

Entwicklung von Detektionssystemen für die HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden

**Vollständiger Abdruck der vom Fachbereich Chemie der
Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften -Dr. rer. nat.-
genehmigten Dissertation**

von

Klaus Heitkamp

aus Remscheid

Wuppertal 1999

**Die vorliegende Arbeit entstand von Juli 1994 bis August 1999 in der Abteilung
Analytische Chemie der Bergischen Universität - Gesamthochschule Wuppertal
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. S. Gäb.**

Eingereicht am:	13.05.1999
Tag der mündlichen Prüfung:	31.08.1999
1. Gutachter:	Prof. Dr. S. Gäb
2. Gutachter:	Prof. Dr. M. Petz

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Gäß für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. W. V. Turner danke ich für seine große Hilfsbereitschaft und für viele Anregungen.

Frau I. Polanz, Frau B. Pongratz und Frau J. Kösters möchte ich für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren danken.

Frau Dr. M. Schraudner, GSF München, danke ich für die Tips und Hinweise zur Enzymisolierung.

Herrn Dr. N. Dillhage möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Herrn Deege, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr, gilt mein Dank für das Füllen eines Enzymreaktors.

Für die vielen wertvollen Tips zur Enzymimmobilisierung möchte ich Herrn Prof. Dr. Schuhmann, Ruhr-Universität Bochum, recht herzlich danken.

Herrn Dr. J. Messerschmidt vom Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie in Dortmund danke ich für die AAS-Untersuchung der Enzymimmobilisate.

Für die engagierte Mitarbeit bei Teilen dieser Arbeit danke ich Frau B. Gatzke, Frau G. Andersen, Herrn Dipl.-Chem. Guido Dallmann und Herrn Dr. T. Seiffert.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. P. Heinmöller für die vielen Hilfestellungen, Ratschläge und Diskussionsbeiträge.

Herrn Dipl.-Chem. C. Waller danke ich für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dem Arbeitskreis Analytische Chemie möchte ich für das gute Arbeitsklima und die stete Bereitschaft zur Diskussion recht herzlich danken.

Meinen Eltern

*Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforderliche erforscht zu haben,
und das Unerforschliche ruhig zu verehren.*

(Johann Wolfgang von Goethe)

Inhaltsverzeichnis

0	Abstract	1
1	Einleitung - Vorkommen und Bedeutung von Lipidhydroperoxiden	2
2	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	5
3	Theoretischer Teil.....	6
3.1	Synthesewege für Lipidhydroperoxide.....	6
3.1.1	Autoxidation	6
3.1.2	Oxidation mit Singulett-sauerstoff.....	8
3.1.3	Enzymkatalysierte Oxidation.....	11
3.1.4	Chemoenzymatische Synthesewege für isomerenreine Lipidhydroperoxide	12
3.2	Eigenschaften von Lipidhydroperoxiden.....	14
3.3	Nachweis von Hydroperoxiden	17
3.3.1	Photometrische Methoden	17
3.3.2	HPLC-Methoden.....	25
3.3.3	GC-(MS)-Methoden.....	30
4	Ergebnisse und Diskussion.....	32
4.1	Synthese von Referenzsubstanzen.....	32
4.1.1	Gewinnung von 9-Lipoxygenase aus Kartoffeln; Synthese von 9-Hydroperoxy-octadecadiensäure	32
4.1.2	Synthese von 13 <i>S</i> -Hydroperoxy-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure und 13 <i>S</i> -Hydroperoxy-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-triensäure sowie der entsprechenden Methylester	37
4.1.3	Synthese von Hydroperoxyfettsäuremethylestern durch photosensibilisierte Oxidation	37
4.1.4	Synthese isomerenreiner Triglyceridhydroperoxide	38
4.1.5	Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen.....	42
4.1.6	Diskussion der Ergebnisse	50
4.2	Vergleich verschiedener photometrischer Methoden zur Gehaltsbestimmung von Lipidhydroperoxiden	52
4.2.1	Vorüberlegungen und Vorversuche	52
4.2.2	Durchführung der Messungen.....	56
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse	58
4.3	HPLC-Trennung von Lipidhydroperoxiden an Normalphasen	63

4.4	Entwicklung einer Detektionsmethode zum selektiven Nachweis von Lipidhydroperoxiden in der Normalphasen-HPLC.....	68
4.4.1	Vorüberlegungen.....	68
4.4.2	Optimierung des Systems.....	71
4.4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	78
4.5	Entwicklung eines Enzymreaktors zur Detektion von Lipidhydroperoxiden in der HPLC.....	81
4.5.1	Allgemeines zur Immobilisierung von Enzymen.....	82
4.5.2	Bisherige Arbeiten zur Immobilisierung von Mikroperoxidase-11.....	84
4.5.3	Vorversuche.....	85
4.5.4	Immobilisierung von Mikroperoxidase-11.....	88
4.5.5	Bestimmung der Trägerbelegung.....	89
4.5.6	Packen der MP-11-Reaktoren.....	91
4.5.7	Bestimmung der MP-11-Aktivität.....	92
4.5.8	Optimierung des MP-11-Fluoreszenz-HPLC-Systems.....	95
4.5.9	Einsatz von MP-11-Reaktoren in der NP-HPLC.....	104
4.5.10	Diskussion der Ergebnisse.....	105
4.6	Untersuchung oxidiertes Speiseöl mittels photometrischer Methoden und HPLC-Methoden.....	107
4.6.1	Einleitung.....	107
4.6.2	Zusammensetzung und Lagerung der Proben, Probenahme.....	109
4.6.3	Bestimmung des Wassergehaltes.....	109
4.6.4	Aufarbeitung der Proben.....	110
4.6.5	Photometrische Bestimmung der Lipidhydroperoxide in den Ölproben.....	112
4.6.6	Bestimmung des Hydroperoxidgehaltes der Ölproben mittels HPLC.....	115
4.6.7	Diskussion der Ergebnisse.....	123
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	126
6	Anhang.....	128
6.1	Öl-, Linol- und Linolensäure und ihre isomeren Hydroperoxide.....	128
6.2	Verzeichnis der Abkürzungen.....	129
6.3	Chemikalienliste.....	131
6.4	Verzeichnis der verwendeten Geräte.....	133
6.5	NMR- und Massenspektren.....	134
6.5.1	9 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-diensäure.....	135
6.5.2	Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters aus der photosensibilisierten Oxidation.....	136
6.5.3	Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters aus der photosensibilisierten Oxidation.....	137

6.5.4	Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters aus der photosensibilisierten Oxidation	139
6.5.5	13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure	140
6.5.6	13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäuremethylester.....	142
6.5.7	13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-triensäure.....	143
6.5.8	13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-triensäuremethylester	144
6.5.9	13 <i>S</i> -(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure-methylester.....	145
6.5.10	13 <i>S</i> -(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure	147
6.5.11	2-[13 <i>S</i> -(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-dienoyl]-1,3-dilinolein.....	148
6.5.12	2-[13 <i>S</i> -Hydroperoxy-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-dienoyl]-1,3-dilinolein	150
6.6	Schematischer Aufbau der verwendeten HPLC-Anlagen.....	151
6.6.1	Normalphasen-HPLC mit UV-Detektion.....	151
6.6.2	Entwicklung und Optimierung eines Nachsäulenderivatisierungssystem für die Normalphasen-HPLC	151
6.6.3	Normalphasen-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion	152
6.6.4	Modifiziertes HPLC-System für Aktivitätsuntersuchungen von Enzymreaktoren	152
6.6.5	Umkehrphasen-HPLC mit gleichzeitiger UV/VIS- und Fluoreszenzdetektion bei Verwendung des Enzymreaktors (2-Pumpen-System).....	153
6.6.6	Umkehrphasen-HPLC mit UV/VIS- und Fluoreszenzdetektion bei Verwendung des Enzymreaktors (3-Pumpen-System)	154
6.6.7	Umkehrphasen-HPLC mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion	155
6.7	Lineare statistische Optimierung	156
6.7.1	Mathematische Grundlagen	156
6.7.2	Versuchspläne	160
6.7.3	Optimierungsergebnisse.....	164
6.8	Bestimmung der Trägerbelegung bei der Immobilisierung von Mikroperoxidase mittels der Atomabsorptionsspektrometrie	169
6.9	Bestimmung oxidiertes Pflanzenöle	171
6.9.1	Meßwerte FOX2-Test	171
6.9.2	Kalibriergeraden und Meßwerte der HPLC-Bestimmung mit UV- und Fluoreszenzdetektion	172
6.9.3	Kalibriergerade und Meßwerte der HPLC-Bestimmung mit nichtenzymatischer Nachsäulendetektion	175
6.10	Literaturverzeichnis	177

