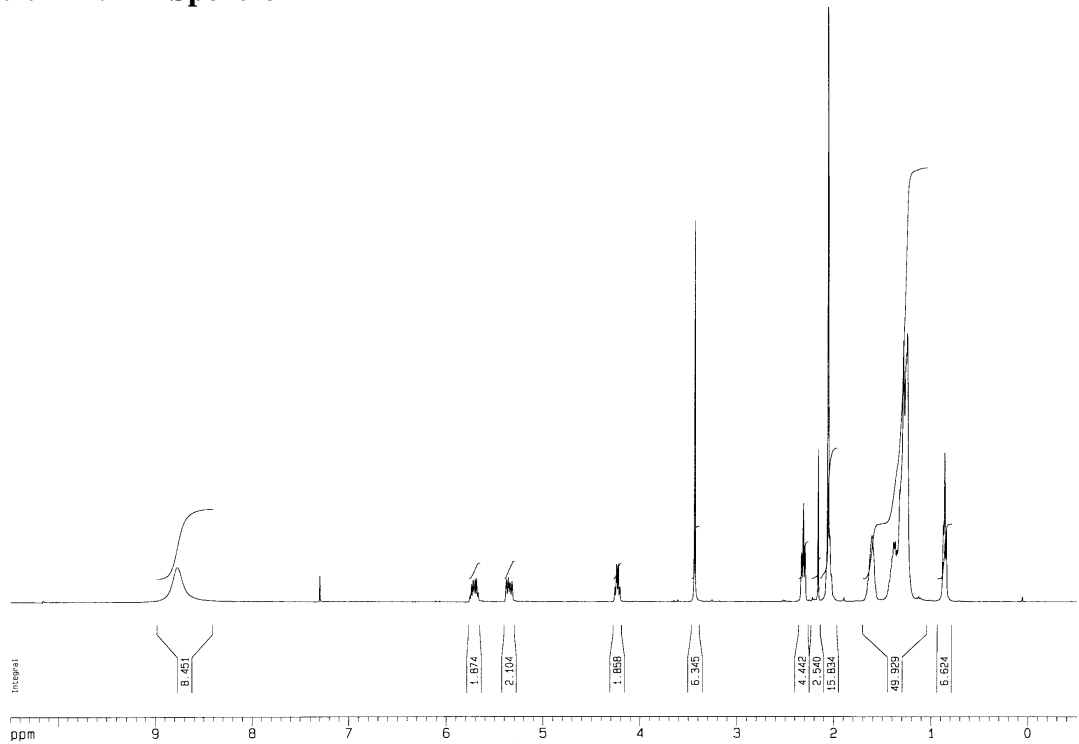


Abbildung 5.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von HPOE

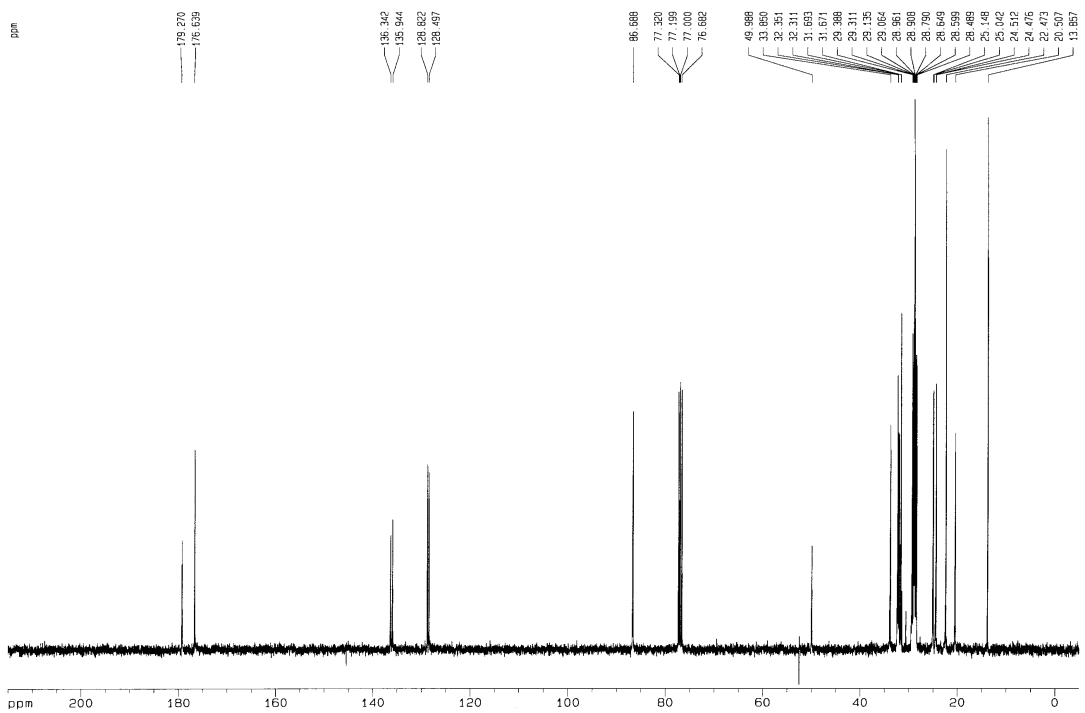
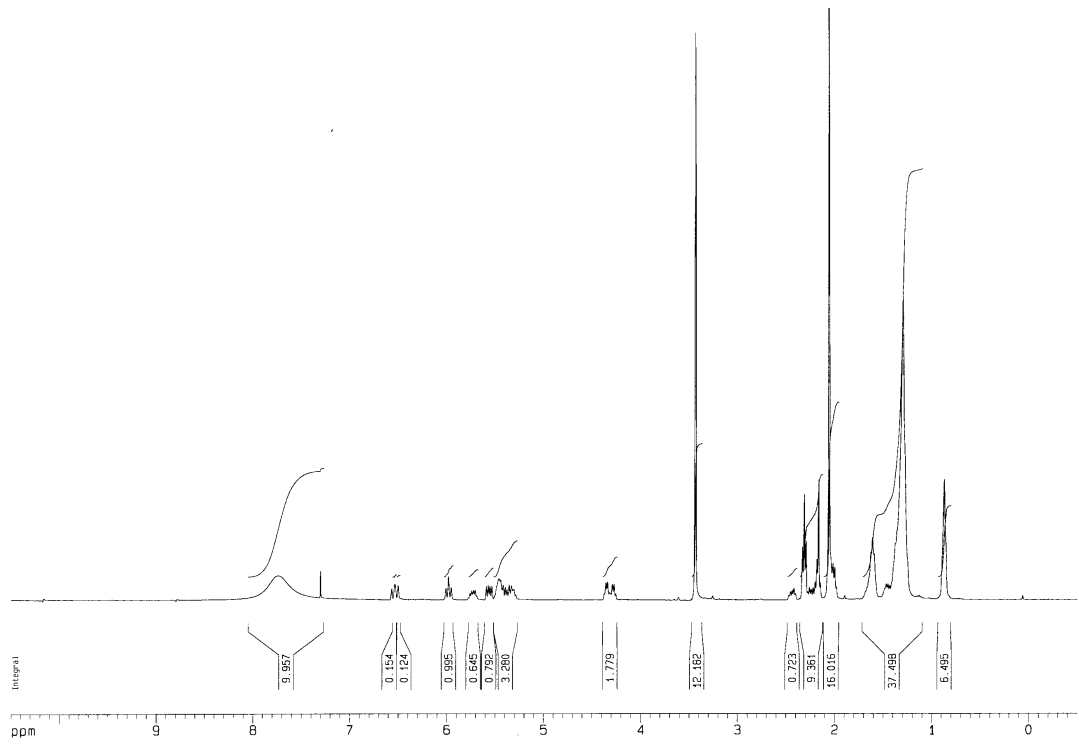
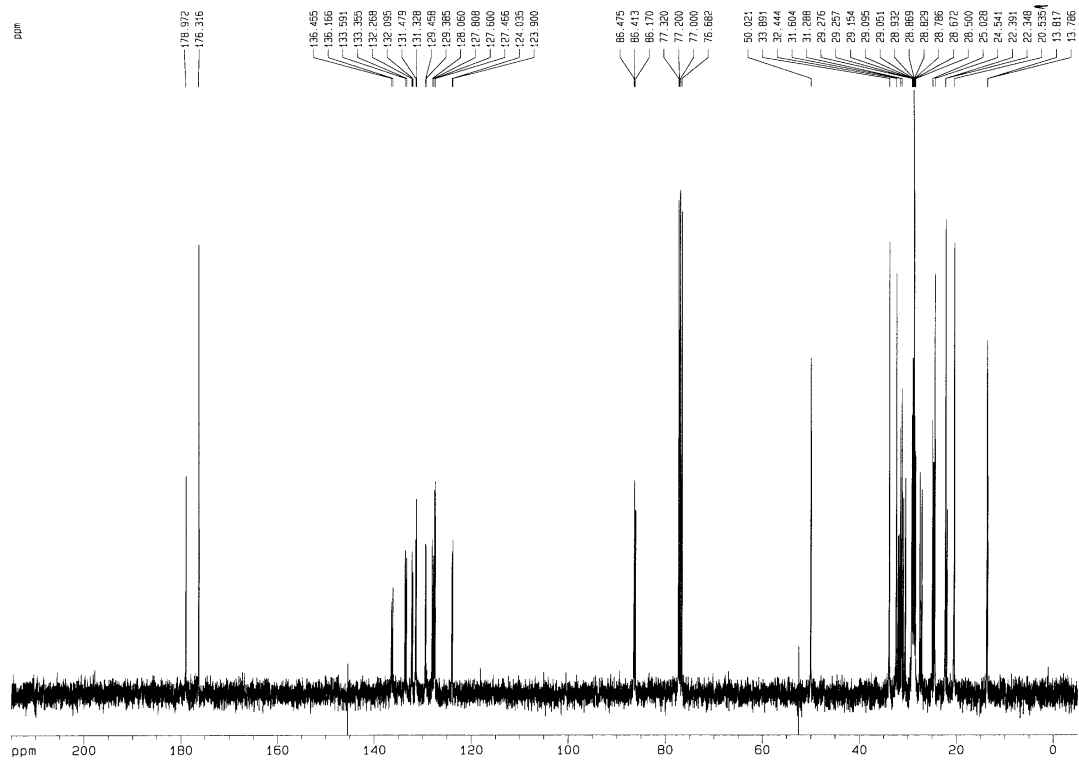


Abbildung 5.3: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von HPOE

Abbildung 5.4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von HPODEAbbildung 5.5: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von HPODE

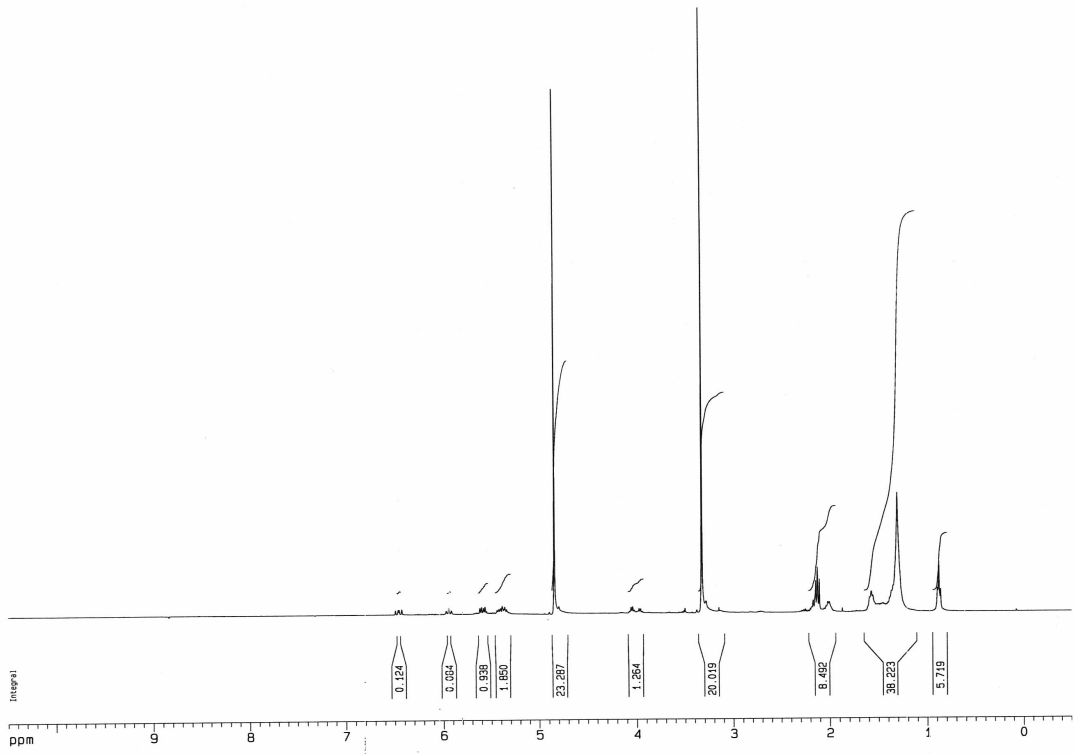


Abbildung 5.6: ¹H-NMR-Spektrum von HODE

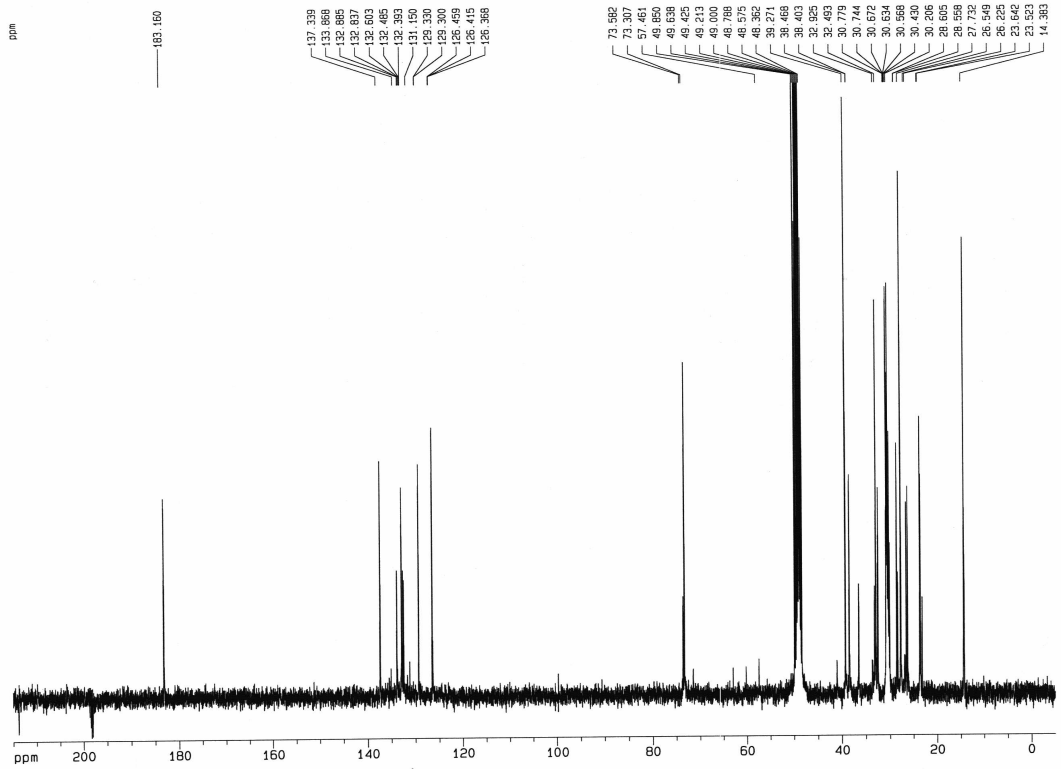
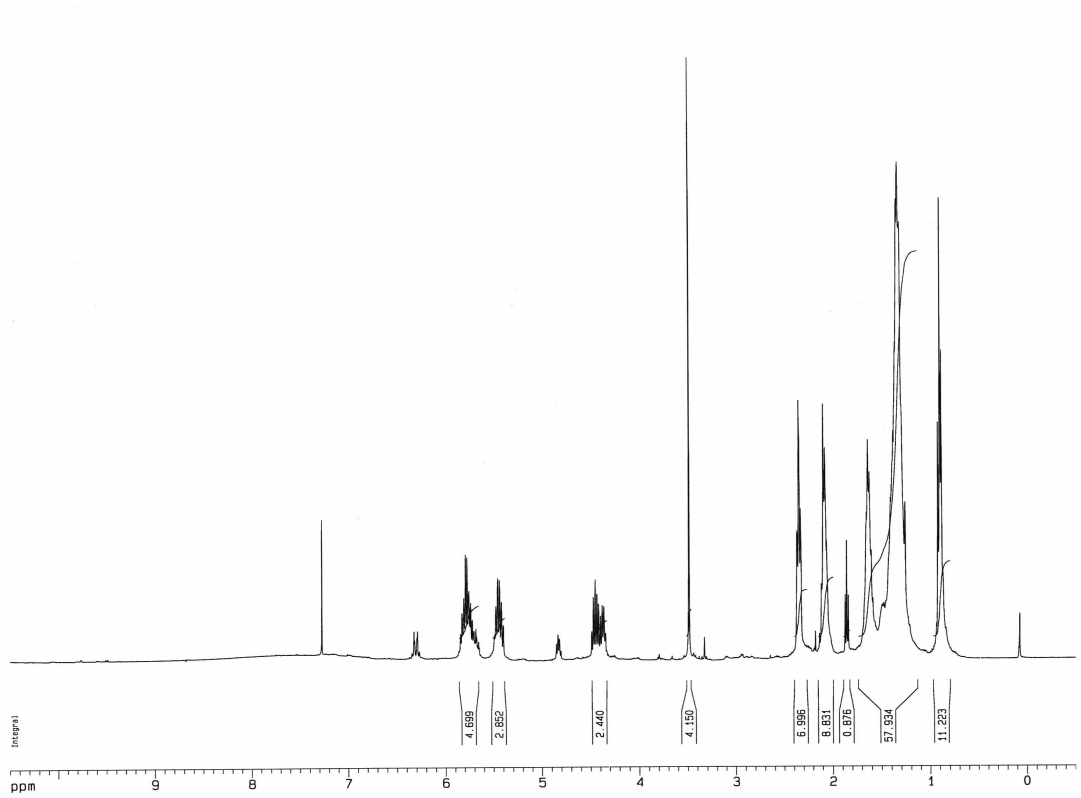
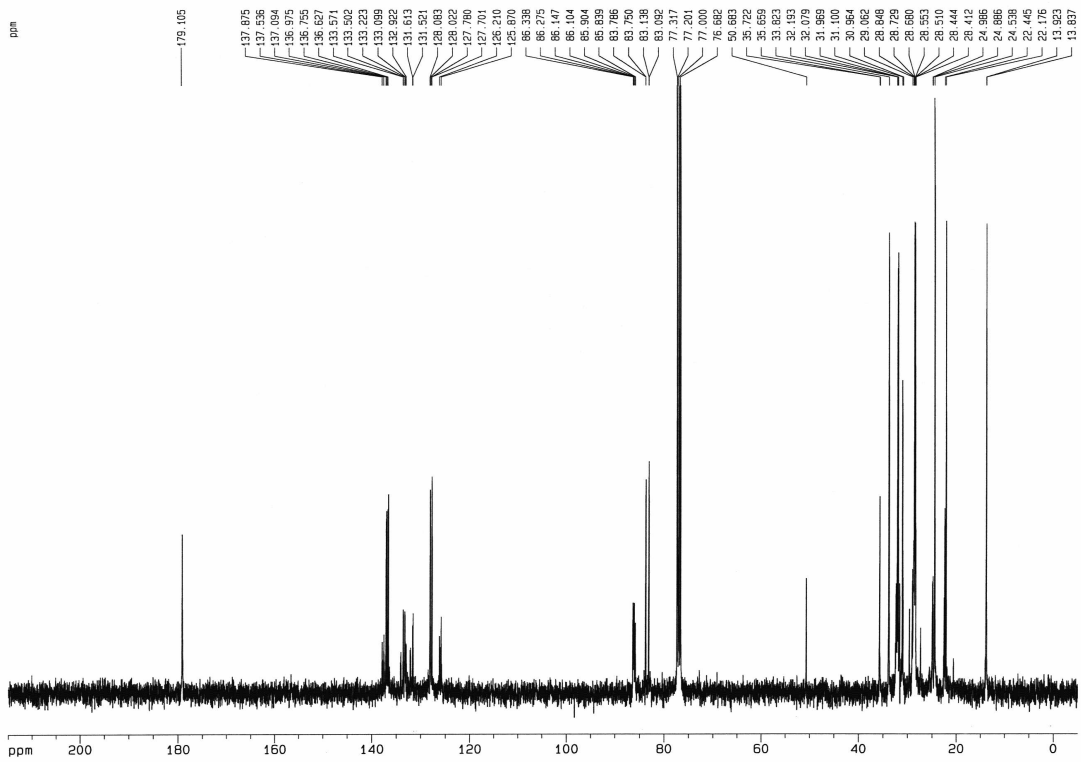


Abbildung 5.7: ¹³C-NMR-Spektrum von HODE

Abbildung 5.8: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Di-HPODEAbbildung 5.9: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Di-HPODE

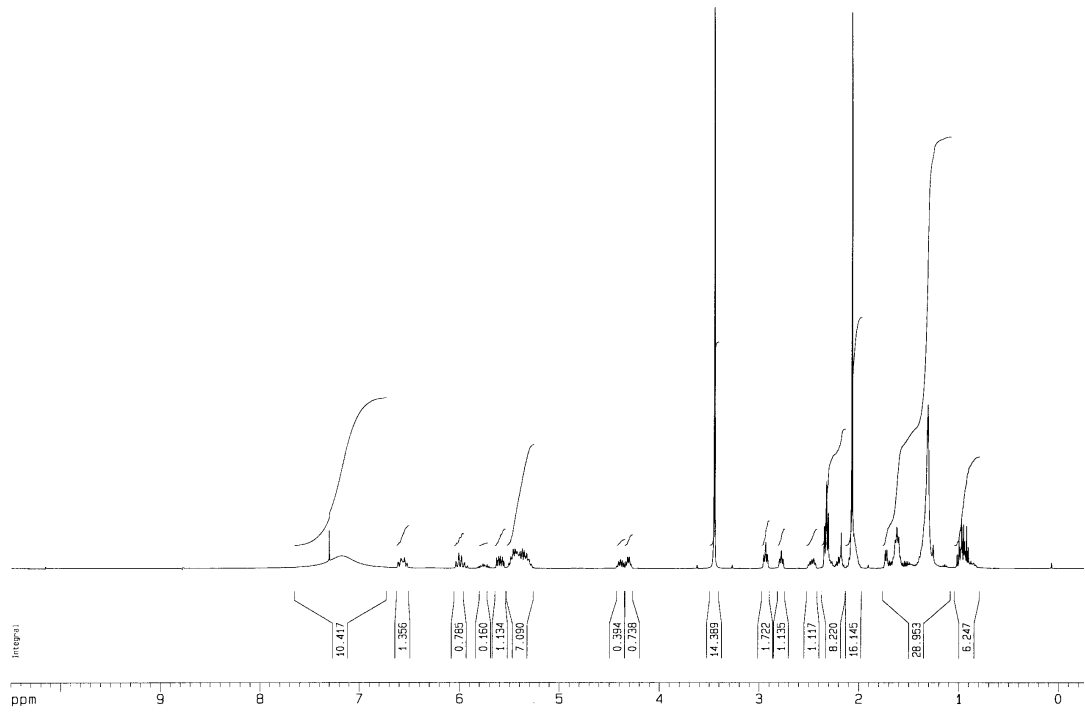


Abbildung 5.10: ¹H-NMR-Spektrum von HPOTE

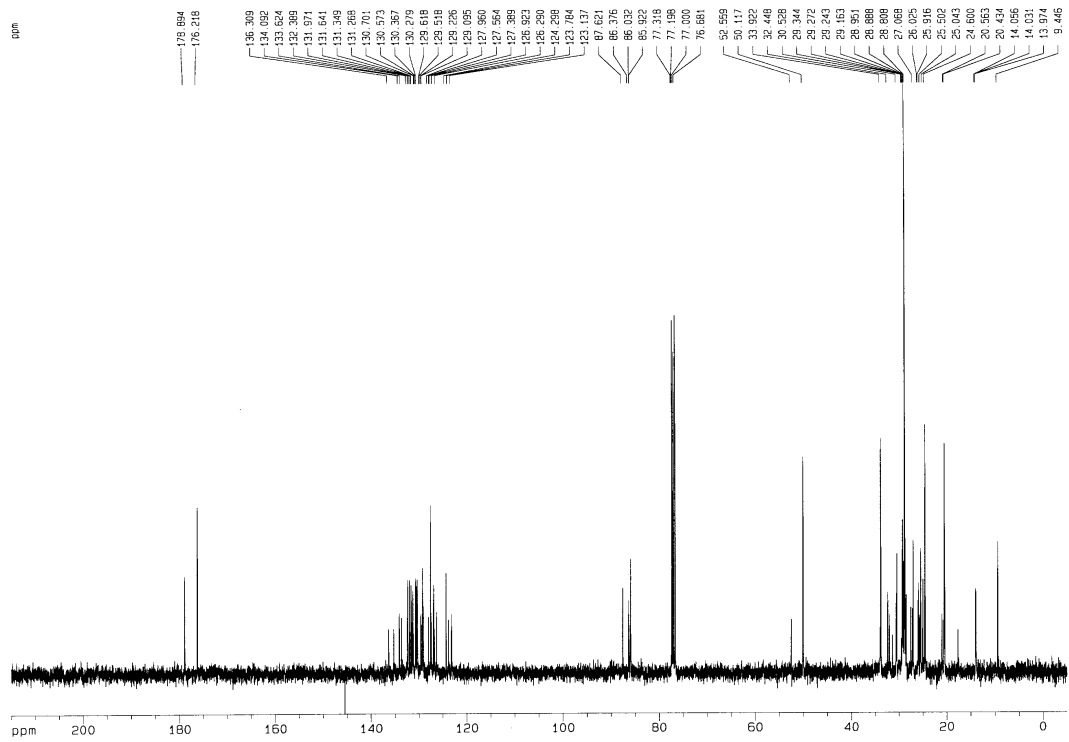
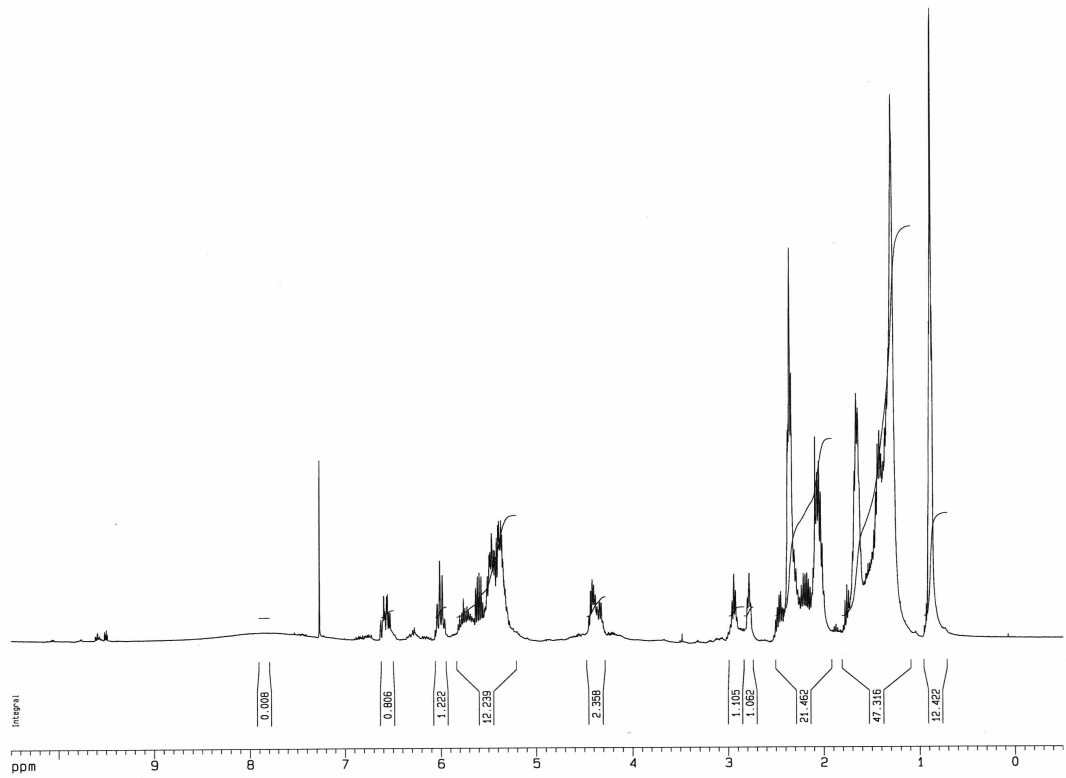
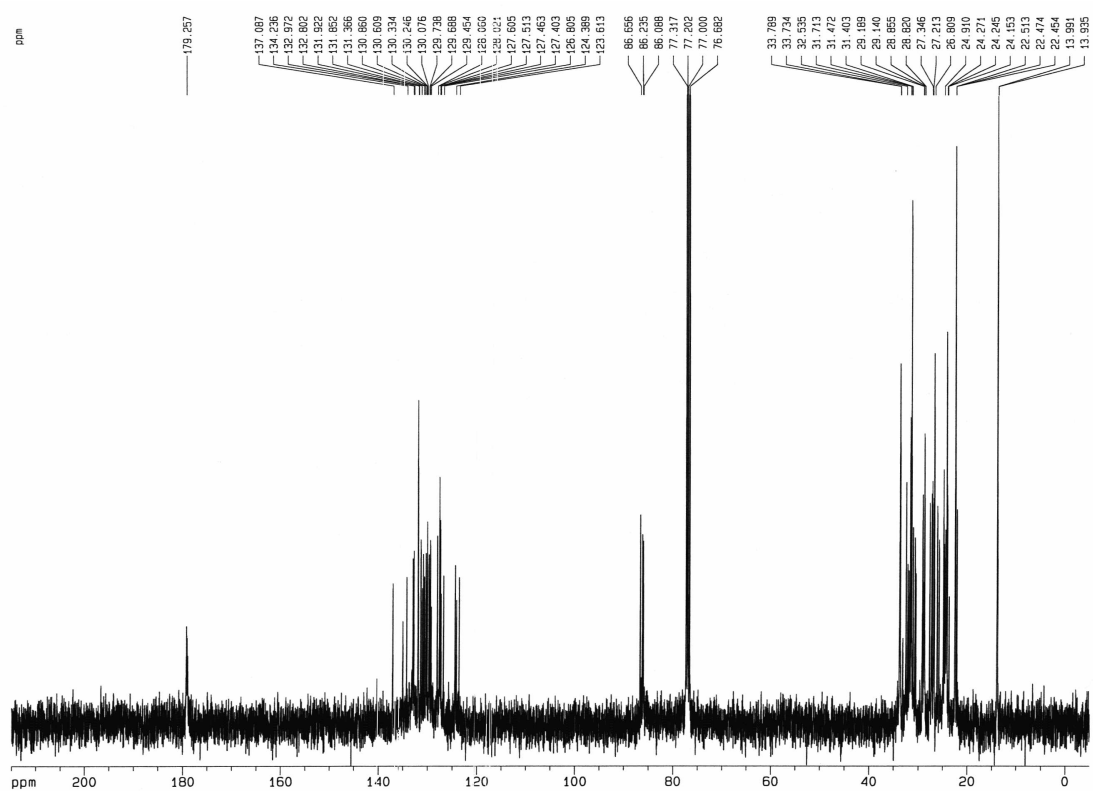


Abbildung 5.11: ¹³C-NMR-Spektrum von HPOTE

Abbildung 5.12: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von g-HPOTEAbbildung 5.13: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von g-HPOTE