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1	Oxidation von Lipiden, insbesondere von LDL	4
Abbildung 2	Teilreaktionen bei der Autoxidation von Lipiden	6
Abbildung 3	Produktverteilung bei der Autoxidation von Öl-, Linol- und Linolensäure	7
Abbildung 4	Mechanismen der Sauerstoffaktivierung bei der photosensibilisierten Oxidation mit Singulett-Sauerstoff	9
Abbildung 5	Reaktion von Verbindungen mit (Z)-konfigurierter Doppelbindung mit Singulett-Sauerstoff.....	9
Abbildung 6	Reaktionsschema zur enzymatischen Oxidation von Lipiden mit Typ I-Lipoxidase	12
Abbildung 7	Synthese von 13 <i>S</i> -9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecadiensäureestern nach Baba	13
Abbildung 8	Reaktionsschema zum homolytischen Zerfall von Lipidhydroperoxiden	15
Abbildung 9	Isomerisierung von Lipidhydroperoxiden durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms und Bildung eines Peroxyradikals	16
Abbildung 10	Bildung von Epoxiden bei der Reaktion von Hydroperoxiden mit starken Säuren	16
Abbildung 11	Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd (TBA-Test).....	18
Abbildung 12	FOX-Test (FOX = ferrous oxidation in xylenol orange).....	21
Abbildung 13	Grundstruktur der Wurster-Salze	22
Abbildung 14	Photometrische Bestimmung von Lipidhydroperoxiden mit N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin	22
Abbildung 15	Reaktion von 1,5-Diphenylcarbohydrazid mit Hydroperoxiden	23
Abbildung 16	Reaktion von Leuko-Methylenblau-Derivaten mit Peroxiden	24
Abbildung 17	Oxidation von Diphenyl-1-pyrenylphosphin zum fluoreszierenden Phosphinoxid.....	27
Abbildung 18	Oxidation von PES zum fluoreszierenden PES-Dimer unter katalytischer Aktivität von Peroxidase.....	29
Abbildung 19	Kalibrierkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford.....	34
Abbildung 20	Bestimmung der Aktivität von Lipoxidase über den Anstieg der Extinktion bei 234 nm bei der Reaktion mit Linolsäure	35
Abbildung 21	Strukturen synthetisierter Linol- und Linolensäurederivate.....	46
Abbildung 22	Strukturen synthetisierter Trilinolein-Derivate	49
Abbildung 23	Oxidation substituierter Phenylendiamine zu Semichinondiimin und Chinondiimin.....	52
Abbildung 24	Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich einer Lösung von DMPD und TMPD in Anwesenheit von Ammoniumeisen(II)-sulfat nach Zusatz jeweils gleicher Mengen tert.-Butylhydroperoxid.....	53

Abbildung 25	Änderung der Extinktion einer Lösung von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin bei 613 nm nach Zugabe von Hydroperoxyoctadeca-diensäure ohne und mit Fe ²⁺ -Katalyse	54
Abbildung 26	Alterung des TMPD-Reagenzes in Abhängigkeit verschiedener Zusätze ...	55
Abbildung 27	Vergleich der Nachweisgrenzen photometrischer Bestimmungsmethoden für Lipidhydroperoxide	58
Abbildung 28	Kalibriergeraden für 13S-HPOD und 13S-HPOT beim TBA-Test.....	60
Abbildung 29	Trennung der Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1	63
Abbildung 30	Trennung der Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 200 nm ...	64
Abbildung 31	Trennung der Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 234 nm ...	64
Abbildung 32	Trennung der Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 200 nm ...	65
Abbildung 33	Trennung der Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 234 nm ...	65
Abbildung 34	Trennung der Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99,5/0,5; Detektionswellenlänge 200 nm.....	67
Abbildung 35	Vergleich des Responseverhaltens von 1,5-Diphenylcarbohydrazid (DPC) in Abhängigkeit vom eingesetzten Lösungsmittel.....	70
Abbildung 36	Zeitlicher Verlauf der Peakhöhen bei der mehrmaligen Injektion einer Lösung von 13S-HPOD-Me-Ester 500 µmol/l (30 mg DPC/50 ml; 25 m PTFE-Kapillare 0,3 mm ID; 65°C).....	77
Abbildung 37	Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration bei der Nachsäulenderivatisierung mit DPC	77
Abbildung 38	Analyse verschiedener Hydroperoxide aus der Oxidation von Fettsäuremethylestern mit Singulett-Sauerstoff (Säule: Superspher Si 60; 250-4; Eluent: Hexan/2-Propanol 99/1)	80
Abbildung 39	Strukturformel von Mikroperoxidase-11 (MP-11)	84
Abbildung 40	Reaktionsverlauf der Immobilisierung von Enzymen mit EDAC an Aminopropyl-CPG-Beads.....	86
Abbildung 41	Nachweis von Hydroperoxiden durch enzymkatalysierte Kupplung von 4-Aminoantipyrin mit Phenol	87
Abbildung 42	Nachweis der Aktivität immobilisierter Glucoseoxidase.....	88
Abbildung 43	Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Mikroperoxidase (Beadsorte 50/63,2)	94
Abbildung 44	Aktivität der Enzymimmobilisate in Abhängigkeit von der verwendeten Beadsorte	95
Abbildung 45	Abhängigkeit des Response am Fluoreszenz-Detektor von der Temperatur des Enzymreaktors bei der RP-HPLC-Bestimmung von 13S-HPOD	96

Abbildung 46	Abhängigkeit des Response am Fluoreszenz-Detektor von der Flußrate der Reagenzienlösung bei der RP-HPLC-Bestimmung von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester mit dem 2-Pumpensystem.....	97
Abbildung 47	Basenkatalysierte Hydrolyse der zur Immobilisierung genutzten Säureamidbildung.....	98
Abbildung 48	Kalibrierkurve für 13S-HPOD im 2-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion.....	99
Abbildung 49	Kalibrierkurve für 13S-HPOD-Me-Ester im 2-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion.....	100
Abbildung 50	Kalibrierkurve für 13S-HPOD im 3-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion.....	100
Abbildung 51	Kalibrierkurve für 13S-HPOD-Me-Ester im 3-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion.....	101
Abbildung 52	Lagerstabilität von Lebensmitteln in Abhängigkeit von der Wasseraktivität nach Labuza	107
Abbildung 53	Response des 13S-HPOD-Me-Esters in Abhängigkeit von der Menge zugesetzter Natriummethylatlösung (HPLC-Untersuchung mit Fluoreszenzdetektion)	112
Abbildung 54	Abhängigkeit des FOX2-Testes vom verwendeten Lösungsmittel	113
Abbildung 55	Abhängigkeit der Peroxidzahl vom a_w -Wert mit Hilfe des FOX2-Testes..	114
Abbildung 56	Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Oxidation von Lebensmittelgemischen verschiedener a_w -Werte mit dem FOX2-Test.....	115
Abbildung 57	Chromatogramme einer mit Natriummethylat umgeesterten Distelölprobe.....	117
Abbildung 58	Oxidation von Distelöl in Abhängigkeit vom a_w -Wert (HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion)	118
Abbildung 59	Zeitliche Änderung der Hydroperoxidkonzentration während der Oxidation von Distelöl bei verschiedenen a_w -Werten (HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion).....	119
Abbildung 60	Oxidation von Distelöl in Abhängigkeit der vom a_w -Wert (HPLC-Bestimmung mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenz-Detektion)	119
Abbildung 61	Zeitliche Änderung der Hydroperoxidkonzentration während der Oxidation von Distelöl bei verschiedenen a_w -Werten (HPLC-Bestimmung mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenz-Detektion).....	120
Abbildung 62	Abhängigkeit des Response von der Flußrate der Reagenzienlösung bei der DMPD-Nachsäulenderivatisierung (Detektionswellenlänge 553 nm) .	121
Abbildung 63	Oxidation von Distelöl in Abhängigkeit der a_w -Wert (HPLC-Bestimmung mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung (DMPD-System))	122

Abbildung 64	Zeitliche Änderung der Hydroperoxidkonzentration während der Oxidation von Distelöl bei verschiedenen a_w -Werten (HPLC-Bestimmung mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung (DMPD-System))	123
Abbildung 65	Chromatogramme von umgeesterten Distelölproben (DMPD-UV/VIS-HPLC)	125
Abbildung 66	Kalibriergerade für die HPLC-Bestimmung von HPOD-Me-Ester mit UV-Detektion bei 234 nm	172
Abbildung 67	Kalibriergerade für die HPLC-Bestimmung von HPOD-Me-Ester mit Fluoreszenz-Detektion (Enzymreaktor)	173
Abbildung 68	Kalibriergerade für die HPLC-Bestimmung von HPOD-Me-Ester mit UV/VIS-Detektion (DMPD-System)	175