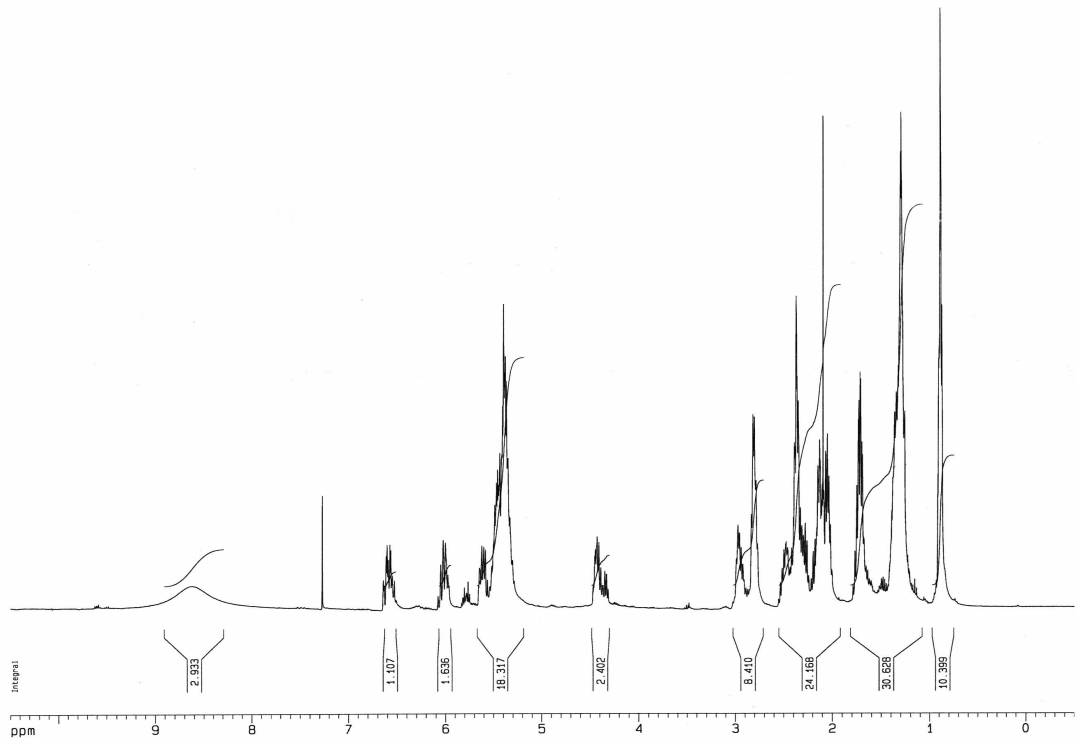


Abbildung 5.14: ¹H-NMR-Spektrum von HPETE

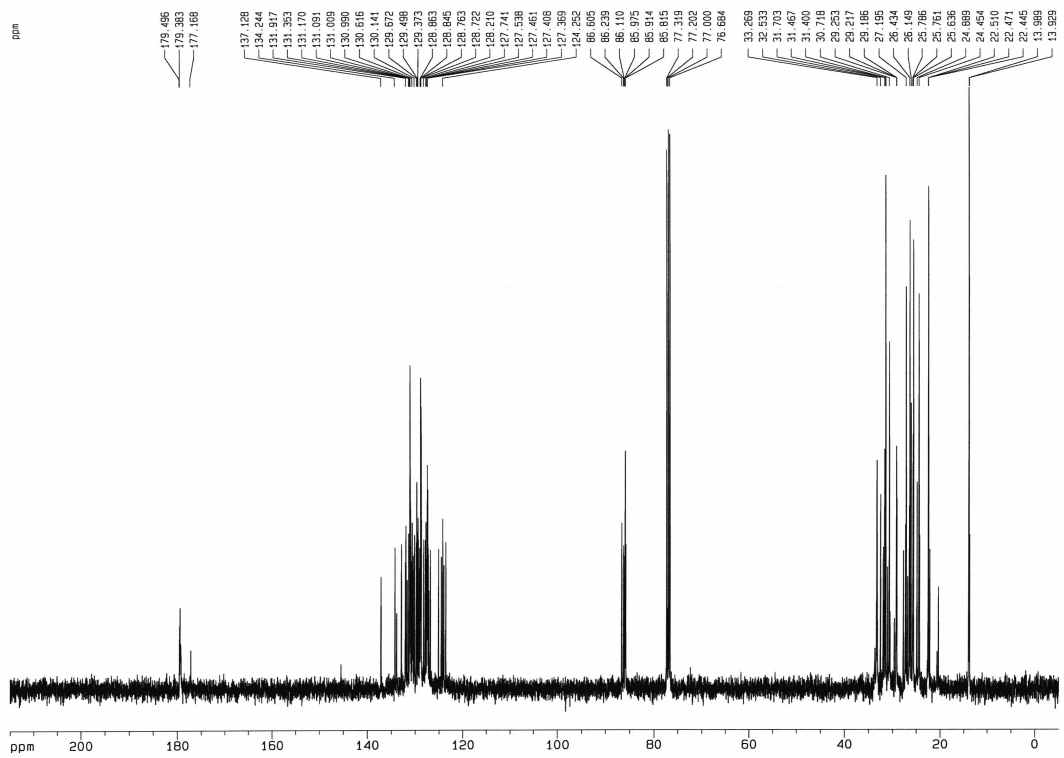
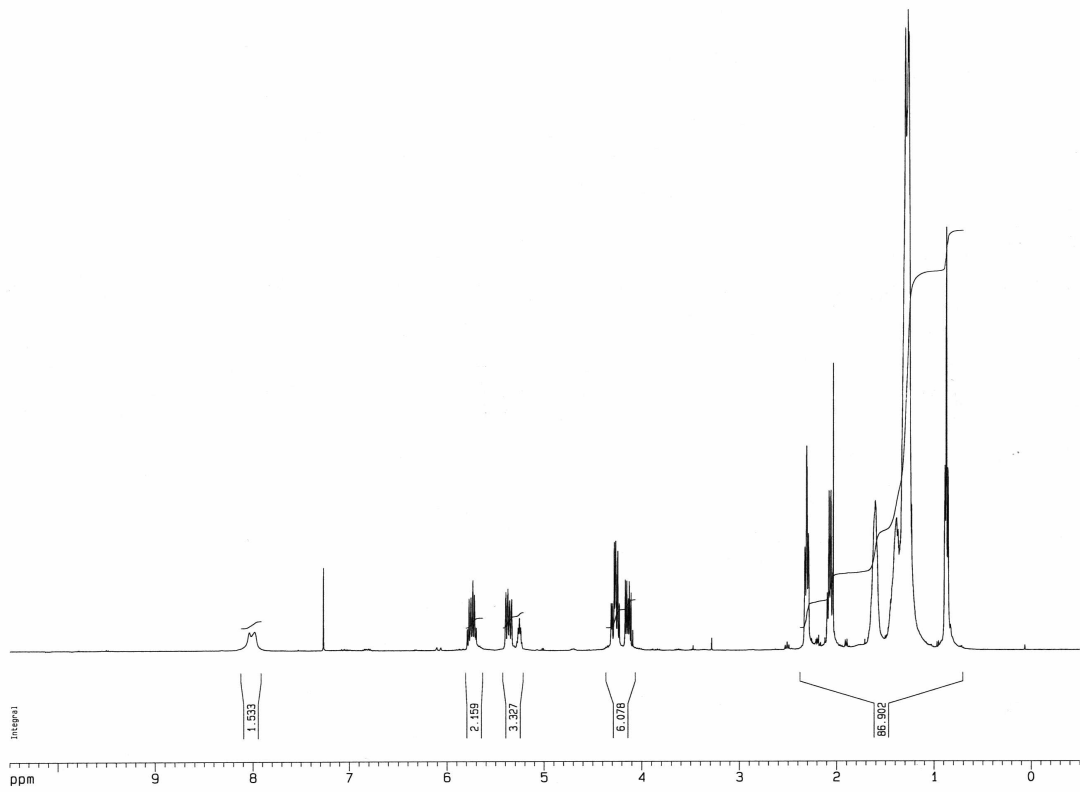
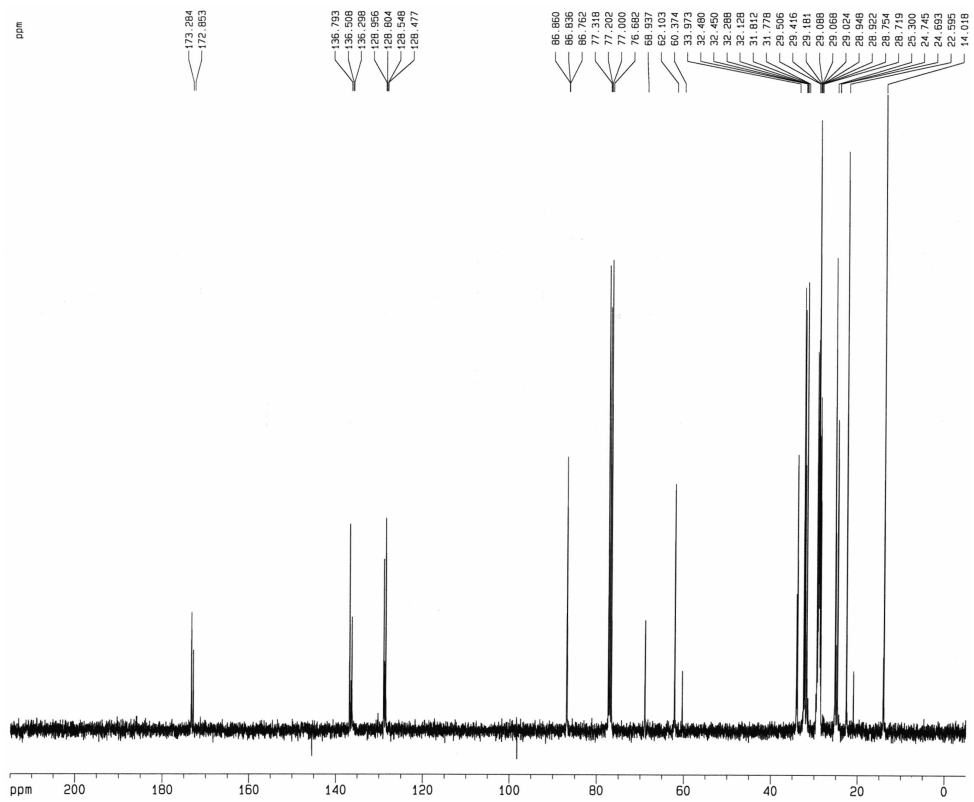


Abbildung 5.15: ¹³C-NMR-Spektrum von HPETE

Abbildung 5.16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von HPOETGAbbildung 5.17: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von HPOETG

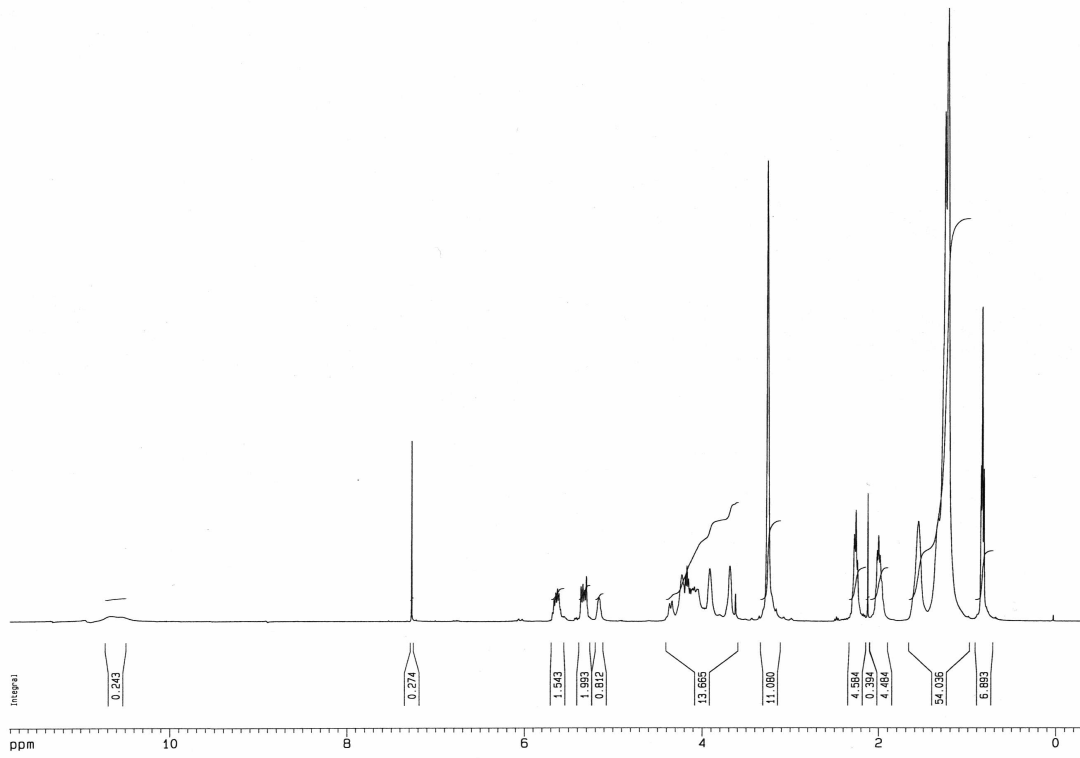


Abbildung 5.18: ¹H-NMR-Spektrum von HPDOPC

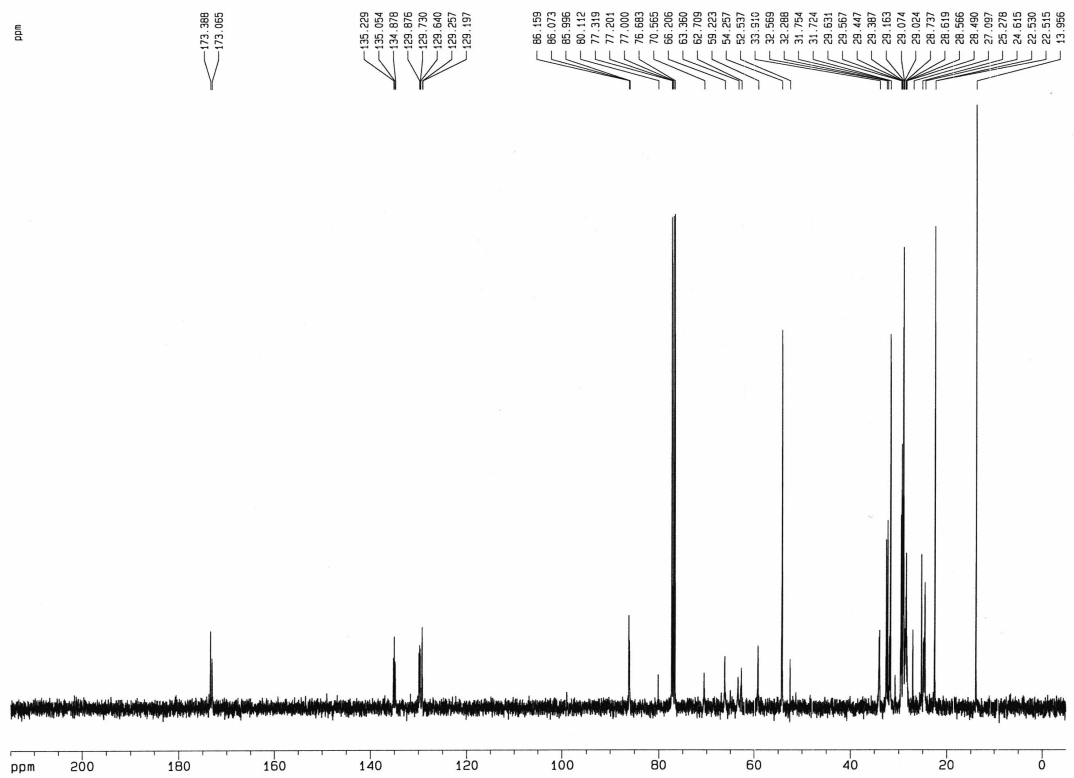


Abbildung 5.19: ¹³C-NMR-Spektrum von HPDOPC

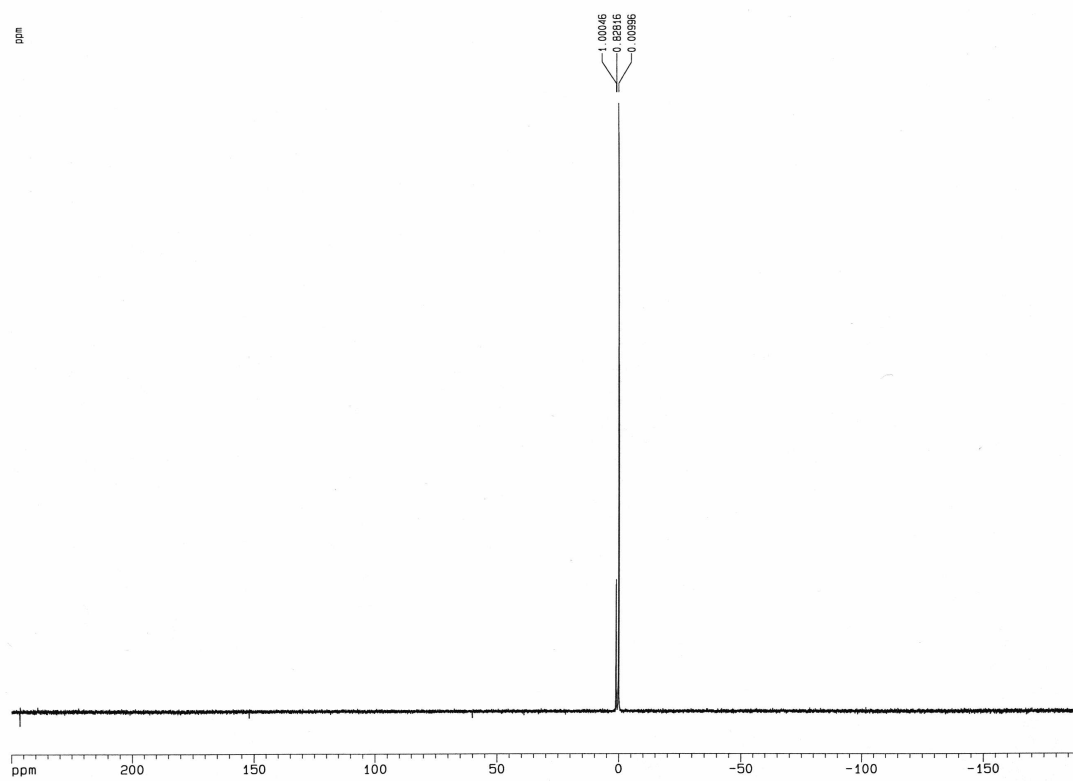


Abbildung 5.20: ^{31}P -NMR-Spektrum von HPDOPC

5.7.2 NMR-Daten

	HPOE δ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	13.86
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_{13}\text{-}$	22.47 – 33.85 (23 Signale)
$-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	128.49, 128.82, 135.94, 136.34
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	86.65, 86.67
$-\underline{\text{C}}\text{OOH}$	179.27, 179.29

Tabelle 5.1: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPOE

	HPOE	
	δ [ppm]	Integral
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0.84 – 0.88	3.0
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_{13}\text{-}$	1.22 – 2.36	25.8
$-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	5.29 – 5.80	1.80
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	4.21 – 4.26	0.84
$-\text{CH-OO}\underline{\text{H}}$	≈ 8.8	Nicht bestimmbar
$-\text{COO}\underline{\text{H}}$		

Tabelle 5.2: ^1H -NMR-Daten von HPOE

	HPODE δ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	13.77, 13.79, 13.80, 13.83
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_{11}\text{-}$	22.35 – 33.89 (42 Signale)
$-(\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H})_2\text{-}$	123.90, 124.04, 127.47, 127.60, 127.81, 128.06, 129.39, 129.46, 131.33, 131.48, 132.10, 132.27 133.36, 133.59, 136.17, 136.46
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	86.17, 86.42, 86.45, 86.48
$-\underline{\text{C}}\text{OOH}$	178.95, 178.97

Tabelle 5.3: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPODE

	HPODE	
	δ [ppm]	Integral
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0.87 – 0.88	3.0
$\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-}$	1.30 – 2.33	22.0
$\text{-(CH=CH)}_2\text{-}$	5.36 – 6.53	2.8
-CH-OOH	4.28 – 4.36	0.8
-CH-OOH	≈ 7.7	Nicht bestimmbar
-COOH		

Tabelle 5.4: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von HPODE

	HPOTE
	δ [ppm]
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	13.97 – 14.06 (5 Signale)
$\text{-(CH}_2\text{)}_9\text{-}$	20.56 – 33.92 (49 Signale)
$\text{-(CH=CH)}_3\text{-}$	123.14 – 136.31 (31 Signale)
-CH-OOH	85.92 – 87.62 (6 Signale)
-COOH	178.89

Tabelle 5.5: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPOTE

	HPOTE	
	δ [ppm]	Integral
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0.91 – 1.01	3.0
$\text{-(CH}_2\text{)}_9\text{-}$	1.26 – 2.94	19.8
$\text{-(CH=CH)}_3\text{-}$	5.33 – 6.71	5.1
-CH-OOH	4.27 – 4.53	0.60
-CH-OOH	≈ 9.9	Nicht bestimmbar
-COOH		

Tabelle 5.6: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von HPOTE

	HPETE δ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	13.92 – 13.99 (2 Signale)
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_9\text{-}$	22.44 – 33.27 (20 Signale)
$-(\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H})_4\text{-}$	124.25 – 137.13 (24 Signale)
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	85.81 – 86.61 (6 Signale)
$-\underline{\text{C}}\text{OOH}$	177.17 – 179.50 (3 Signale)

Tabelle 5.7: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPETE

	HPETE	
	δ [ppm]	Integral
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0.87 – 0.95	3.0
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_9\text{-}$	1.15 – 2.99	18.2
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	4.31 – 4.47	0.7
$-(\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H})_4\text{-}$	5.28 – 6.64	6.1
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	≈ 8.6	Nicht bestimmbar
$-\underline{\text{C}}\text{OOH}$		

Tabelle 5.8: ^1H -NMR-Daten von HPETE

	HPDOPC	
	δ [ppm]	Integral
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0.84 – 0.88	6.0
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_{26}\text{-}$	1.22 – 2.36	25.8
$(\text{CH}_3)_3\text{- Cholinrestes}$	3.25	9.6
$-\text{CH-OOH}; -\text{CH}_2\text{- Triglycerids}$	4.21 – 4.26	0.8
$-\text{CH}=\text{CH-}; -\text{CH- Triglycerids}$	5.29 – 5.80	3.8
$-\text{CH-OOH}$	≈ 10.7	Nicht bestimmbar

Tabelle 5.9: ^1H -NMR-Daten von HPDOPC

	HPDOPC δ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	13.96
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_{26}\text{-}$	22.52 – 34.02
$\text{CH}_3\text{- Cholinrestes}$	54.26
$-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_2\text{- Triglycerid}$	59.22-66.20
$-\text{CH- Cholinrest}$	70.58
$-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	129.20 - 135.23
$-\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	86.0 - 86.16
$-\underline{\text{C}}\text{OOH}$	173.07, 173.39

Tabelle 5.10: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten von HPDOPC

5.7.3 Kalibriergeraden

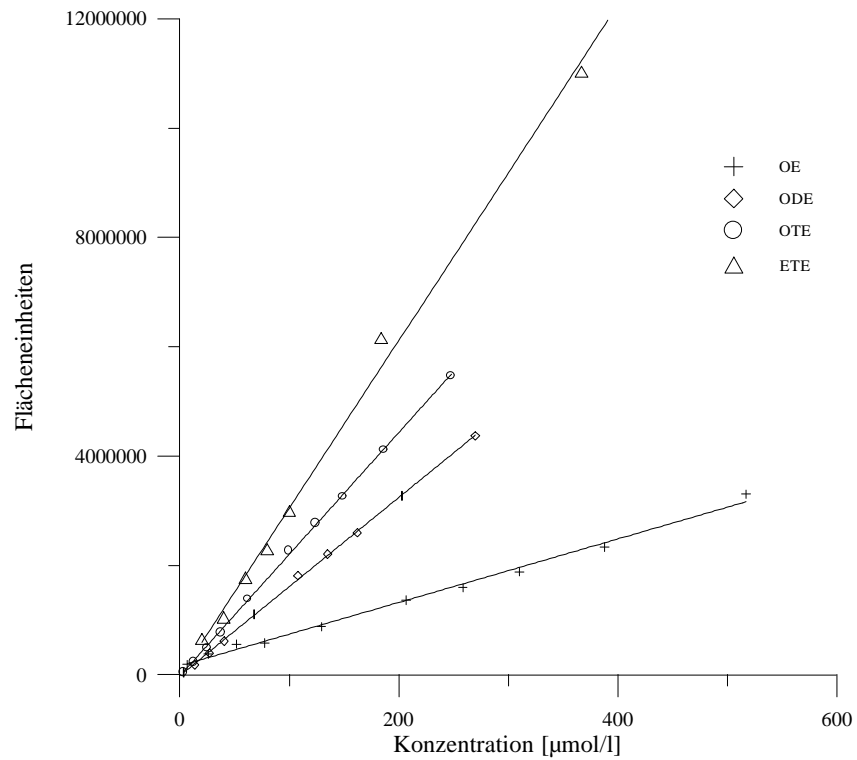


Abbildung 5.21: Kalibriergeraden der Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) bei 195 nm

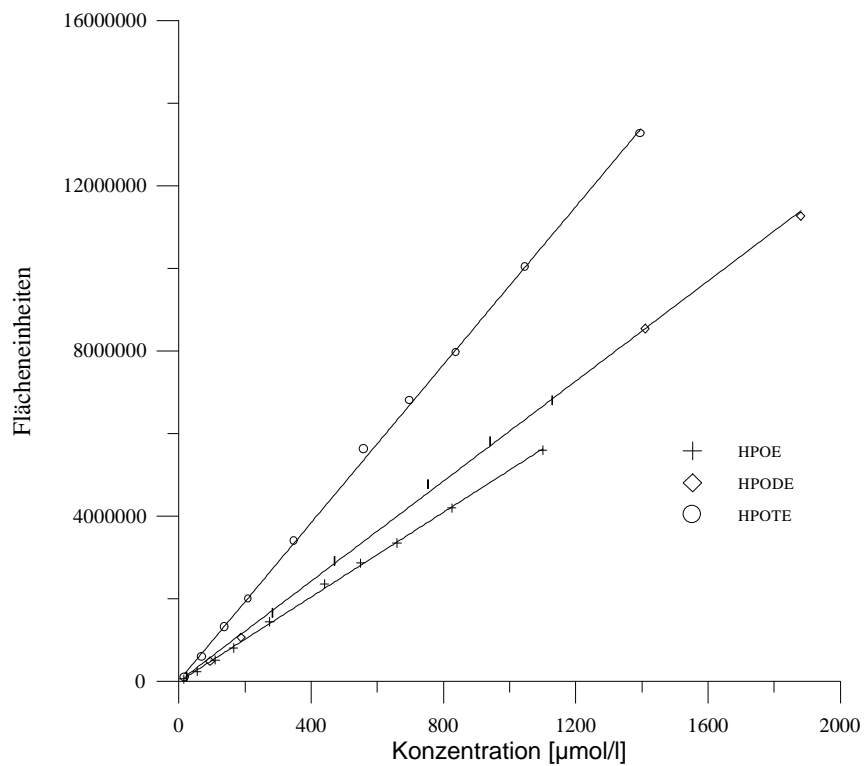


Abbildung 5.22: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bei 195 nm

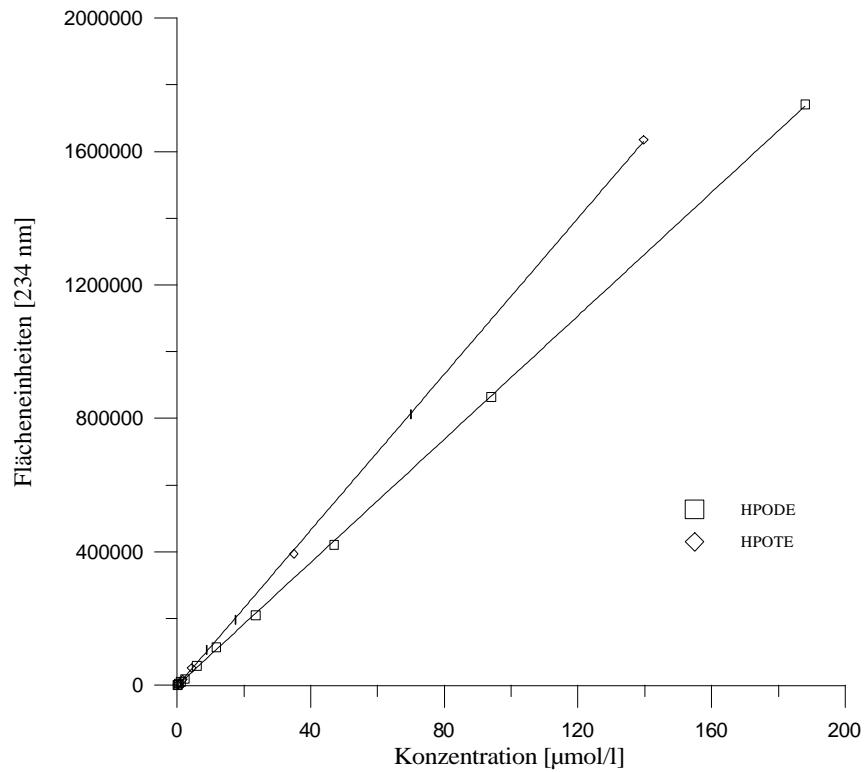


Abbildung 5.23: Kalibriergeraden der Hydroperoxide Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bei 234 nm

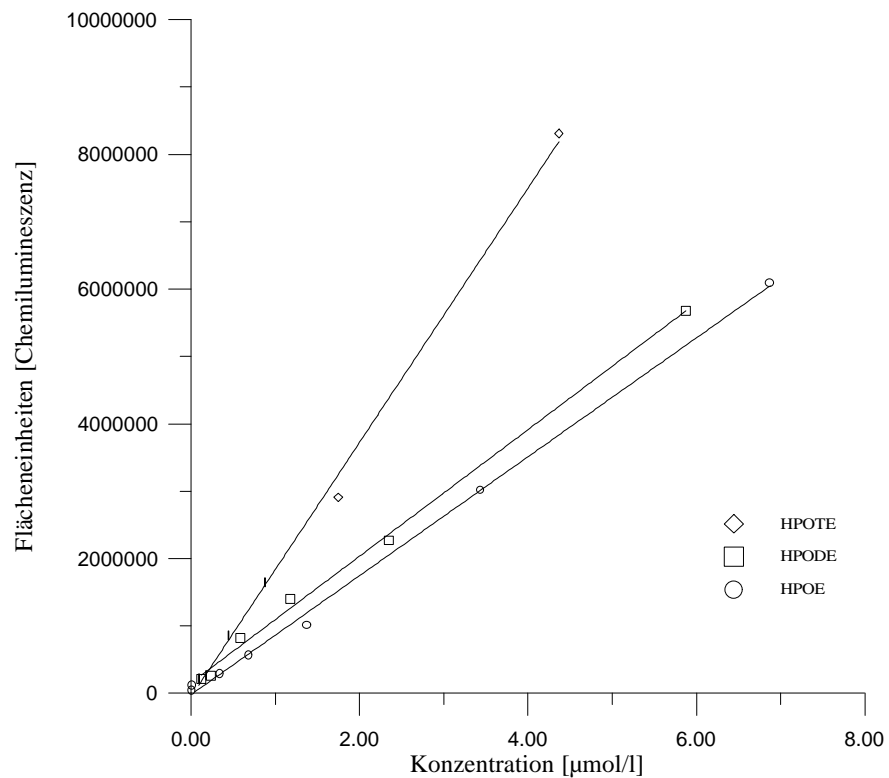


Abbildung 5.24: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) unter Chemilumineszenzdetektion

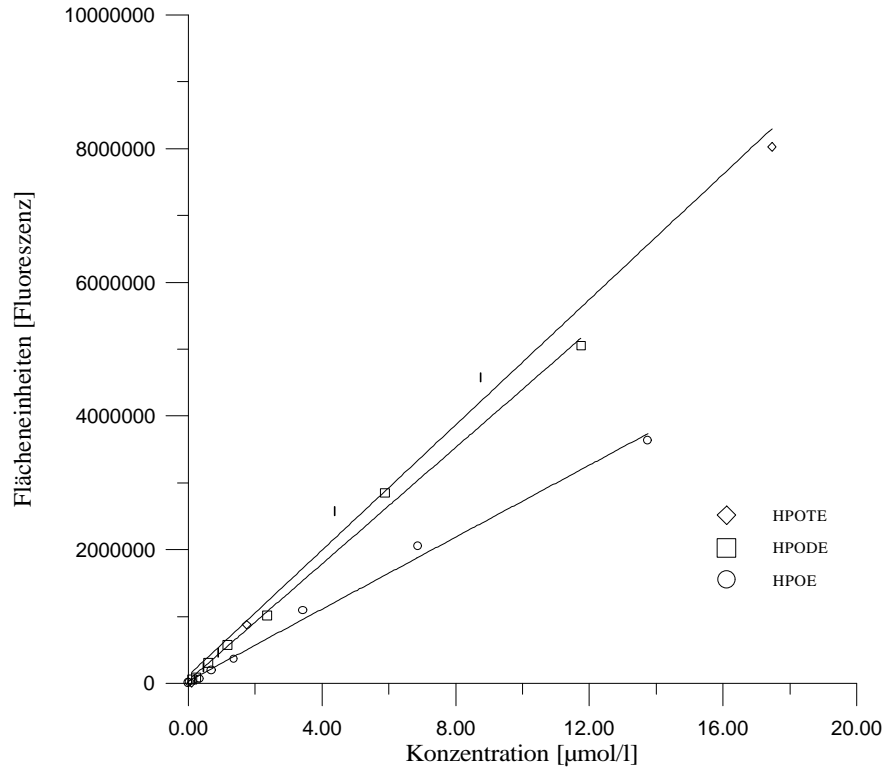


Abbildung 5.25: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bis 20 µM unter Fluoreszenzdetektion

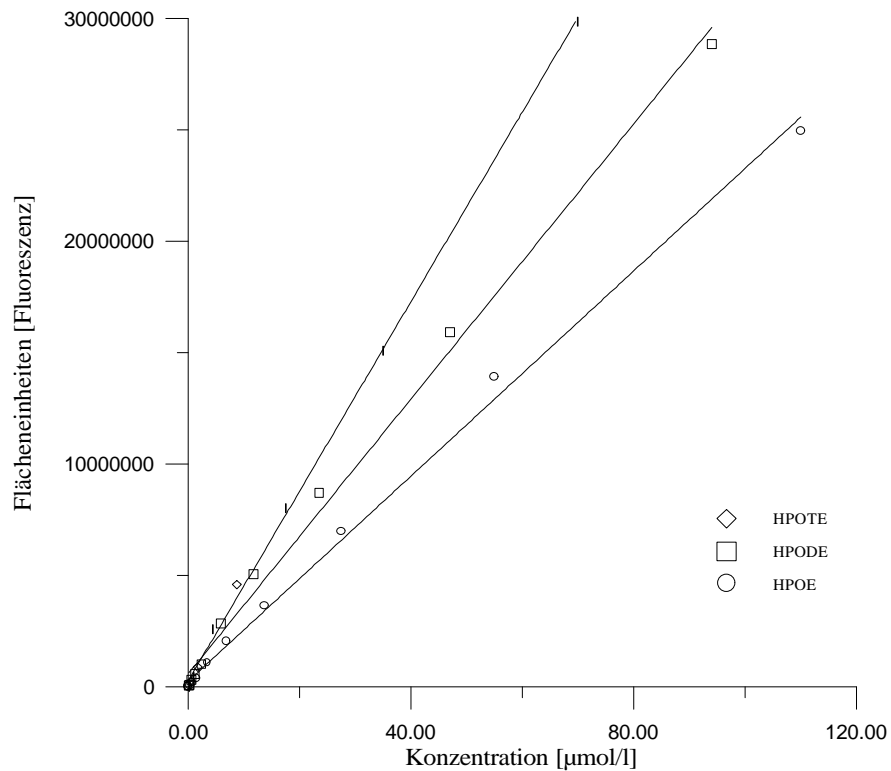


Abbildung 5.26: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) bis 120 µM unter Fluoreszenzdetektion