Tabelle 1	Klassifizierung der Lipide.....	2
Tabelle 2	Induktionsperiode und relative Oxidationsgeschwindigkeit von Fettsäuren bei 25 °C	8
Tabelle 3	Peroxidierungsspezifitäten von Lipoxidasen gegenüber Linolsäure	11
Tabelle 4	Bestimmung des Proteingehaltes von Lipoxidase aus Kartoffeln	34
Tabelle 5	Bestimmung der Aktivität von Lipoxidase aus Kartoffeln.....	36
Tabelle 6	Bestrahlungsdauer und Hydroperoxid-Ausbeuten bei der photosensibilisierten Oxidation von Fettsäuremethylestern.....	38
Tabelle 7	Auswertung der EI-Massenspektren von Hydroperoxiden einiger Fettsäuremethylester aus der Oxidation mit Singulett-sauerstoff	42
Tabelle 8	Auswertung der EI-Massenspektren der 13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure und abgeleiteter Derivate	43
Tabelle 9	Auswertung der NMR-Spektren von Hydroperoxiden des Ölsäuremethylesters aus der Oxidation mit Singulett-sauerstoff.....	45
Tabelle 10	Auswertung der NMR-Spektren von Hydroperoxiden des Linolsäuremethylesters aus der Oxidation mit Singulett-sauerstoff.....	45
Tabelle 11	Auswertung der NMR-Spektren von Hydroperoxiden des Linolensäuremethylesters aus der Oxidation mit Singulett-sauerstoff.....	45
Tabelle 12	¹ H-NMR-Daten verschiedener Linol- und Linolensäurederivate.....	47
Tabelle 13	¹³ C-NMR-Daten verschiedener Linol- und Linolensäurederivate.....	48
Tabelle 14	¹³ C-NMR-Daten verschiedener Trilinolein-Derivate	49
Tabelle 15	¹ H-NMR-Daten verschiedener Trilinolein-Derivate	50
Tabelle 16	Kalibrierfunktionen, Korrelationskoeffizienten, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen photometrischer Bestimmungsmethoden für Hydroperoxide.....	62
Tabelle 17	Untersuchte Reaktionssysteme zur Nachsäulenderivatisierung in der NP-HPLC von Lipidhydroperoxiden	69
Tabelle 18	Einflußfaktoren auf die Peakhöhe	72
Tabelle 19	Zusammenfassung der Ergebnisse für die ersten drei Optimierungsschritte	73
Tabelle 20	Zusammenfassung der Ergebnisse für die Optimierungsschritte 4 und 5	74
Tabelle 21	Breite der Peaks auf halber Höhe in Abhängigkeit von der verwendeten Reaktionskapillare	76
Tabelle 22	Parameter für die optimierte Nachsäulenderivatisierung mit 1,5-Diphenylcarbohydrazid	76
Tabelle 23	Kenngrößen der Kalibriergeraden und berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von 13 <i>S</i> -HPOD-Me-Ester bei Verwendung des optimierten DPC-Systems	78
Tabelle 24	Vor- und Nachteile verschiedener Lösungsansätze zur Minimierung der Betriebskosten bei der MP-11/PES-Nachsäulenderivatisierung	81

Tabelle 25	Konzepte zur Enzymimmobilisierung	82
Tabelle 26	Beispiele für funktionelle Gruppen an Trägermaterialien und an Enzymen, die zur Immobilisierung genutzt werden können.....	83
Tabelle 27	Physikalische Eigenschaften der verwendeten Aminopropyl-Beads	85
Tabelle 28	Ermittelte Belegungen von Aminopropyl-CPG-Beads mit Mikroperoxidase-11 (AAS-Messungen).....	90
Tabelle 29	Abmessungen der verwendeten Reaktoren	91
Tabelle 30	Kalibrierdaten und Kenngrößen von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester bei Verwendung verschiedener Enzymreaktoren im 2-Pumpen-System.....	102
Tabelle 31	Retentionszeiten t_R und Peakbreiten auf halber Höhe w_h von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester in Abhängigkeit von der Beadsorte und dem Packverfahren der Enzymreaktoren	103
Tabelle 32	Mittlere Fettsäurezusammensetzung von Distelöl (Saflor; <i>Carthamus tinctorius</i>).....	108
Tabelle 33	Relative Feuchte über gesättigten Salzlösungen bei 40°C (nach Rockland und DIN 50008).....	109
Tabelle 34	Geräteparameter zur HPLC-Bestimmung von Ölproben mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung	116
Tabelle 35	Geräteparameter zur HPLC-Bestimmung von Ölproben bei nicht-enzymatischer Nachsäulenderivatisierung mit DMPD	121
Tabelle 36	NMR-Daten verschiedener Lösungsmittel.....	134
Tabelle 37	Prüfgrößen für den G-Test nach Cochran	158
Tabelle 38	Prüfgrößen für den t-Test.....	158
Tabelle 39	Versuchsplan für den 1. Optimierungsschritt	160
Tabelle 40	Versuchsplan für den 2. Optimierungsschritt	161
Tabelle 41	Versuchsplan für den 3. Optimierungsschritt	162
Tabelle 42	Versuchsplan für den 4. Optimierungsschritt	163
Tabelle 43	Versuchsplan für den 5. Optimierungsschritt	163
Tabelle 44	Ergebnisse des 1. Optimierungsschrittes	164
Tabelle 45	Ergebnisse des 2. Optimierungsschrittes	165
Tabelle 46	Ergebnisse des 3. Optimierungsschrittes	166
Tabelle 47	Ergebnisse des 4. Optimierungsschrittes	167
Tabelle 48	Ergebnisse des 5. Optimierungsschrittes	168
Tabelle 49	Bestimmung der Belegung von Aminopropyl-CPG-Beads mit Mikroperoxidase-11	170

0 Abstract

To develop a number of photometric and fluorimetric procedures for sensitive determination of lipid hydroperoxides (LHPs) in cuvettes and in HPLC systems, biologically relevant LHPs were synthesised either isomerically pure or as mixtures of isomers by oxidation of fatty acids with lipoxidase or $^1\text{O}_2$. The methods of previous work were used as starting points for the syntheses, but individual steps were substantially improved and the yield of by-products greatly reduced. The compounds synthesised were identified mainly by ^1H - and ^{13}C -NMR-spectroscopy.

The detection limits of the various photometric methods for lipid hydroperoxides were compared with a newly developed procedure. This test is based on the Fe^{2+} -catalysed conversion of N,N,N',N'-tetramethyl phenylene diamine to a blue radical cation by LHP. The detection limit of ca. 8-11 $\mu\text{mol/l}$ was in the region of other well-known methods (e.g. FOX2 test, measurement of the I_3^- -absorption). Literature claims that the TBA test does not permit any quantitative statement about the degree of oxidation of oil or fat samples were confirmed.

Normal-phase HPLC proved to be an efficient method for separating the hydroperoxide products of the photosensitised oxidation of fatty acid methyl esters. However, since there still were no selective detection methods for lipid peroxides in the NP-HPLC system, a procedure was developed for a post-column reaction of hydroperoxides, followed by UV/VIS detection. This method is based on the oxidation of the colourless 1,5-diphenyl carbohydrazide to the red 1,5-diphenyl carbazone with succeeding photometric detection. The optimisation of the detection included a statistical procedure that made it possible to vary several parameters at the same time. The detection limit achieved with the system thus optimised was ca. 17 $\mu\text{mol/l}$, somewhat higher than that of other detectors used in RP-HPLC.

The use of immobilised microperoxidase-11 for the selective fluorescence detection of hydroperoxides in RP-HPLC was described for the first time. To this end, MP-11 was immobilised on micro-porous glass (CPG BEADS) without the use of spacer molecules. Substantially higher immobilisation and peroxidase activity could be achieved in this way. Neither the pore dimensions nor the pore volume of the type of beads used had any influence on the peroxidase activity. Fixed-bed reactors were prepared for use in an HPLC system with immobilised MP-11. The detection limits achieved with this system, 1-3 $\mu\text{mol/l}$, were similar to those of the original system with microperoxidase dissolved in a reagent solution.

The efficiency of the enzyme reactors developed was shown in the investigation of oxidised oil samples. An attempt was made to confirm a dependency of the oxidation of fats in model foods on the water content of the sample, as described in the literature. As analytical methods there were available several photometric test methods and UV/VIS- and fluorescence-HPLC methods with non-enzymatic post-column derivatisation as well as enzymatic post-column derivatisation with the newly developed enzyme reactors. As it turned out, the effects described in the literature could not be reproduced, but the results from all the methods used were in agreement, so that the enzyme reactor developed in this work can be seen as a sensitive and economical means for the selective detection of lipid hydroperoxides in real samples.

In the study of oxidised oils, the sample preparation was also considerably simplified by the use of direct transesterification with sodium methylate, so that the complicated and error-prone removal of non-oxidised sample constituents by solid-phase extraction could be avoided. The high proportion of non-oxidised fatty acid esters remaining in the samples had no unfavourable effects on the HPLC analysis.

1 Einleitung - Vorkommen und Bedeutung von Lipidhydroperoxiden

Neben Kohlenhydraten, Peptiden und Kohlenwasserstoffen spielen die Lipide in der belebten Natur eine wesentliche Rolle. Als Lipide (griech.: lipos = Speck) bezeichnet man dabei eine Gruppe von Substanzen unterschiedlicher Strukturen, die sich fast alle durch ihre Unlöslichkeit in Wasser auszeichnen. Amphiphile Lipide können jedoch Kolloide, Micellen oder flüssigkristalline Phasen bilden.¹ Die Klassifizierung der Lipide kann entweder nach der Polarität oder aber auch nach dem Acylrest (bei Fettsäureestern) erfolgen:

Nicht verseifbare Lipide			Verseifbare Lipide			
Fettsäuren und Derivate	Isoprenederivate		Zahl der Acylreste	Verestert mit	Weitere Komponenten	Bezeichnung
	Terpene	Steroide				
Gesättigte Fettsäuren	Retinol	Cholesterin	1	langkettigen Alkoholen	—	Wachse
Ungesättigte Fettsäuren	Phyllochinone	Steroidhormone	1-3	Glycerin	—	Acylglyceride
Essentielle Fettsäuren	Tocopherol	D-Vitamine	1-2	Glycerin-3-phosphat	Serin, Ethanolamin, Cholin, Inositol	Phosphoglyceride
Prostaglandine	Dolichol	Gallensäuren	1	Sphingosin	Phosphorylcholin, Galaktose, Oligosaccharide	Sphingolipide
			1	Cholesterin	—	Cholesterinester

Tabelle 1 Klassifizierung der Lipide²

Eine große Gruppe innerhalb der Lipide bilden die Fettsäuren bzw. deren Ester. Für diese Verbindungen soll in dieser Arbeit der Begriff Lipide synonym verwendet werden. Sowohl Fettsäuren als auch Fettsäureester kommen in der freien Natur vor und erfüllen dort sehr unterschiedliche Aufgaben. So sind die Phospholipide wesentliche Bestandteile der Zellmembranen, während Triacylglyceride in tierischen Geweben und in Organen bestimmter Pflanzen gespeichert werden, wo sie als Energielieferant dienen.