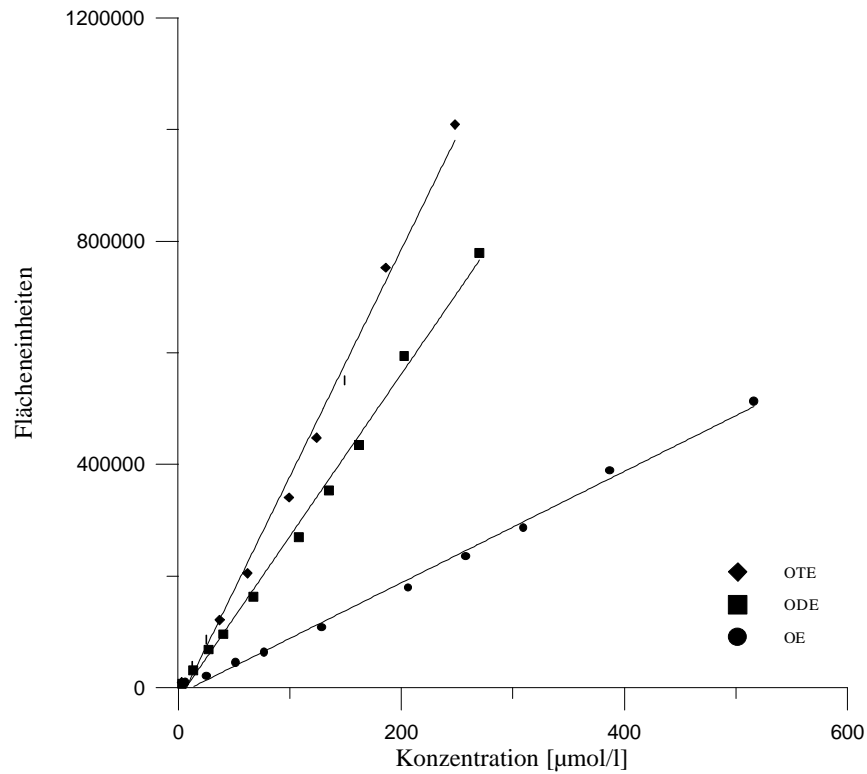


Abbildung 5.27: Kalibriergeraden der Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) unter Verwendung der Fast-HPLC bei 195 nm

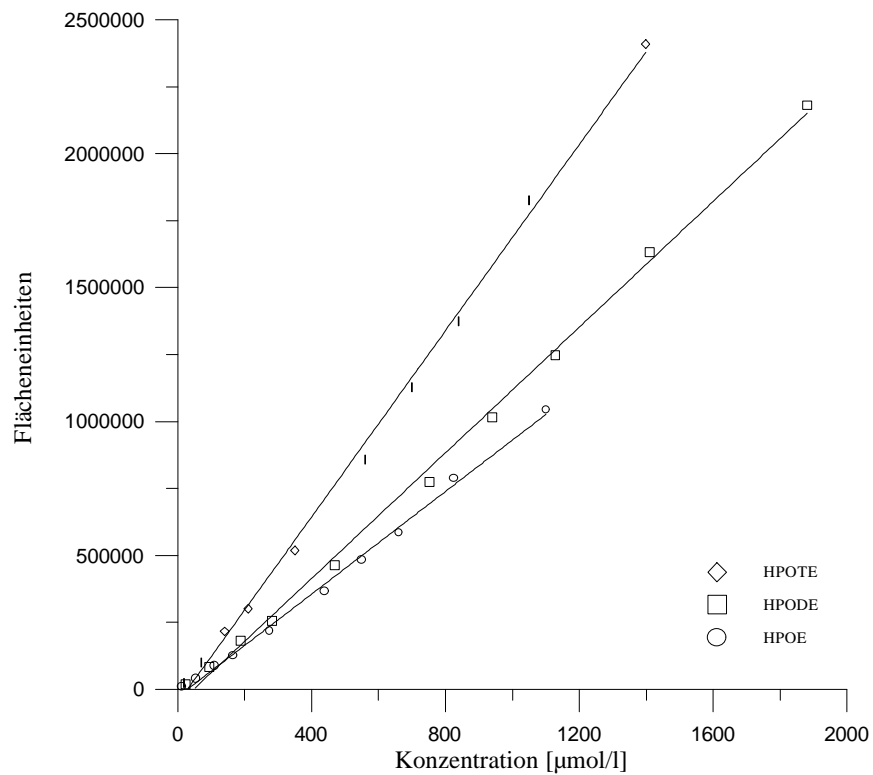


Abbildung 5.28: Kalibriergeraden der Hydroperoxide von Öl-(HPOE), Linol- (HPODE) und Linolensäure (HPOTE) unter Verwendung der Fast-HPLC bei 195 nm

5.7.4 Elektropherogramme und Chromatogramme

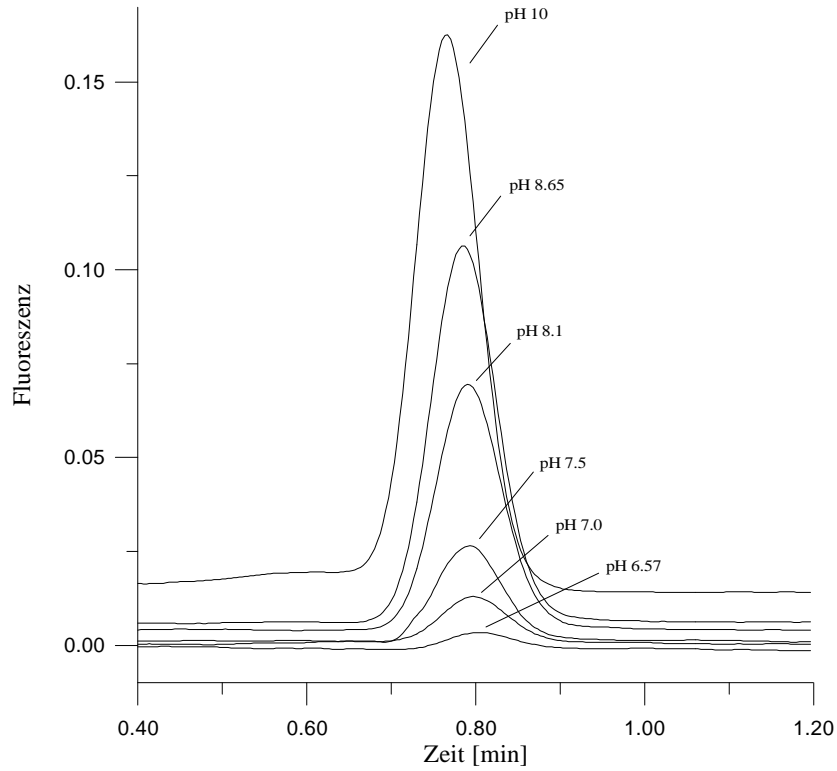


Abbildung 5.29: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz (eigene Kapillare)

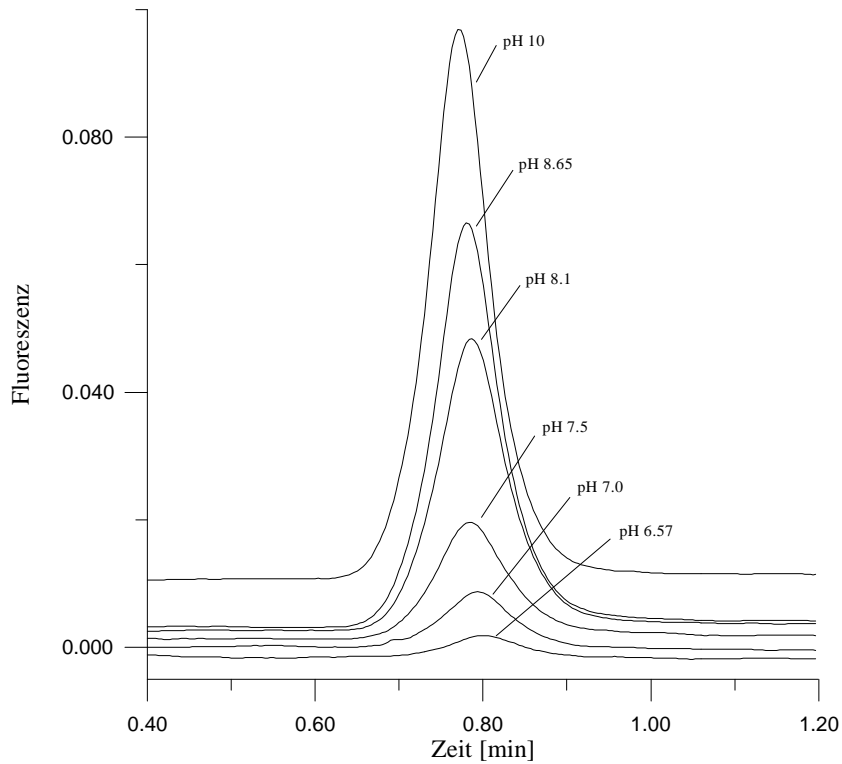


Abbildung 5.30: pH-Abhängigkeit der Bildungsreaktion und der Fluoreszenz (eigene Kapillare)

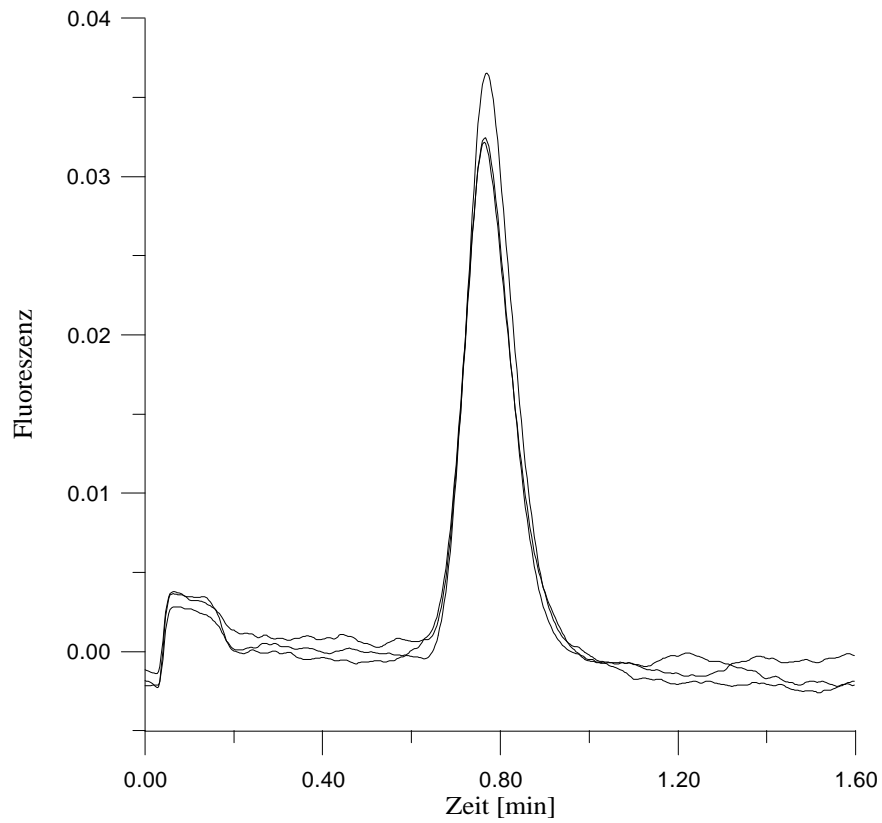


Abbildung 5.31: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der PES-Konzentration (0.4-1.2mM); pH 10

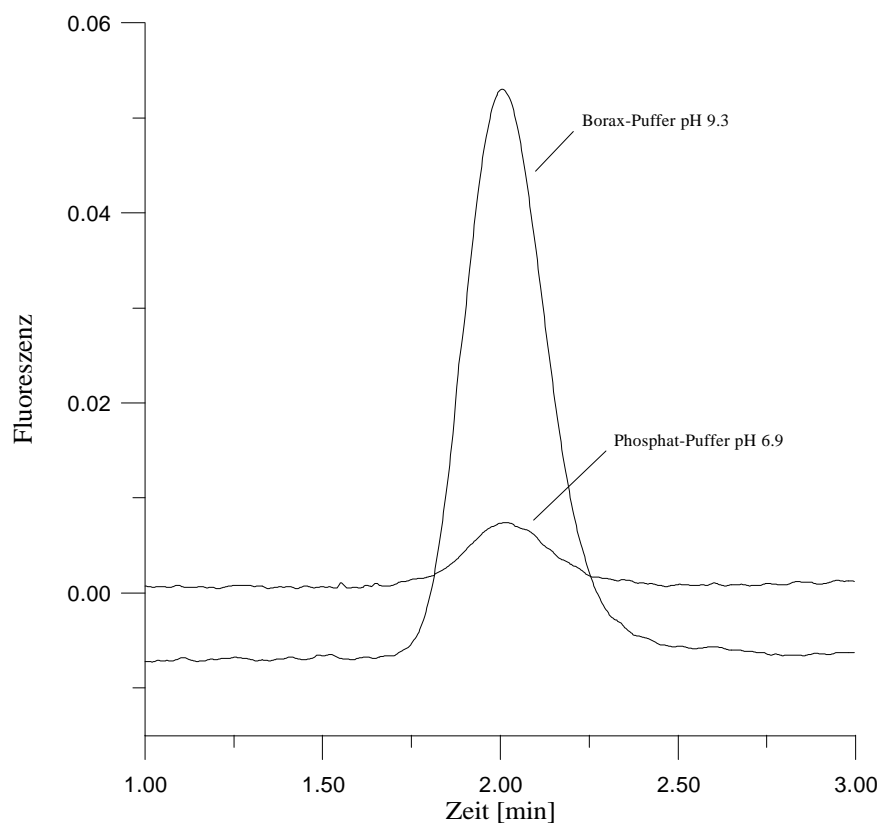


Abbildung 5.32: Responsevergleich von Borax- und Phosphatpuffer (PES-Konzentration 0.4 mM)

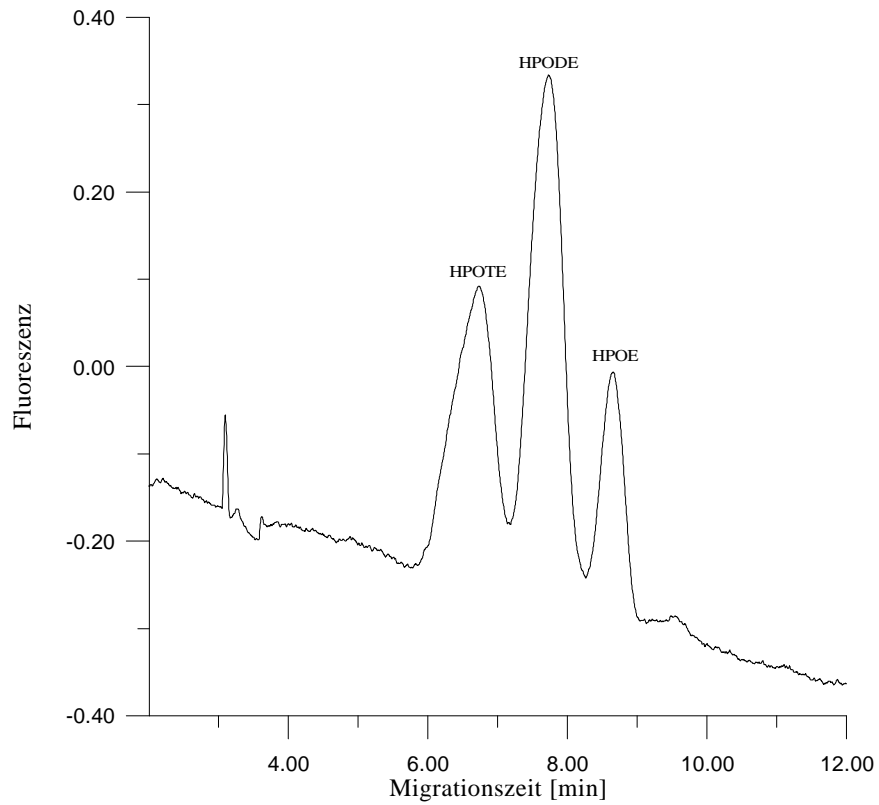


Abbildung 5.33: Reaktionsmonomer 0.4 mM PES, Kapillare 40/10/57 cm

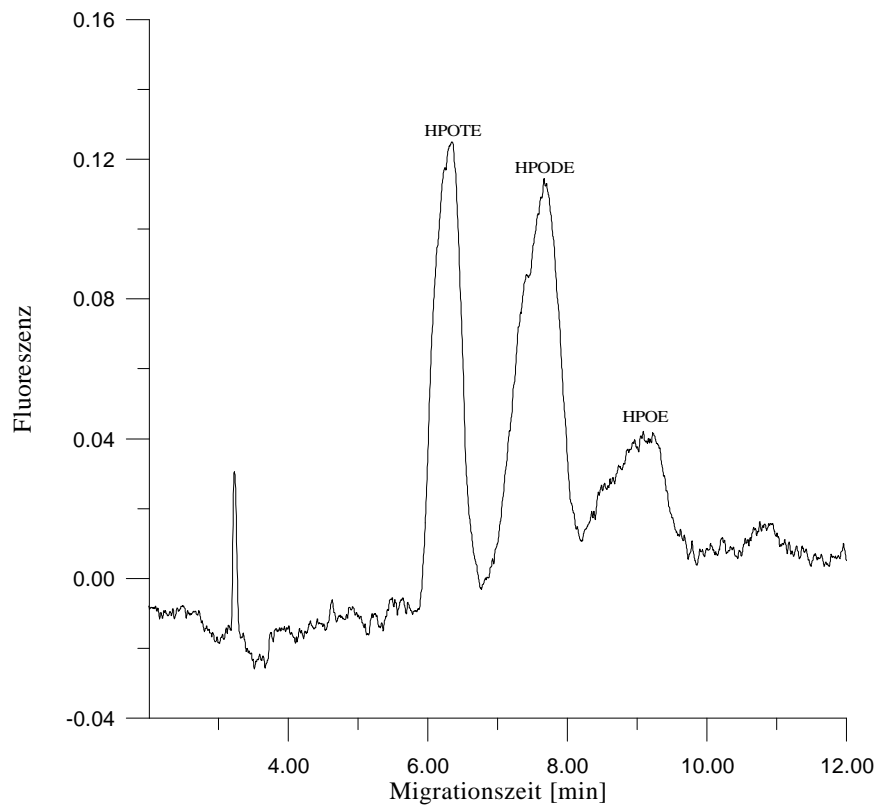


Abbildung 5.34: Reaktionsmonomer 0.4 mM PES-Methylester, Kapillare 40/10/57 cm

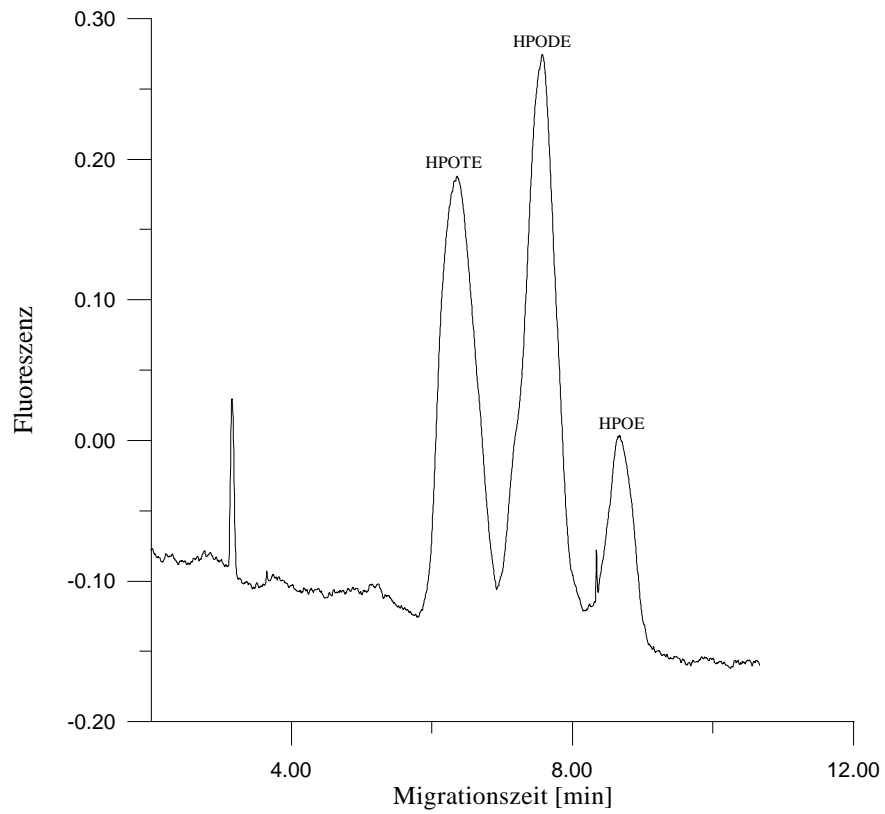


Abbildung 5.35: Reaktionsmonomer 0.4 mM PPS, Kapillare 40/10/57 cm

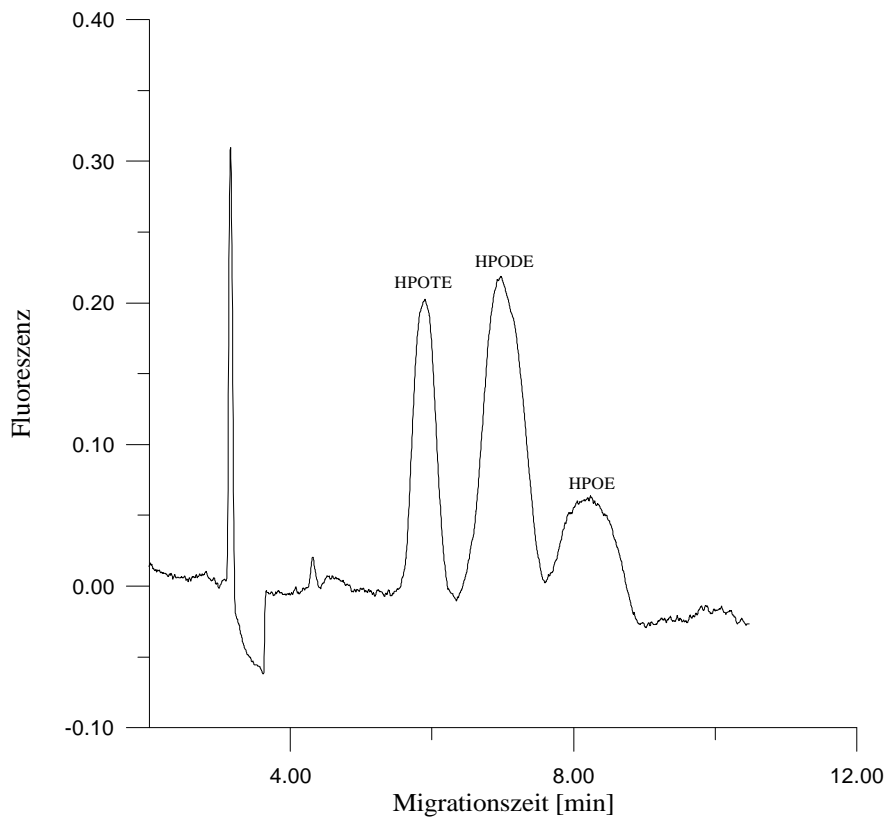


Abbildung 5.36: Reaktionsmonomer 0.4 mM PEE, Kapillare 40/10/57 cm

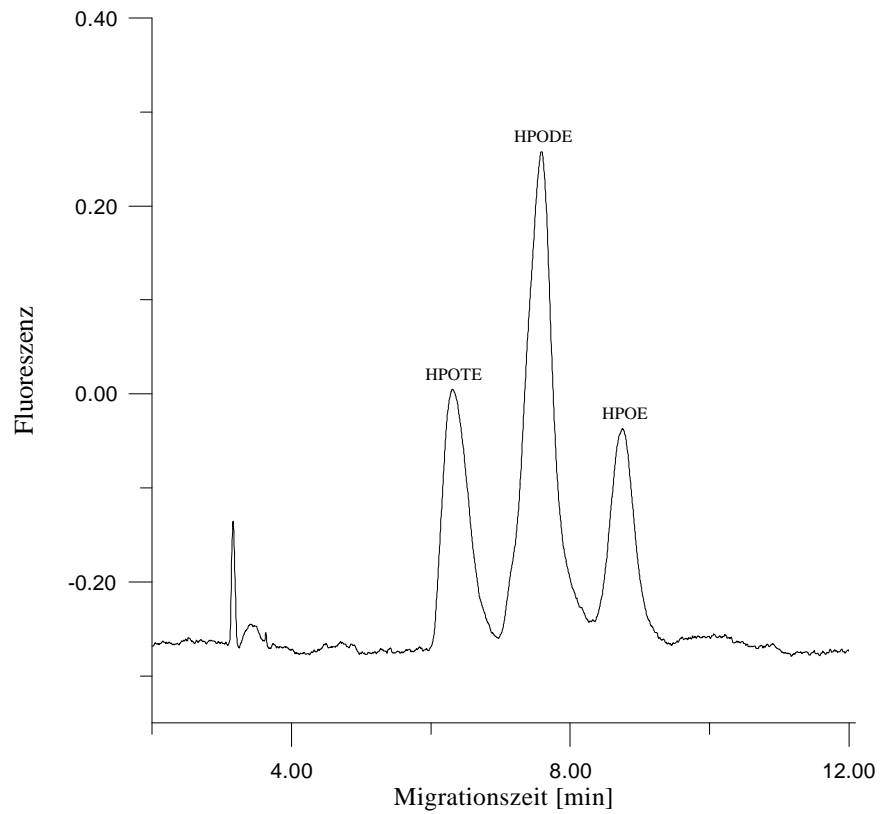


Abbildung 5.37: Reaktionsmonomer 0.4 mM Tyramin, Kapillare 40/10/57 cm

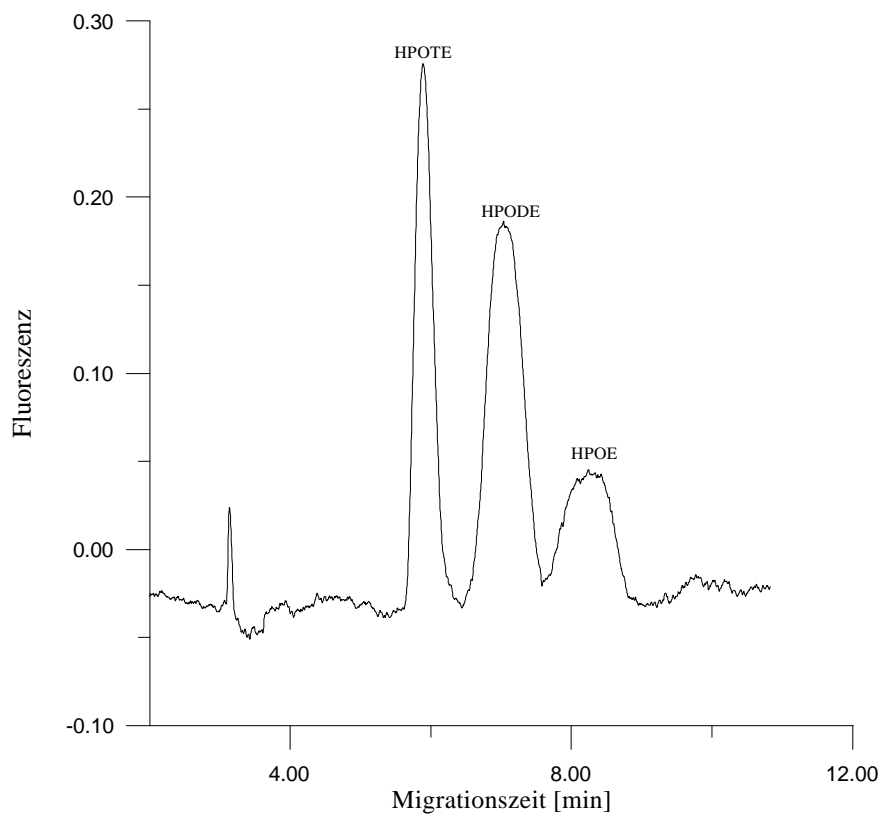


Abbildung 5.38: Reaktionsmonomer 0.4 mM L-Tyrosin, Kapillare 40/10/57 cm

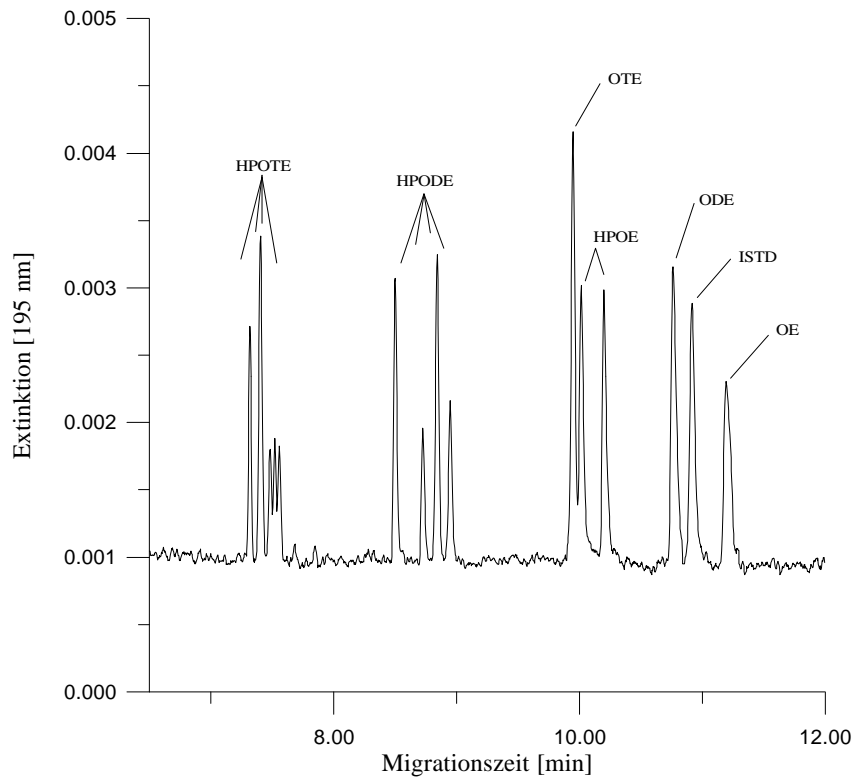


Abbildung 5.39: Trennung des Standardgemisches bestehend aus HPOTE, HPODE, HPOE, OTE, ODE, OE unter Verwendung von cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexensäure (C 22:6) als ISTD