Ebenfalls eine große Rolle spielen die primären Oxidationsprodukte ungesättigter Fettsäuren und Fettsäureester, die sogenannten Lipidhydroperoxide. In gealterten Lebensmitteln sind diese Verbindungen und besonders auch deren weitere Abbauprodukte verantwortlich für ein ranziges Aroma. Zu den Abbauprodukten zählen dabei geruchsaktive Carbonylverbindungen

(flüchtige Aldehyde, wie z.B. Hexanal, Heptanal, Nonanal, Malondialdehyd), Alkane und Alkene.³ Die Lipidhydroperoxide selbst sind aber auch wichtige Zwischenstufen bei der Biosynthese einiger biologisch hochaktiver Substanzen, wie der Leukotriene. Der entscheidende Schritt in der Biosynthese dieser Verbindungen beruht auf der Einwirkung von 5-Lipoxygenasen auf Arachidonsäure. Dabei wird zunächst 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure gebildet, die dann unter Einwirkung weiterer Enzyme in verschiedene Leukotriene umgewandelt wird. Allgemein handelt es sich bei den Leukotrienen um Hydroxyderivate der Arachidonsäure, die besonders bei Entzündungsprozessen eine Schlüsselrolle spielen. So bewirkt z.B. das Leukotrien B₄ eine Aggregation von Leukocyten, die Freisetzung oxidierender Enzyme und die Erzeugung von Superoxidradikalen, die ihrerseits entzündungsfördernd und gewebezerstörend wirken.^{1,4} Man vermutet weiterhin, daß die Leukotriene auch bei Ödembildung, Asthma, Hypersensibilisierung, Schmerz und Fieber eine wichtige Rolle spielen.^{5,6}

Eine große Bedeutung wird den Lipidhydroperoxiden auch bei der Entstehung von Atherosklerose, welche die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen darstellt, zugeschrieben. Aufgrund einer Modifikation der im Blut befindlichen Lipoproteine kommt es dabei zu Veränderungen der arteriellen Gefäßwand. Diese Veränderungen führen durch Lipideinlagerung, Bindegewebsvermehrung und Verkalkung mit unregelmäßiger Verteilung zur Wandinstabilisierung, Gefäßverengung und letztendlich zur Ablagerung von Gerinnseln (atherosklerotische Plaque). Je nach Lokalisation dieser Schädigungen sind Durchblutungsstörungen im Gehirn (cerebrovasculäre Insuffizienz, Schlaganfall), im Herzen (coronare Herzkrankung, Herzinfarkt) und in den peripheren Arterien (arterielle Verschlusskrankheit) die Folge.¹ Die genaue Art der Modifikation der Lipoproteine ist noch nicht genau geklärt. Es wird jedoch allgemein angenommen, daß es sich dabei um eine Oxidation von LDL (low density lipoprotein) durch freie Radikale und/oder Lipoxygenasen handelt.^{7,8}

Lipidhydroperoxide spielen weiterhin bei der Photocarcinogenese und bei der Zerstörung von Proteinen und Biomembranen eine Rolle.^{9,10} So können diese Verbindungen z.B. nach einer Ozonbehandlung von Tabakpflanzen, *Escherichia coli* und *Stratum Corneum* der Maus in den entsprechenden Organismen bzw. Organen festgestellt werden.¹¹⁻¹³ Ein Zusammenhang zwischen der Alzheimerschen Krankheit und dem Auftreten von freien Radikalen, die durch metallkatalysierten Zerfall von Hydroperoxiden entstehen können, ist ebenfalls diskutiert worden.¹⁴

Allgemein wird die Belastung der lebenden Zelle durch die Anreicherung giftiger oxidierter Verbindungen, wie z.B. Lipidhydroperoxide, Wasserstoffperoxid oder Sauerstoffradikale,

unter dem Oberbegriff des "oxidativen Stresses" zusammengefaßt. Die Induktion des oxidativen Stresses kann z.B. durch Strahlungseinwirkung, Xenobiotika, Schwermetallionen oder zeitweise Unterbrechung der Blutzufuhr eines Organs (Ischämie/Reperfusion) erfolgen. Eine Schlüsselfunktion besitzen dabei besonders die Lipoxidasen, die u.a. bei der Zellverletzung freigesetzt werden. Sie greifen ungesättigte Fettsäuren wie Linol-, Linolen- oder Arachidonsäure an und führen zur Bildung der entsprechenden Hydroperoxide, die in Gegenwart von Metallionen, wie Fe^{2+} , zu teilweise sehr reaktiven sauerstoffhaltigen Radikalen zerfallen. Im weiteren Verlauf können diese Radikale dann durch Reaktion mit anderen Zellbestandteilen zu einer Schädigung führen¹⁰ bzw. eine weitere Lipidoxidation im Rahmen einer Radikalkettenreaktion hervorrufen (vgl. Abbildung 1).¹⁵

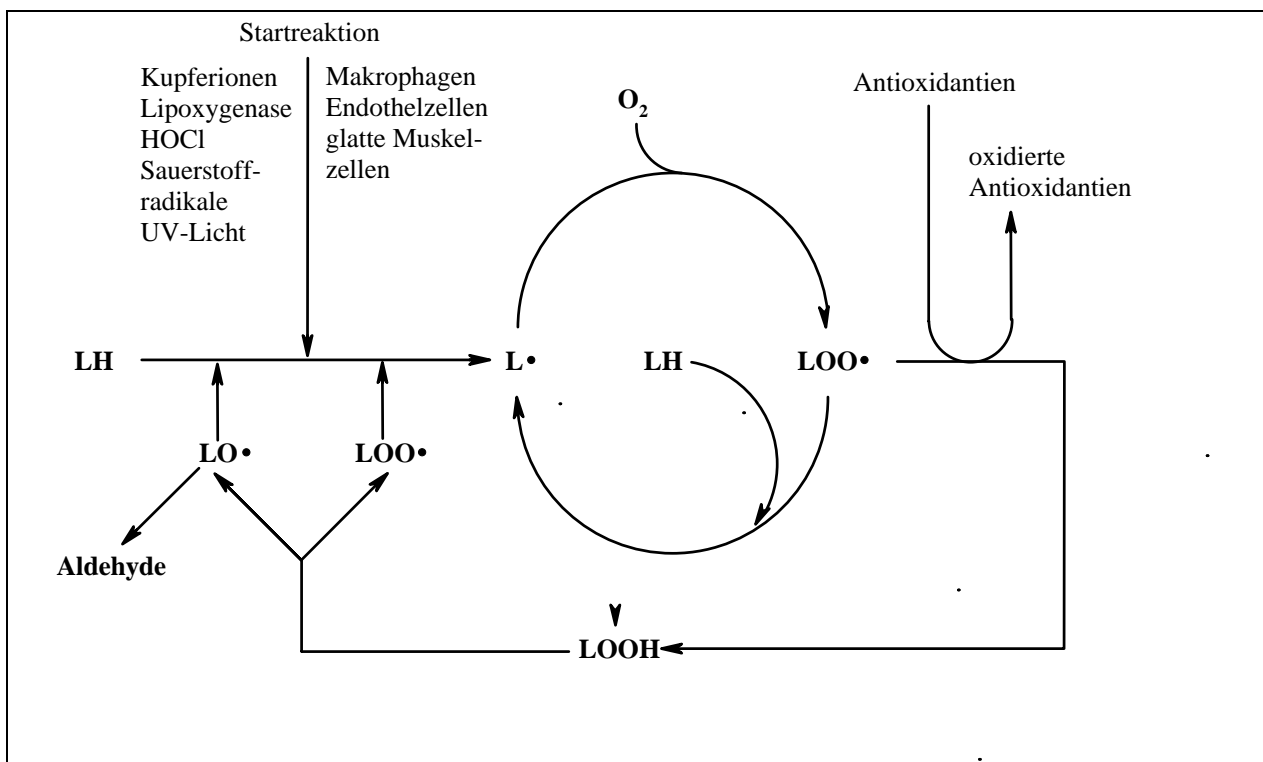


Abbildung 1 Oxidation von Lipiden, insbesondere von LDL (nach Sabieraj⁷)

LH = Lipid mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren; L• = Lipidradikal;
 LOO• = Lipidperoxyradikal; LO• = Lipidalkoxyradikal; LOOH = Lipidhydroperoxid. Der Kreis in der Mitte verdeutlicht die Kettenreaktion.

2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der großen biologischen Relevanz der Lipidhydroperoxide besteht nach wie vor ein Bedarf an möglichst selektiven und sensitiven Nachweismethoden für diese Verbindungen. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nimmt dabei in der Analytik von Lipidhydroperoxiden eine herausragende Stellung ein, da sich mit ihr auch komplexe Proben, wie z.B. Plasma oder Pflanzenextrakte, mit relativ geringem Aufwand analysieren lassen.

In dieser Arbeit sollten neue Verfahren zum Nachweis von Lipidhydroperoxiden in der HPLC entwickelt und mit bereits bestehenden Verfahren verglichen werden. Desweiteren sollte ein bereits bestehendes Verfahren zur enzymatischen Nachsäulenderivatisierung von Lipidhydroperoxiden durch Einsatz eines Enzymreaktors verbessert werden, um den Verbrauch des sehr teuren Enzyms zu senken. Die entwickelten Verfahren sollten anschließend zum Nachweis der Lipidoxidation in Lebensmitteln eingesetzt werden.

Für diese Arbeiten war es zwingend notwendig, entsprechende Referenzsubstanzen auf einfachem Wege in guter Ausbeute zu synthetisieren. Dazu sollten bereits bestehende Synthesewege überprüft und gegebenenfalls optimiert werden. Die hergestellten Substanzen sollten dann mittels spektrometrischer und chromatographischer Methoden untersucht werden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Synthesewege für Lipidhydroperoxide

3.1.1 Autoxidation

Die Synthese der Lipidhydroperoxide erfolgt am einfachsten ausgehend von den entsprechenden Fettsäuren bzw. deren Estern durch Autoxidation. Hierbei handelt es sich um eine Radikalkettenreaktion, die sich in Start-, Wachstums-, Verzweigungs- und Abbruchreaktion einteilen lässt. Im Verlauf des Kettenwachstums werden dabei verschiedene Hydroperoxide gebildet (Abbildung 2).

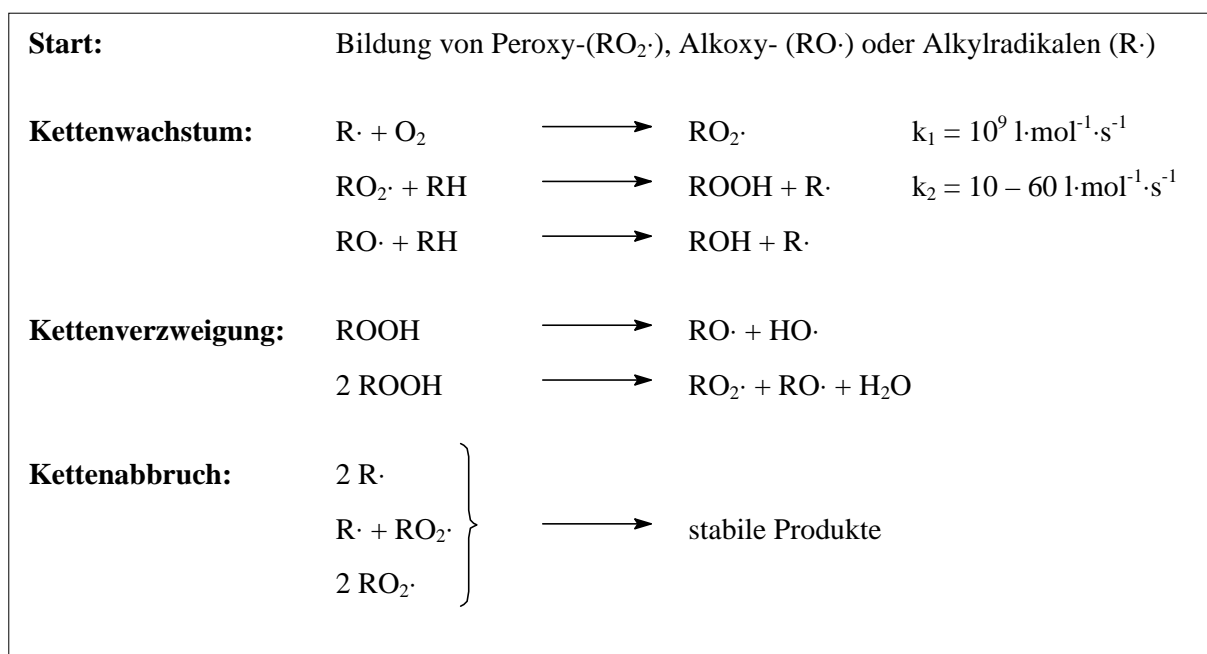


Abbildung 2 Teilreaktionen bei der Autoxidation von Lipiden³

Die Bildung der Radikale erfolgt bei den ungesättigten Fettsäuren durch Abstraktion eines allylischen Wasserstoffes. Aufgrund der Doppelbindung ist das freie Elektron über mehrere C-Atome delokalisiert. Ein Angriff von Sauerstoff kann somit an mehreren Stellen erfolgen, was letztendlich zu mehreren isomeren Hydroperoxiden führt. Das Verhältnis der gebildeten Hydroperoxide ist jedoch nicht immer gleich. Während bei Ölsäure und Linolsäure die isomeren Hydroperoxide zu annähernd gleichen Teilen entstehen, bilden sich aus der Linolensäure

vermutlich aus sterischen Gründen bevorzugt die 9- und 16-Hydroperoxyverbindungen (zu etwa 30 bzw. 46 %) ^{16,17} (Abbildung 3). Aus energetischen Gründen wird allgemein bei der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren nur die Bildung von Hydroperoxiden beobachtet, die ein konjugiertes Doppelbindungssystem aufweisen.

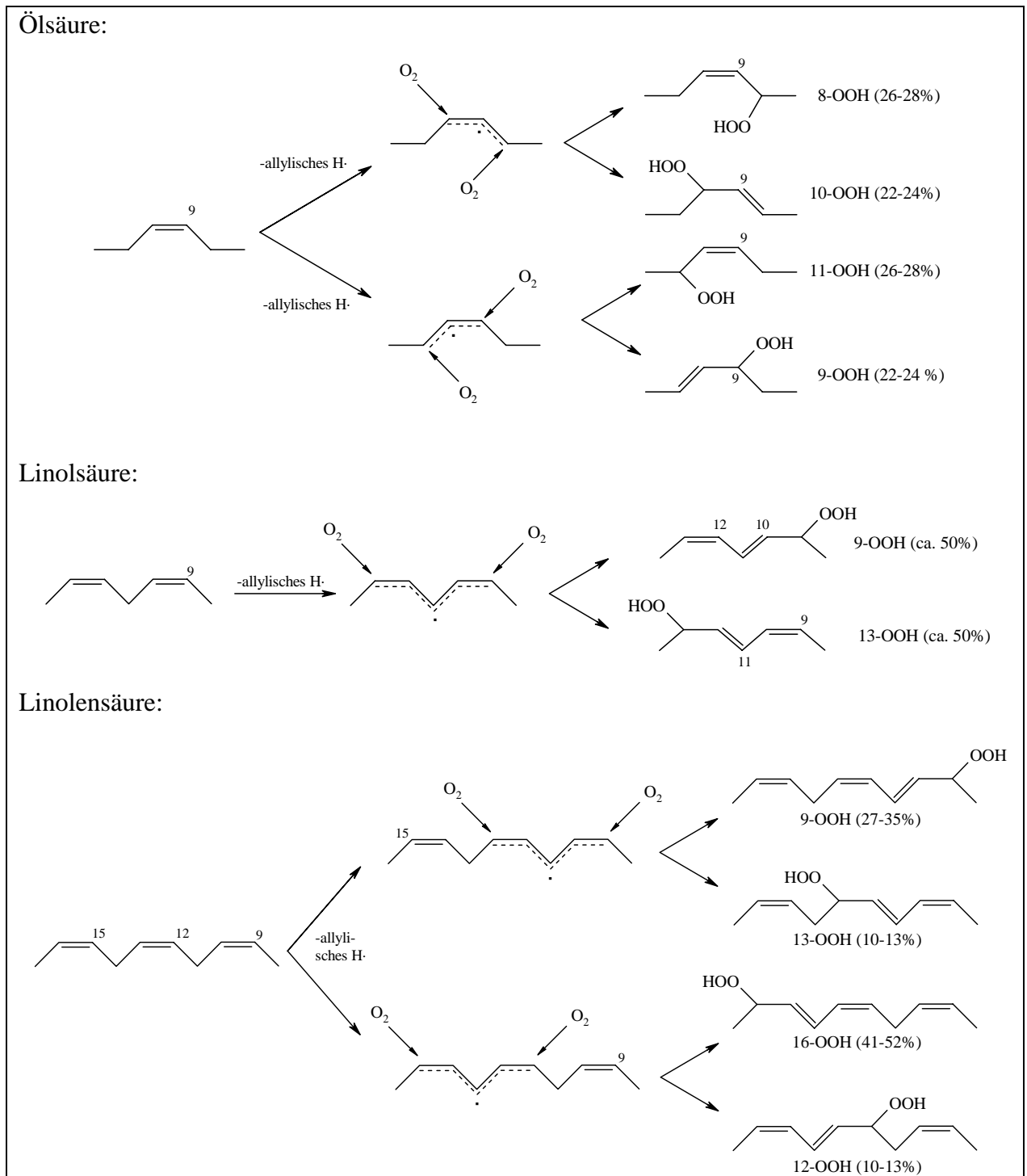


Abbildung 3 Produktverteilung bei der Autoxidation von Öl-, Linol- und Linolensäure

Der Radikalkettenmechanismus bei der Autoxidation erklärt auch die wesentlich höhere Oxidationsempfindlichkeit mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Da der Energieaufwand zur Abstraktion eines einfach allylischen H-Atoms etwa 322 kJ/mol beträgt, während für ein zweifach allylisches H-Atom nur 272 kJ/mol benötigt werden,³ erfolgt der Start der Radikalkettenreaktion bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren wesentlich schneller. Dies geht auch aus nachstehender Tabelle hervor:

Fettsäure	Zahl der einfach allylischen Protonen	Zahl der doppelt allylischen Protonen	Induktionsperiode in Stunden	relative Oxidationsgeschwindigkeit
Stearinsäure (18:0)	0	0	—	1
Ölsäure (18:1 C-9)	2	0	82	100
Linolsäure (18:2 C-9,12)	4	2	1	1200
Linolenäure (18:3 C-9,12,15)	6	4	1,34	2500

Tabelle 2 Induktionsperiode und relative Oxidationsgeschwindigkeit von Fettsäuren bei 25 °C³

Zur Synthese größerer Mengen von Lipidhydroperoxiden ist die Autoxidation jedoch nicht geeignet, da die Reaktionsrate im Vergleich zu anderen Synthesewegen nicht sehr groß ist. Außerdem muß damit gerechnet werden, daß sich, obwohl die Lipidhydroperoxide wesentlich stabiler als die kurzkettigen Alkyl- und Arylalkylhydroperoxide sind, die gebildeten Hydroperoxide im Laufe der Reaktionszeit wieder zersetzen. Dies tritt insbesondere dann auf, wenn zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit die Autoxidation bei höherer Temperatur durchgeführt wird.