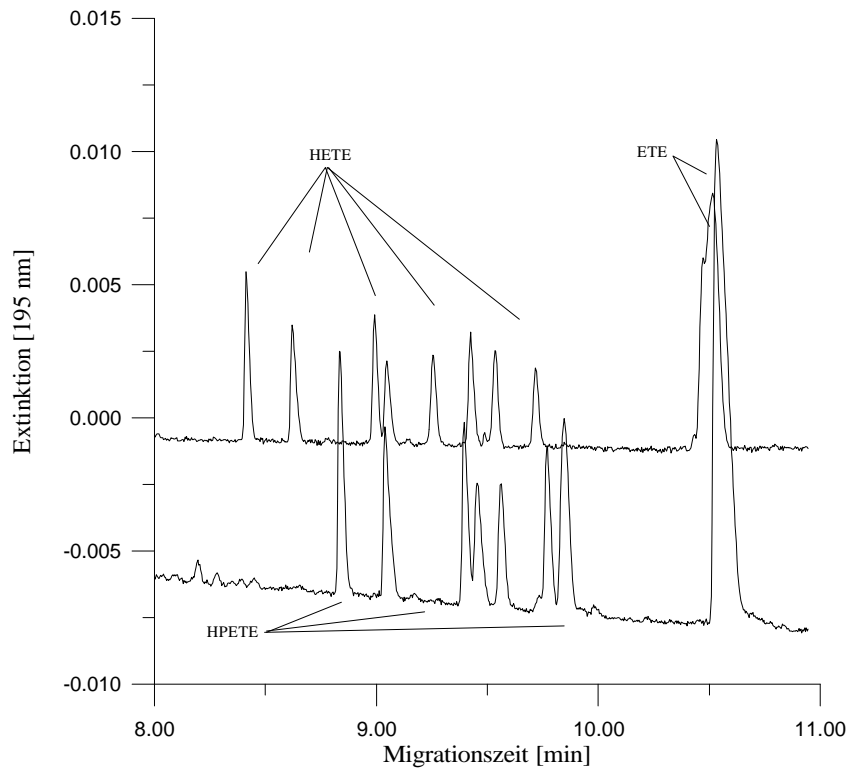


Abbildung 5.40: Simultane Trennung von HPETE, HETE und ETE

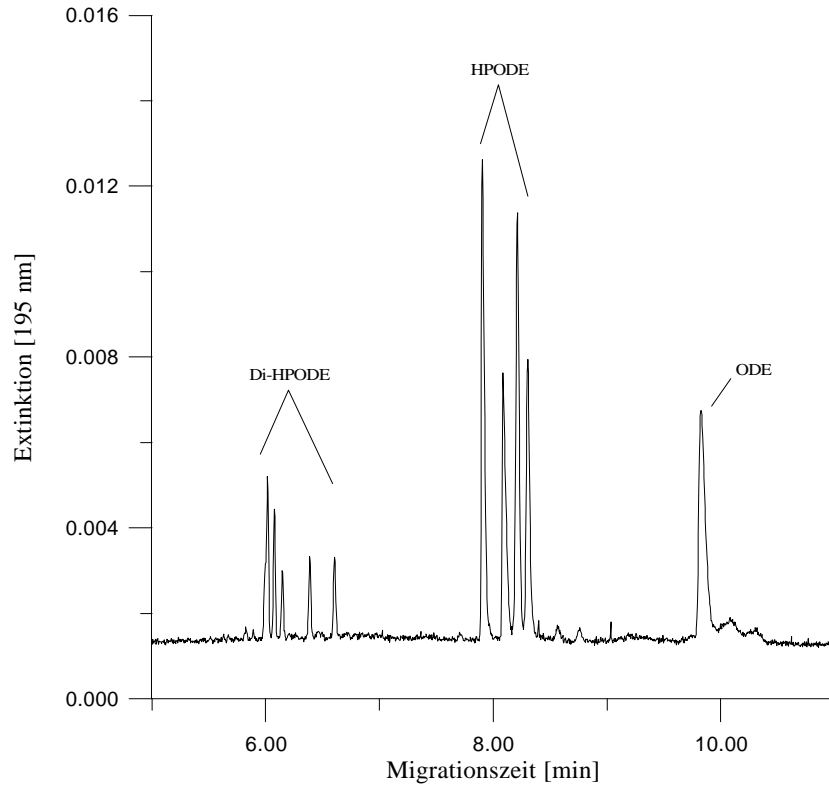


Abbildung 5.41: Bildung von Di-Hydroperoxiden bei der Synthese von HPODE

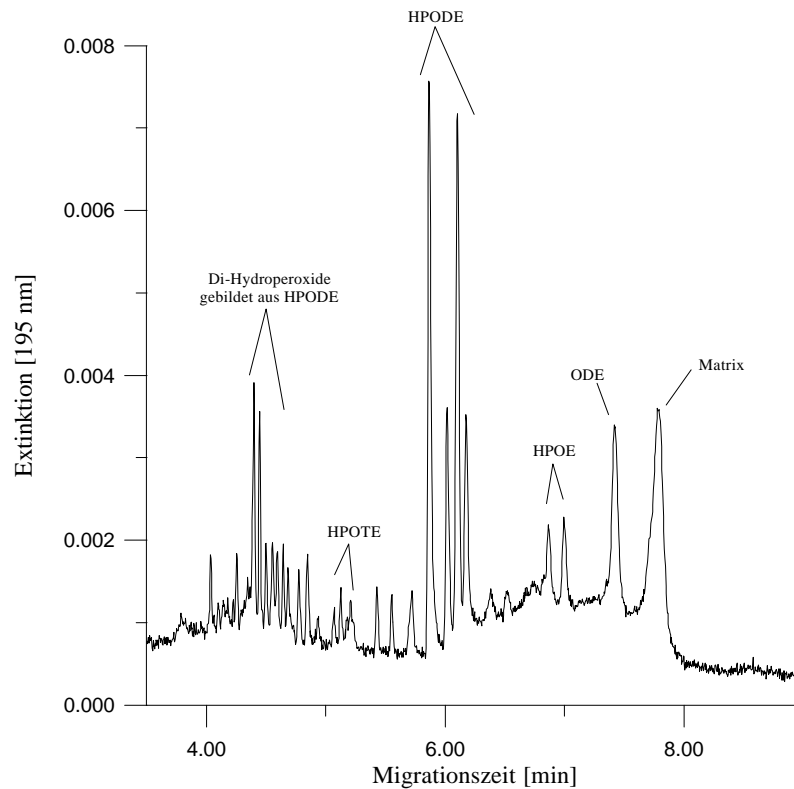


Abbildung 5.42: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 45 Stunden Bestrahlung freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide

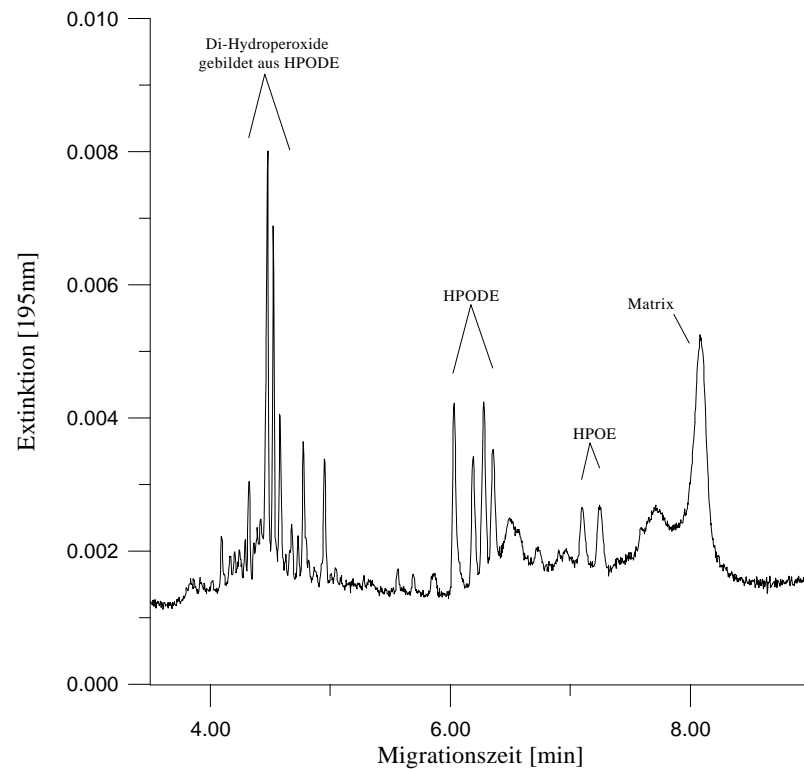


Abbildung 5.43: Photosensibilisierte Oxidation von Sojalecithin; normal-flow MEKC-Trennung der nach 90 Stunden Bestrahlung freigesetzten Fettsäuren Öl- (OE), Linol- (ODE) und Linolensäure (OTE) und deren Hydroperoxide

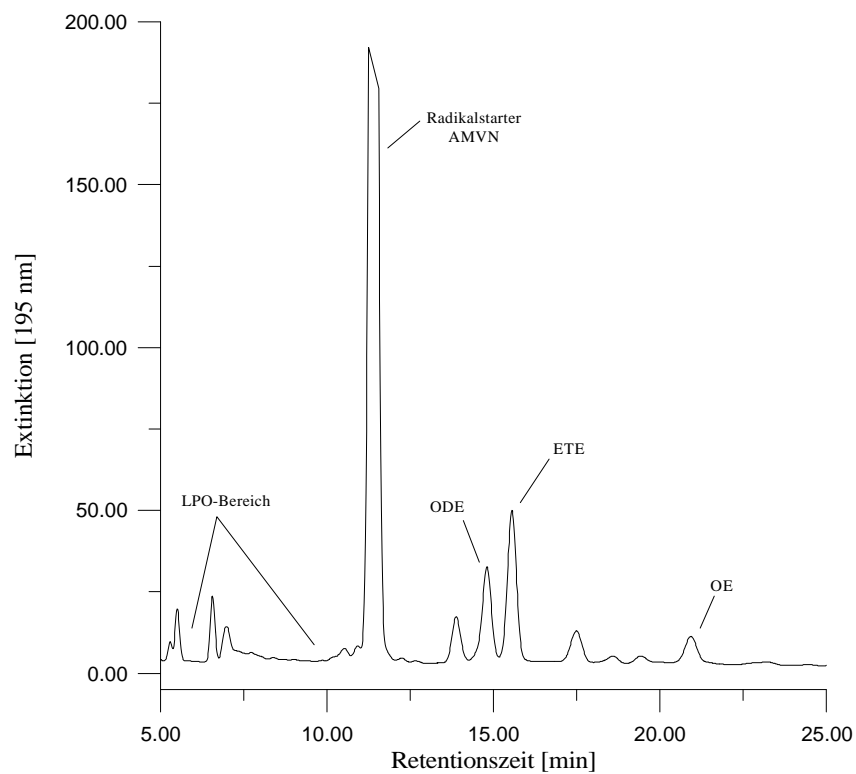


Abbildung 5.44: HPLC-Muster der nichtoxidierten und oxidierten Fettsäuren in LDL nach radikalischer Oxidation; Detektion bei 195 nm

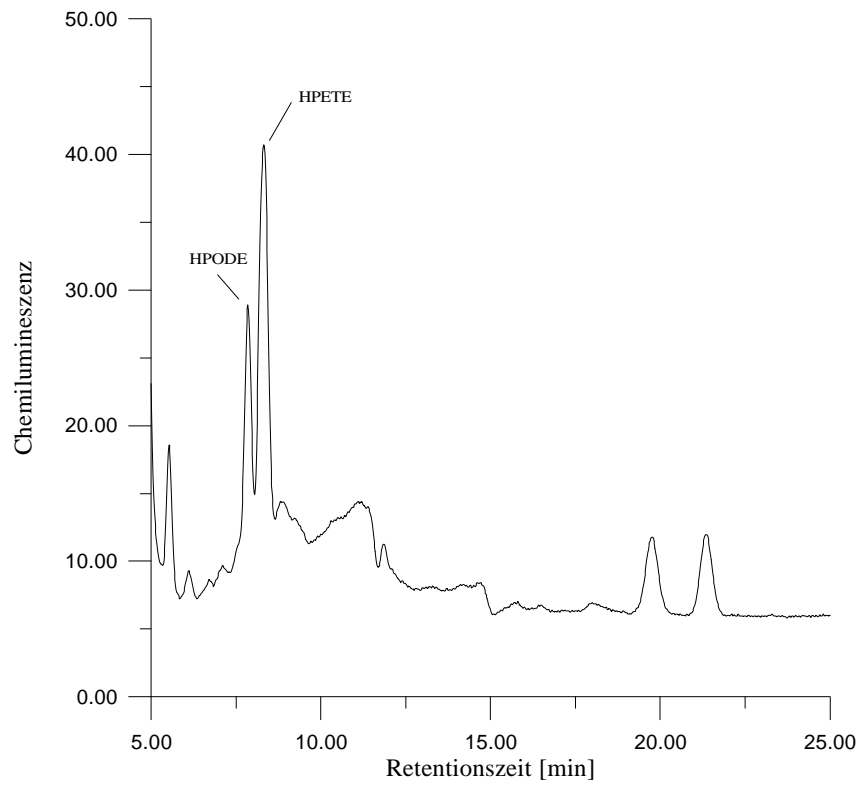


Abbildung 5.45: HPLC-Bestimmung von HPODE und HPETE in LDL nach Radikalstart mittels AMVN; Chemilumineszenzdetektion

6 Literaturverzeichnis

- 1 M. Bockisch; „Nahrungsfette und -öle“
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1993)
- 2 J. Brozek; „Human Body Composition“
Pergamon Oxford (1965)
- 3 G. Löffler und P. E. Petrides; „Physiologische Chemie“
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo (1988)
- 4 R. Dargel; „Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine“
Akademie Verlag GmbH, Berlin (1991)
- 5 M. Rasig; „Biochemie“
BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich (1995)
- 6 D. Voet und J.G.Voet; „Biochemie“
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1992)
- 7 L. Thomas; „Labor und Diagnose“
TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main (1998)
- 8 J. Falbe und M. Regitz; „Römp Chemie Lexikon“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)
- 9 L. Stryer; „Biochemie“
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)
- 10 G. Michal; „Biochemical Pathways“
Spektrum Akad. Verlag Heidelberg Berlin (1999)
- 11 G. Richter; „Biochemie der Pflanzen“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996)
- 12 G. Richter; „Stoffwechselphysiologie der Pflanzen“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1998)
- 13 S. Bergström und H. Samuelsson
Ann. Rev. Biochem., 34 (1965) 101
- 14 H. Van Dorp
Biochim. Biophys. Acta, 90 (1964) 204
- 15 W.H. Kunau
Angewandte Chemie, 88 (1976) 97
- 16 H. Eibl
Angewandte Chemie, 96 (1984) 247-314
- 17 C. Tanford; „The Hydrophobic Effect“
Wiley-Interscience Publication (1980)

- 18 R. Berkow, M. H. Beers, A. J. Fletcher; „The Merck Manual of Medical Information“
Merck Research Laboratories, Merck & Co. (1997)
- 19 H. Lüllmann, K. Mohr und A. Ziegler; „Taschenatlas der Pharmakologie“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996)
- 20 J. Aufenanger; „Lipoproteinstoffwechsel“
Basiswissen Labordiagnostik, Boehringer Mannheim GmbH (1997)
- 21 E. N. Frankel; „Lipid Oxidation“
The Oily Press Ltd, Scotland (1998)
- 22 C. Sonderman; „Cholesterin: Oft zu viel aber nie zu wenig“
Maizena Ernährungs Forum, Heilbronn (1998)
- 23 R. Chander und N. K. Kapoor
Biochem. Pharmacol., 40 (7) (1990) 1663-1665
- 24 J. R. Hessler, A. L. J. Robertson und G. M. Chisolm
Atherosclerosis, 32 (3) (1979) 213-229
- 25 G. Jürgens, H. F. Hoff, G. M. Chisolm und H. Esterbauer
Chem Phys. Lipids, 45 (2-4) (1987) 315-336
- 26 E. N. Frankel
Prog. Lipid Res., 19 (1980) 1-22
- 27 W. Grosch
Chem. i. u. Zeit, 24 (2) (1990) 82-89
- 28 G. Ohloff
Fortschr. Chem. Org. Naturst., 35 (1978) 431-493
- 29 E. N. Frankel, R. F. Garwood und B.P.S. Khambay
J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1 (1984) 2233-2240
- 30 C. Hewitt, P. Lucas, A. R. Wallburn und R. Fall
Chemistry & Industry, (1990), 478-481
- 31 S. Yoshida und M. Uemura
Plant Physiology, 75 (1984) 31-37
- 32 P. W. Lucas
New Phytologist, 108 (1988) 495-504
- 33 H. Graf
GIT Fachz. Lab., 8 (1990) 963-970
- 34 U. P. Steinbrecher, S. Parthasarathy, D. S. Leake, J. L. Witztum und D. Steinberg
Proc. Nat. Acad. Sci USA, 81 (1984) 3883
- 35 J. R. Hessler, D. W. Morel, L. J. Lewis und G. M. Chisolm
Atherosclerosis, 3 (1983) 215

- 36 I. Nishigaki, M. Hagihara, H. Tsunekawa, M. Maseki und K. Yagi
Biochem. Med., 25 (1981) 373
- 37 B. Halliwell
Food Nutr. Chem. Toxic. Int. Conf., (1991) 129
- 38 H. S. Mickel
Symp. Pharmacol. Eff. Lipids, (1978) 179
- 39 H. S. Mickel
AOCS Monogr., 13 (1985) 215
- 40 B. Halliwell
Acta Neurol. Scand. Suppl., 126 (1989) 23
- 41 L. S. Chia, J. E. Thompson und M. A. Moscarello
Biochim. Biophys. Acta, 775 (1984) 308
- 42 H. Sies
Angewandte Chemie, 98 (1986) 106
- 43 B. Halliwell
FEBS Lett., 9 (1987) 2139
- 44 A. Bartsch
European Journal of Cancer Prevention, 6 (1999) 529-534
- 45 Chen and Chung
Chem. Res. Toxicol., 9 (1996) 306-312
- 46 A. Bartsch
Mutation Research, 340 (1996) 67-79
- 47 B. Halliwell
Haemostasis, 23(1) (1993) 118
- 48 C. Hölzel und G. Spiteller; „Naturwissenschaftliche Aufsätze“
Naturwissenschaften, 82 (1995) 452-460
- 49 D. Bonnefont-Rousselont, C. Segaud, D. Jore, J. Delattre und M. Gardes-Albert
Radiant Res. 151 (3) (1999) 343-353
- 50 P. Spiteller und G. Spiteller
Biochim. Biophys. Acta, 1392 (1998) 23-40
- 51 S. Hirai; „Lipid peroxide in the aging process“ in „Lipid peroxides in Biology and Medicine“
Academic Press, New York (1980)
- 52 J. L. Golstein und M. S. Brown
Annu. Rev. Biochem., 46 (1979) 897-930
- 53 G. Spiteller
Journal of Lipid Mediators, 7 (1993) 199-221