3.1.2 Oxidation mit Singulett-Sauerstoff

Die Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit Singulett-Sauerstoff führt ebenfalls zu Hydroperoxiden. Im Vergleich zur Autoxidation erhält man mit dieser Methode aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch solche Hydroperoxide, die keine konjugierten Doppelbindungen

aufweisen. Es muß jedoch ein Sensibilisator vorhanden sein, der die Anregungsenergie auf das Oxidationsmittel, den Sauerstoff, überträgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit des Linol säuremethylesters mit Singulett-sauerstoff ist um den Faktor 1500 größer als mit Triplett-sauerstoff.¹⁶ Der Reaktionsmechanismus ist nicht genau bekannt, es werden jedoch zwei ähnliche Mechanismen vorgeschlagen,^{16,18} bei denen die Anregungsenergie entweder direkt vom Sensibilisator auf das Sauerstoffmolekül übertragen wird (Mechanismus 1) oder aber ein Komplex aus angeregtem Sensibilisator und Sauerstoff gebildet wird. Dieser Komplex überträgt dann den Sauerstoff auf ein Akzeptormolekül (Mechanismus 2).

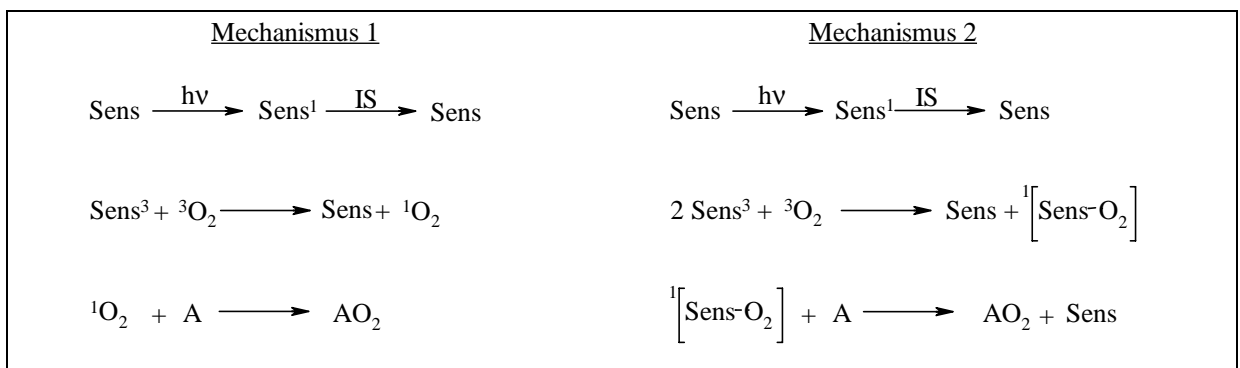


Abbildung 4 Mechanismen der Sauerstoffaktivierung bei der photosensibilisierten Oxidation mit Singulett-sauerstoff¹⁶

Der weitere Verlauf der Oxidation mit Singulett-sauerstoff erfolgt über eine spinerlaubte Addition des Sauerstoffs an die Doppelbindung der Fettsäure im Sinne einer En-Reaktion. Anschließend kommt es zu einer Verschiebung der Doppelbindung unter gleichzeitiger Änderung der Konfiguration von (Z) bzw. cis nach (E) bzw. trans (Abbildung 5).^{17,19}

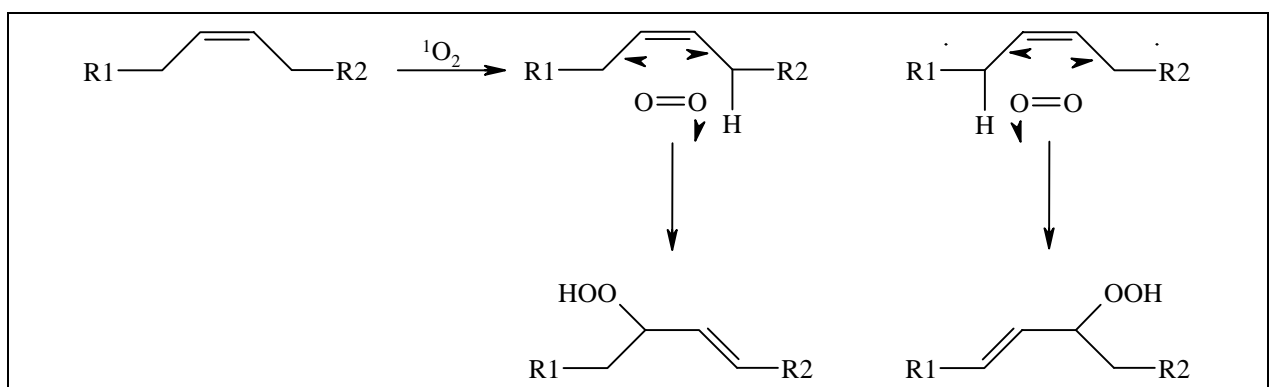


Abbildung 5 Reaktion von Verbindungen mit (Z)-konfigurierter Doppelbindung mit Singulett-sauerstoff

Die Bildung konjugierter Diensysteme ist bei der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit einem 1,4-Pentadienylsystem durch $^1\text{O}_2$ energetisch bevorzugt.²⁰ So bilden sich aus Linolensäure zu jeweils etwa 33 % die 9- bzw. 13-Hydroperoxyverbindungen, während die 10- und 12-Hydroperoxyverbindungen, die nichtkonjugierte Doppelbindungen enthalten, nur zu jeweils ca. 17 % gebildet werden. Bei der Linolensäure werden die 9- und 16-Hydroperoxide zu jeweils ca. 25 % gebildet. Die 10-, 12-, 13- und 15-Hydroperoxyverbindungen entstehen dagegen nur zu jeweils etwa 12-14 %. Vermutlich spielen auch hier sterische Gründe eine Rolle, die einen Angriff des Singulett-Sauerstoffes an der mittleren der drei Doppelbindungen erschweren.¹⁶

Da die Anregungsenergie zur Bildung von $^1\text{O}_2$ nur 96 kJ/mol ($^1\Delta_g$) bzw. 160 kJ/mol ($^1\Sigma_g^+$), (entsprechend 1260 bzw. 760 nm) beträgt,²¹ vermag fast jeder im Sichtbaren absorbierende Farbstoff Anregungsenergie auf ein Sauerstoffmolekül zu übertragen. Um eine hohe Lichtausbeute zu erreichen, werden vorzugsweise solche Sensibilisatoren eingesetzt, die über einen breiten Bereich des Spektrums absorbieren. Als Sensibilisatoren eignen sich sowohl natürliche (Chlorophyll, Phaeophytin, Riboflavin) wie auch synthetische Farbstoffe, hierbei insbesondere Methyleneblau, Bengalrosa und Acridinorange. Auf die Produktzusammensetzung hat die Art des verwendeten Sensibilisators keinen Einfluß. Es gibt allerdings deutliche Unterschiede in den Umsatzraten. Dies hängt mit den unterschiedlichen Quantenausbeuten und Stabilitäten der verschiedenen Farbstoffe gegenüber Singulett-Sauerstoff zusammen. Ebenso wirkt sich auch die Wahl des Lösungsmittels stark auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus.²²

Aufgrund der hohen Reaktivität des Singulett-Sauerstoffes kann insbesondere bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Fettsäureestern eine Zweitoxidation nicht immer ausgeschlossen werden. Weiterhin reagiert der gebildete Singulett-Sauerstoff in der Regel auch mit dem Sensibilisatormolekül. Man erhält dadurch ein sehr komplexes Produktgemisch, das neben den gewünschten Hydroperoxiden auch Oxidations- und Zerfallsprodukte des Sensibilisators enthält.

3.1.3 Enzymkatalysierte Oxidation

Zur Synthese isomerenreiner Lipidhydroperoxide empfiehlt sich bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren die Oxidation mit Hilfe von Lipoxidasen (EC 1.13.1.13). Mit diesen in pflanzlichem und tierischem Gewebe vorkommenden Enzymen können Fettsäuren und Fettsäureester regio- und stereospezifisch in ihre Hydroperoxide überführt werden. Die Regiospezifität hängt dabei stark von der Herkunft des Enzyms und von den Reaktionsbedingungen, insbesondere vom pH-Wert, ab (Tabelle 3).

Herkunft	pH-Optimum	Peroxidierungsspezifität		Typ
		9-LOOH (%)	13-LOOH (%)	
Sojabohne	9,0	5	95	I
Sojabohne	6,5	50	50	II
Erbse	6,5	50	50	II
Erdnuß	6,0	0	100	I
Kartoffel	5,5	95	5	I
Tomate	5,5	95	5	I
Weizen	6,0	90	10	I
Stachelbeere	6,5	45	55	II

Tabelle 3 Peroxidierungsspezifitäten von Lipoxidasen gegenüber Linolsäure³

Die in Tabelle 3 aufgeführten zwei Lipoxidase-Typen unterscheiden sich sowohl durch ihre Substratspezifität als auch durch ihr Produktspektrum. Beide Typen benötigen als Substrat ein (Z),(Z)-1,4-Pentadienylsystem. Im Gegensatz zu Typ-I-Lipoxidasen, die nur die freien Fettsäuren umzusetzen vermögen, können Typ-II-Lipoxidasen auch mit Fettsäureestern reagieren. Dabei wirken sie jedoch mehr als Katalysator einer Autoxidation, was zu einer relativ geringen Stereospezifität führt. Die Reaktion der Typ-I-Lipoxidasen erfolgt dagegen mit hoher Regio- und Stereospezifität, die sich innerhalb gewisser Grenzen durch die Reaktionsbedingungen steuern läßt.²³ Der Reaktionsverlauf bei der enzymkatalysierten Oxidation von Lipiden ist in Abbildung 6 dargestellt.

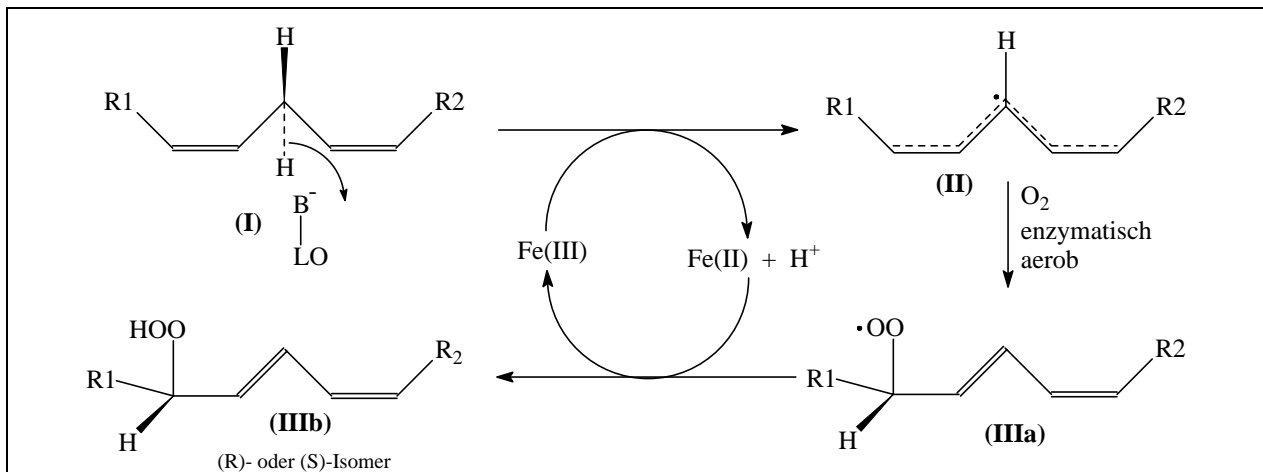


Abbildung 6 Reaktionsschema zur enzymatischen Oxidation von Lipiden mit Typ I-Lipoxidase (Erklärung siehe Text)^{24,25}

Bei der aeroben Reaktion wird die mehrfach ungesättigte Fettsäure (I) zunächst durch ein enzymgebundenes Nucleophil LOB^- deprotoniert und anschließend stereoselektiv zu dem entsprechenden Hydroperoxid (IIIb) oxidiert.

Die enzymkatalysierte Oxidation hat jedoch den Nachteil, daß nur aus Sojabohnen gewonnene Lipoxidase in größeren Mengen käuflich ist. Möchte man also andere Isomere als die, die Sojalipoxidase liefert, in reiner Form darstellen, so müssen die dafür notwendigen Enzyme zunächst mit recht aufwendigen Methoden isoliert werden.

Die Isolierung von Lipoxidasen aus pflanzlichen Materialien erfolgt in der Regel durch Homogenisierung des Pflanzenmaterials bei 0-4 °C, fraktionierte Proteinfällung mit Ammoniumsulfat, Dialyse gegen Pufferlösung und anschließende chromatographische Aufreinigung (Größenausschluß-, Adsorptions- oder Ionenaustauschchromatographie).^{26,27}

3.1.4 Chemoenzymatische Synthesewege für isomerenreine Lipidhydroperoxide

Neben den vorgestellten Synthesewegen für Hydroperoxide aus den entsprechenden Fettsäuren bzw. Fettsäureestern wurde auch die Synthese isomerenreiner 5-Hydroperoxy- und 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure auf chemischem Wege beschrieben.^{28,29} In isomerenreiner Form waren diese Verbindungen aufgrund ihrer geringen Stabilität und der begrenzten Verfügbarkeit der entsprechenden Lipoxidasen in größerer Menge nicht herstellbar, obwohl gerade ihnen als Vorstufen der Leukotriene und anderer biologisch aktiver Verbindungen sehr

bedeutende biologische Funktionen zukommen. Die Einführung der Hydroperoxygruppe erfolgte bei diesen Synthesen zwar auf enzymatischem Weg, als Substrate dienten jedoch Linolsäure bzw. eine nicht natürlich vorkommende Fettsäure. Das erhaltene Hydroperoxid wurde dann in einer mehrstufigen Synthese jeweils in ein Peroxyenal überführt, welches im Rahmen einer Wittig-Reaktion mit dem entsprechenden Ylid zu der gewünschten Verbindung gekoppelt wurde. Aufgrund ihrer Komplexität eignet sich diese Methode jedoch nicht zur Synthese größerer Mengen isomerenreiner Hydroperoxide.

Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Lipoxidasen mit Fettsäureestern wesentlich geringer ist als mit den freien Fettsäuren, ist die direkte enzymatische Oxidation von Fettsäureestern zur Einführung von Hydroperoxygruppen ungeeignet. Zur Synthese von Methylestern der Hydroperoxyfettsäuren hat sich die Methylierung mit Diazomethan bewährt.³⁰ Eine Methylierung der Hydroperoxygruppe kann bei Wahl eines geeigneten Lösungsmittelgemisches ausgeschlossen werden.³¹

Ausgehend von den Hydroperoxyfettsäuren lassen sich u.a. Cholesterylester, Triglyceride und Phospholipide auch durch eine Veresterung mit den entsprechenden Alkoholkomponenten synthetisieren.³²⁻³⁴ Hierbei muß jedoch die Hydroperoxygruppe durch Einführung einer Schutzgruppe an der Reaktion mit dem Veresterungsreagenz Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gehindert werden. Es käme sonst zur Ausbildung polymerer Strukturen bzw. zur Laktonisierung. Der Reaktionsverlauf ist in nachstehender Abbildung dargestellt.

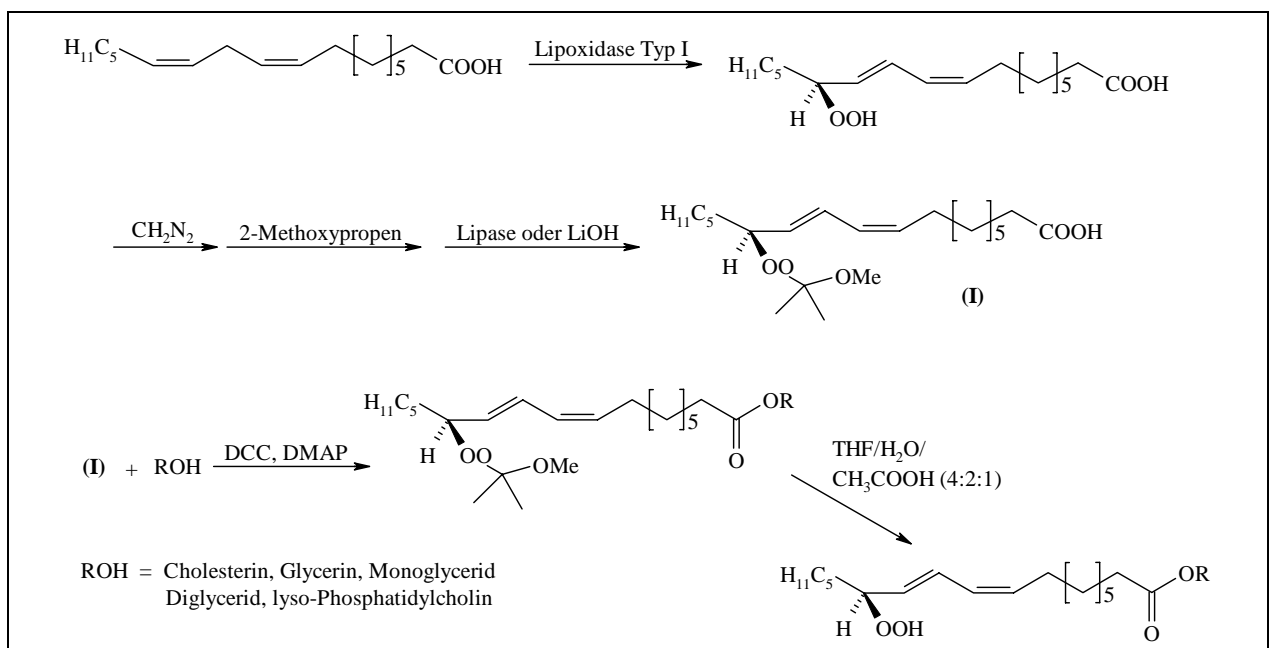


Abbildung 7 Synthese von 13S-9(Z),11(E)-octadecadiensäureestern nach Baba³³

3.2 Eigenschaften von Lipidhydroperoxiden

Die physikalischen Eigenschaften der Lipidhydroperoxide gleichen in der Regel denen der entsprechenden nichtoxidierten Lipide. Wichtige Unterschiede bestehen allerdings in den chemischen Eigenschaften. So besitzen die Lipidhydroperoxide aufgrund der Hydroperoxygruppe eine oxidierende Wirkung, die man sich besonders bei Nachweismethoden zunutze macht. Die möglichen Analysemethoden werden jedoch durch die thermische Instabilität der Hydroperoxide stark eingeschränkt.