- 54 S. Wolff und J. Nourooz-Zadeh
Atherosclerosis, 119 (1996) 261-263
- 55 I. Koacs, M. Jahangiri, G. Rees und P. Görög
American Heart Journal, 134 (1997) 572-576
- 56 B. Henning und C. Chow
Free Radic. Biol. Med., 4 (1988) 99-106
- 57 H. Hildebrandt; „Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch“
Walter de Gruyter, Berlin, New York (1994)
- 58 J. Sabieraj
Deutsche Apotheker Zeitung, 33 (1991) 1711-1712
- 59 H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl und G. Jürgens
Free Rad. Biol. Med., 13 (1991) 341-390
- 60 U.-N. Riede und H.-E. Schaefer, „Allgemeine und spezielle Pathologie“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)
- 61 S. Parthasarathy, D. Steinberg und J. L. Witztum
Annu. Rev. Med., 43 (1992) 219-225
- 62 G. Jürgens, Q. Chen, G. Ledinski, A. Hammer und H. Esterbauer
Acta Med. Austriaca, 20 (1993) 85-89
- 63 K. L. H. Carpenter, S. E. Taylor, C. van der Veen, B. K. Williamson, J. A. Ballantine und
M. J. Mitchinson
Biochim. Biophys. Acta, 1256 (1995) 141-150
- 64 U. P. Steinbrecher, H. Zhang und M. Loughheed
Free Radic. Biol. Med., 9 (1990) 155-168
- 65 Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker und B. N. Ames
Biochem. Biophys. Res. Com., 193 (1) (1993) 133-138
- 66 W. D. Lehmann, N. Stephan und G. Fürstenberger
Anal. Biochem., 204 (1992) 158-170
- 67 G. Spiteller
Chemistry and Physics of Lipids, 95 (1998) 105-162
- 68 H. Itabe
Prog. Lipid Res., 37 (1998) 181-207
- 69 P. Spiteller und G. Spiteller
Chemistry and Physics of Lipids, 89 (1997) 131-139
- 70 W. Jira, G. Spiteller, W. Carson und A. Schramm
Chemistry and Physics of Lipids, 91 (1998) 1-11

- 71 A. Dudda und G. Spiteller
Chemistry and Physics of Lipids, 82 (1996) 39-51
- 72 R. Felde und G. Spiteller
Chemistry and Physics of Lipids, 76 (1995) 259-267
- 73 W. Jira und G. Spiteller
Chemistry and Physics of Lipids, 79 (1996) 95-100
- 74 E. N. Frankel
Prog. Lipid Res., 23 (1985) 197-221
- 75 H. W. Chan; „Autoxidation of unsaturated lipids“
Academic Press, London (1987)
- 76 D. K. Park, J. Terao und S. Matsuxhita
Agric. Biol. Chem., 45 (11) (1981) 2443-2448
- 77 H. W. Gardner
Free Radical Biol. Med., 7 (1989) 65-86
- 78 E. H. Ernst, C. Su, T. Skogström und G. Benthin
Lipids 33 (8) (1998) 843-852
- 79 W. E. Neff, E. N. Frankel und D. Weisleder
Lipids 16 (6) (1981) 439-448
- 80 H.-D. Belitz und W. Grosch; „Lehrbuch der Lebensmittelchemie“
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo (1982)
- 81 J. C. Andre und M. O. Funk
Anal. Biochem., 158 (1986) 316-321
- 82 M. O. Funk, J. C. Andre und T. Otsuki
Biochemistry, 26 (1987) 6880-6884
- 83 B. Stellmach; „Bestimmungsmethoden Enzyme“
Steinkopff Verlag Darmstadt (1998)
- 84 Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry
Academic Press (1979)
- 85 P. van Dijken, J. C. T. Bergsma und P. J. M. van Haastert
European Journal of Biochemistry, 244 (1997) 113-117
- 86 M. Semeriva, G. Benzonana und P. Desnuelle
Bull. Soc. Chim. Biol., 49 (1967) 71-79
- 87 M. Semeriva und C. Dufur
Biochim. Biophys. Acta, 260 (1972) 393-400
- 88 Schriftliche Mitteilung Dr. D. Jürgensen, Fa. Boehringer (1998)

- 89 Schriftliche Mitteilung J. Ruppert, ICN Biomedicals GmbH (1998)
- 90 V. Ruiz-Gutiérrez und L. J. R. Barron
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 133-168
- 91 J. C. Touchstone
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 169-195
- 92 T. Tandey und W. C. Purdy
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 237-253
- 93 S. L. Abidi und T. L. Mounts
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 281-297
- 94 E. B. Hoving
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 341-362
- 95 J. J. Myher und A. Kuksis
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 3-33
- 96 M. Kinter
J. Chromatogr. B, 671 (1995) 223-236
- 97 W. S. M. Guert van Kessel, W. M. A. Hax, R. A. Demel und J. De Gier
Biochim. Biophys. Acta, 486 (1976) 524-530
- 98 W. M. A. Hax und W. S. M. Guert van Kessel
J. Chromatogr., 142 (1977) 735-741
- 99 M. Guichardant und M. Lagarde
J. Chromatogr., 274 (1983) 400-406
- 100 C. Thévenon, S. El Bawab, M. Chantegrel und M. Lagarde
J. Chromatogr. B, 708 (1998) 39-47
- 101 A. Mullertz, A. Schmedes und G. Holmer
Lipids, 25 (1990) 415-418
- 102 K. Yamada, J. Terao und S. Matsushita
Lipids, 22 (1987) 125-128
- 103 T. Miyazawa, K. Yasuda und K. Fujimoto
Anal. Lett., 20 (1987) 915-925
- 104 T. Miyazawa
Free Radical. Biol. Med., 7 (1989) 209-217
- 105 Y. Yamamoto und B. N. Ames
Free Radical. Biol. Med., 3 (1987) 359-361
- 106 T. Miyazawa, K. Fujimoto und S. Oikawa
Biomed. Chromatogr., 4 (1990) 131-134

- 107 T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto und T. Kaneda
J. Biochem., 107 (1990) 689
- 108 T. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Suzuki und K. Yasuda
Methods Enzymol., 233 (1994) 324-332
- 109 Y. Yamamoto, B. Frei und B. N. Ames
Methods Enzymol., 186 (1990) 371-380
- 110 A. E. Holley and T. F. Slater
Free Rad. Res. Comm., 15 (1991) 51
- 111 Y. Yamamoto
Methods Enzymol., 233 (1994) 319-324
- 112 T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto und K. Yasuda
J. Lipid. Res., 33 (1992) 1051
- 113 K. Akasada, S. Ijichi, K. Watanabe, H. Ohruai und H. Meguro
J. Chromatogr., 596 (1992) 197
- 114 K. Akasada, H. Ohruai, H. Meguro und M. Tamura
J. Chromatogr., 617 (1993) 205
- 115 K. Akasada, H. Ohruai und H. Meguro
J. Chromatogr., 622 (1993) 153
- 116 J. J. Myher und D. Kuksis
J. Biochem. Biophys. Methods, 10 (1984) 13-23
- 117 J. L. Perrin und A. Prevot
Rev. Fr. Corps Gras, 33 (1986) 437-445
- 118 R. Schuster
Hewlett Packard Application Note (1987) 5954-6269
- 119 K. Raith, R. Wolf, J. Wagner und R. H. H. Neubert
J. Chromatogr. A, 802 (1998) 185-188
- 120 M. J. Suh, Y. S. Kim und Y. S. Yoo
J. Chromatogr. A, 781 (1997) 263-270
- 121 J. Stocks und N. E. Miller
J. Lipid Res., 39 (1998) 1305-1309
- 122 P. Heinmöller
Dissertation, Technische Universität München, (1997)
- 123 Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker und B. N. Ames
Anal. Biochem., 160 (1987) 7-13
- 124 B. Frei, Y. Yamamoto, D. Niclas und B. N. Ames
Anal. Biochem., 175 (1988) 120-130

- 125 Z. Wu, D. S. Robinson, C. Domoney und R. Casey
J. Agric. Food Chem., 43 (1995) 337-342
- 126 J. I. Teng und L. L. Smith
J. Chromatogr., 350 (1985) 445-451
- 127 J. P. Koskas, J. Cillard und P. Cillard
J. Chromatogr., 258 (1983) 280-283
- 128 H. W.-S. Chan und F. A. A. Prescott
Biochim. Biophys. Acta, 380 (1975) 141-144
- 129 H. W.-S. Chan und G. Levett
Lipids, 12 (1) (1977) 99-104
- 130 F. B. Erim, X. Xu und J. C. Kraak
J. Chromatogr. A, 694 (1995) 471-479
- 131 K. Heitkamp
Dissertation, BUGH Wuppertal (1999)
- 132 S. M. Siegel und K. Roberts
Space Life Science 1, (1968) 131-134
- 133 E. N. Frankel, W. E. Neff und T. R. Bessler
Lipids, 14(12) (1979) 961-967
- 134 E. Schulte und K. Weber
Fat. Sci. Technol., 91 (1989) 181
- 135 K. D. Müller, H. Husmann, H. P. Nalik und G. Schomburg
Chromatographia, 30 (1990) 245-248
- 136 T. Hanis, M. Smrz, P. Klir, K. Macek, J. Klima, J. Base und Z. Deyl
J. Chromatogr., 452 (1988) 443-457
- 137 B. Schatowitz und G. Gercken
J. Chromatogr., 425 (1988) 257-268
- 138 S. B. Turnipseed, A. J. Allentoff und J. A. Thompson
Anal. Biochem., 213 (1993) 218-225
- 139 A. Mlakar und G. Spiteller
J. Chromatogr. A, 743 (1996) 293-300
- 140 G. Gutnikov, W. Beck und H. Engelhardt
J. Microcol. Separ., 6 (1994) 565
- 141 R. Roldan-Assad und P. Gareil
J. Chromatogr. A, 708 (1995) 339-350
- 142 F. B. Erim, X. Xu und J. C. Kraak
J. Chromatogr. A, 694 (1995) 471-479

- 143 E. Drage und E. Lundanes
J. Chromatogr. A, 771 (1997) 301-309
- 144 O. Schmitz
Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal (1997)
- 145 A. Rosenstock
Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal (1995)
- 146 E. Hellpointner und S. Gäb
Nature, 337 (1989) 631-634
- 147 G. Scheller, E. Jäger, S. Weyd und P. Schreier
Lebensmittelchemie 47 (1993) 80
- 148 M. O. Funk, R. Isaac und N. A. Porter
Lipids, 11 (2) (1976) 113-117
- 149 J. A. Matthew, H.W.-S. Chan und T. Gilliard
Lipids, 12 (3) (1977) 324-326
- 150 E. Bascetta und F. Gustone
Chem. Phys. Lipids, 36 (1985) 235-261
- 151 M. Lie Ken Jie und J. Mustafa
Lipids, 32 (10) (1997) 1019-1034
- 152 Alex Chan
International Laboratory (News Edition), 29 (3A) (1999) 12
- 153 D. Undeutsch; „Fettstoffwechselstörungen“
Editiones <Roche>, Hoffman - La Roche AG, Grenzach (1974) 121-143
- 154 C. M. Miller
Techn. Digest Opt. Fiber Transmission II (1977) WA3-1-3-6.
- 155 „Flache und saubere Schnitte für die CE/CEC“
Peak, Hewlett-Packard, 1 (1999) 17
- 156 C. A. Lucy, K. K-C. Yeung, X. Peng und D. D. Y. Chen
LC/GC. Int. 11 (3) (1998) 148
- 157 O. Schmitz, D. Melchior, W. Schuhmann und S. Gäb
J. Chromatogr. A, 814 (1998) 261-265
- 158 Offenlegungsschrift DE 198 03 264 A1
- 159 D. Melchior
Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal (1998)
- 160 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya und T. Ando
Anal. Chem., 56 (1984) 111-113

- 161 S. Terabe, K. Otsuka und T. Ando
Anal. Chem., 57 (1985) 834-841
- 162 P. G. H. M. Muijselaar, H. A. Claessens und C. A. Cramers
J. Chromatogr. A, 696 (1995) 273
- 163 J. Otsuka und S. Terabe
J. Microcolumn Sep., 1 (1989) 150
- 164 G. M. Janini, G. M. Muschik und H. J. Issaq
J. Chromatogr. B, 683 (1996) 29
- 165 N. Iki und E. S. Yeung
J. Chromatogr. A, 731 (1996) 273-282
- 166 M. V. Novotny, C. A. Cobb und J. Liu
Electrophoresis, 11 (1990) 735-749
- 167 K. A. Cobb, V. Dolník und M. Novotny
Anal. Chem., 62 (1990) 2478-2483
- 168 S. A. Swedberg
J. Chromatogr., 503 (1990) 449-452
- 169 R. M. McCormick
Anal. Chem., 60 (1988) 2322-2328
- 170 CElectTM H150 und H250, Supelco, Inc., Bellefonte
PA 16813-0048 USA
- 171 M. Gilges, M. Kleemiss und G. Schomburg
Anal. Chem., 66 (1994) 2038-2046
- 172 U. Jegle, R. Grimm, H. Godel, R. Schuster, G. Ross und T. Soga
Hewlett Packard Company und Yokogawa Analytical Systems Inc.,
Hewlett Packard Publication Number 12-5965-8417E
- 173 W. Bartmann
Angew. Chemie, 87 (1975) 143-151
- 174 B. Samuelsson
Angew. Chemie, 94 (1982) 881-889
- 175 B. Samuelsson
Angew. Chemie, 95 (1983) 845-864
- 176 L. Brühl, E. Schulte und H.-P. Thier
Fat Sci. Technol., 96 (6) (1994) 223-304
- 177 J. Chervet, R. van Soest und M. Ursem
J. Chromatogr., 543 (1991) 439
- 178 J. Chervet, United States Patent 5,057,216, Oktober 15 (1991)

- 179 H. Engelhardt, W. Beck und T. Schmitt; „Kapillarelektrophorese“
Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)
- 180 Hewlett Packard Company
Peak, 2 (1993) 11
- 181 Y. Xue und E. Yeung
Anal. Chem., 66 (1994) 3575
- 182 K. Ryan und N. Djordjevic
J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 19 (1996) 201
- 183 N. Djordjevic, M. Widder und R. Kuhn
J. High Resol. Chromatogr., 20 (1997) 189-192
- 184 G. Bruin, G. Stegeman, A. Van Asten, X. Xu, J. Krak und H. Poppe
J. Chromatogr., 559 (1991) 163
- 185 Prof. Dr. W. Schuhmann
Persönliche Mitteilung Oktober 1997
- 186 T. Lötzbeyer, W. Schuhmann und H.-L. Schmidt
J. Electroanal. Chem., 377 (1994) 291-294
- 187 H. Weetall
Biosensors & Bioelectronics, 8 (1993) x-xi
- 188 O. Schmitz und S. Gäb
J. Chromatogr. A, 767 (1997) 249-253
- 189 Deutsche Norm: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter
Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung; DIN 32645 (1994)
- 190 Fluofix Guide, NEOS Company LTD (1998)
- 191 K. Bischoff
Labor Praxis, 11 (1996) 5-7
- 192 K. Kalgatgi, C. Horvath
J. Chromatogr., 398 (1987) 335-339
- 193 G. J. Eppert; „Flüssigchromatographie“
Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden (1997)
- 194 M. Yasuda und S. Narita
J. Chromatogr. B, 693 (1997) 211-217
- 195 Versuchsvorschrift Boehringer Mannheim (1997)
- 196 Produktinformation der Fa. Novo Nordisk (1999)

- 197 E. Anderson, K. Larsson und O. Kirk
Biocatalysis and Biotransformation, 16 (1997) 181-204
- 198 A. Dudda, M. Herold, C. Hölzel, A. Loidle-Stahlhofen, W. Jira, A. Mlakar und G. Spiteller
S. Afr. J. Chem., 49 (1996) 59-64
- 199 C. Hingst
Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal (1999)
- 200 M. Jussila, S. Sundberg, A. Hopia, M. Mäkinen und M.-L. Riekkola
Electrophoresis, 20 (1999), 111-117
- 201 A. Loidl-Stahlhofen, K. Hannemann und G. Spiteller
Biochim. Biophys. Acta, 1213 (1994) 140-148
- 202 D. Melchior und S. Gäb
J. Chromatogr. A, 894 (2000) 145-155
- 203 K. Evans, J. Mitcheson und M. F. Laker
Clin. Chem., 41/3 (1995) 392-396
- 204 Schriftliche Mitteilung Dr. M. Nauck, Medizinische Universitätsklinik Freiburg (2000)
- 205 Y. Kambayashi, S. Yamashita, E. Niki und Y. Yamamoto
J. Biochem., 121 (1997) 425-431
- 206 Programm von Dr. Torge Schwierz entwickelt