Aufgrund der langen Kohlenwasserstoffketten und des geringen O/C-Verhältnisses sind Lipidhydroperoxide im Vergleich zu kleineren Alkylhydroperoxiden, wie z.B. Methyl- oder Ethylhydroperoxid bei Raumtemperatur wesentlich stabiler. Grosch gibt für Linolsäurehydroperoxide in Emulsionen bei Raumtemperatur eine Zerfallsrate von 10 % in 19 Stunden an.³⁵ Auch bei Temperaturen von etwa 50 °C ist die Zerfallsrate noch nicht besonders groß. So konnte in Distelölproben, die bei 40 und 60 °C an der Luft gelagert wurden, selbst nach einer Lagerungszeit von 250 Stunden immer noch eine Zunahme des Hydroperoxidgehaltes durch Autoxidation beobachtet werden.^{11,36} Eine rasche Zersetzung der Lipidhydroperoxide tritt erst bei Temperaturen über 100 °C auf. Dabei entstehen in der Regel komplexe Gemische von Zerfalls- und Polymerisationsprodukten.³⁷ Wichtige Zerfallsprodukte sind u.a. verschiedene flüchtige Carbonylverbindungen und Kohlenwasserstoffe. Sie spielen besonders bei der Alterung von Lebensmitteln eine große Rolle, da sie zu einem Fehl aroma führen und dadurch auch den Geschmack der Lebensmittel nachteilig beeinflussen.

Die Bildung der Kohlenwasserstoffe und Carbonylverbindungen erfolgt über einen homolytischen Zerfall der Hydroperoxide. Es handelt sich dabei um einen radikalischen Mechanismus, bei dem zunächst die Abspaltung eines Hydroxylradikals erfolgt. Das verbleibende Alkoxyradikal zerfällt dann über verschiedene Wege (Abbildung 8).

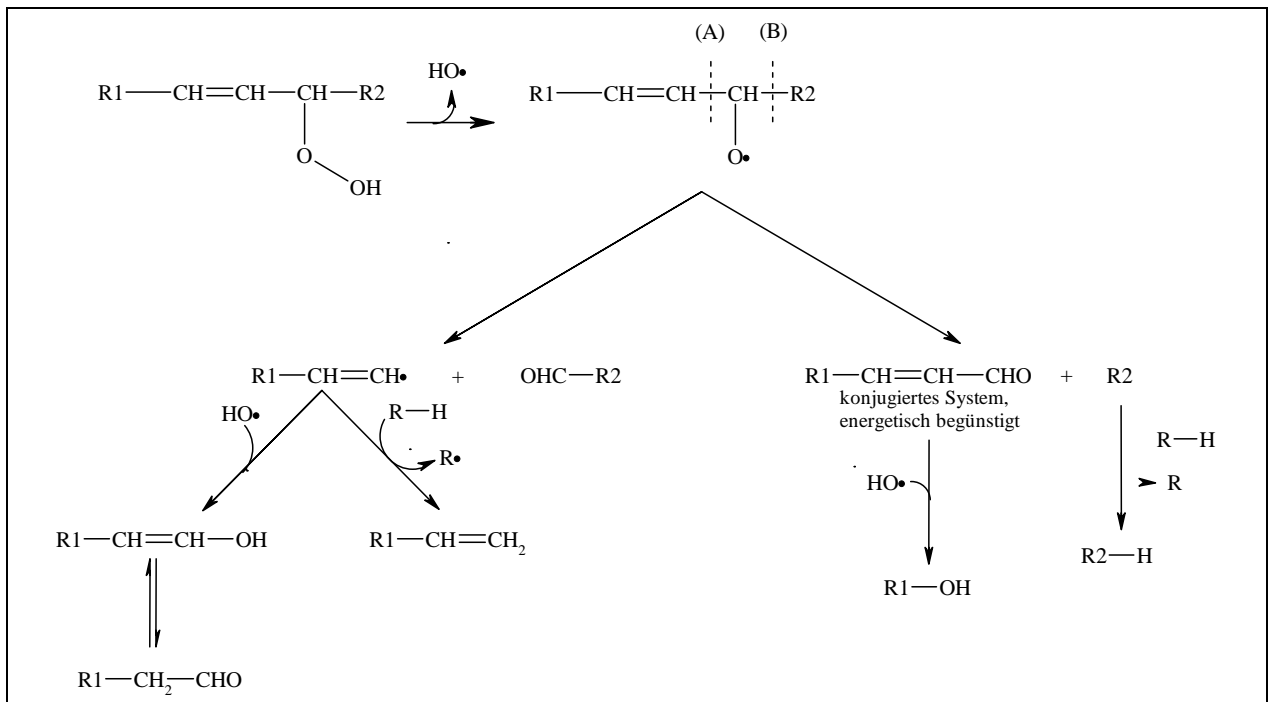
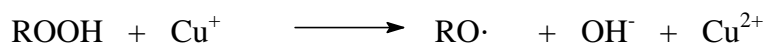
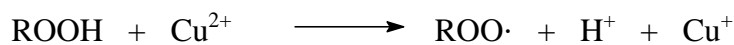


Abbildung 8 Reaktionsschema zum homolytischen Zerfall von Lipidhydroperoxiden^{38,39}

Die Zersetzung von Hydroperoxiden wird auch durch die Anwesenheit von Metallionen, wie Eisen, Kupfer, Kobalt und Mangan stark beschleunigt. Sie erfolgt dabei abhängig von der Oxidationsstufe des Metalls über Alkoxy- oder Peroxyradikale:⁴⁰



Die gebildeten Radikale können dann als Starter für weitere Radikalkettenreaktionen wirken. Reaktionen dieser Art zählen auch zu den Auslösern des oxidativen Stresses (vgl. Kap.1). Neben dem Zerfall kann bei höheren Temperaturen auch eine Isomerisierung der Lipidhydroperoxide eintreten. Diese Isomerisierung erfolgt ebenfalls über einen radikalischen Mechanismus, wobei sich durch H-Abstraktion zunächst ein Peroxyradikal bildet, welches in molekularen Sauerstoff und in ein Pentadienylradikal zerfällt (Abbildung 9).

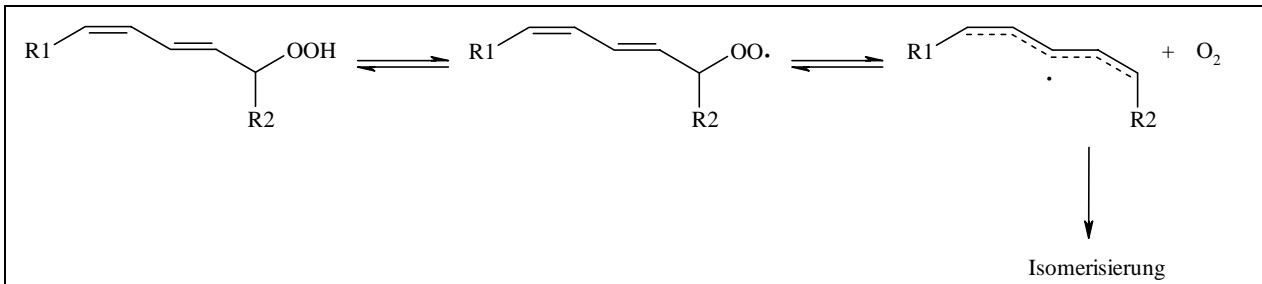


Abbildung 9 Isomerisierung von Lipidhydroperoxidne durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms und Bildung eines Peroxyradikals³⁸

Das Pentadienylradikal kann dann mit Sauerstoff wieder zu einem Hydroperoxid reagieren. Dabei ist gleichzeitig sowohl eine Umwandlung des (*E*),(*Z*)-Doppelbindungssystem in ein energetisch stabileres (*E*),(*E*)-Doppelbindungssystem als auch eine Wanderung der Hydroperoxygruppe möglich.

Während die Lipidhydroperoxide gegenüber schwachen Säuren relativ stabil sind, kommt es in Gegenwart starker Säuren zur Bildung verschiedener Epoxyverbindungen, die dann zu Folgeprodukten abreagieren (Abbildung 10).⁴¹

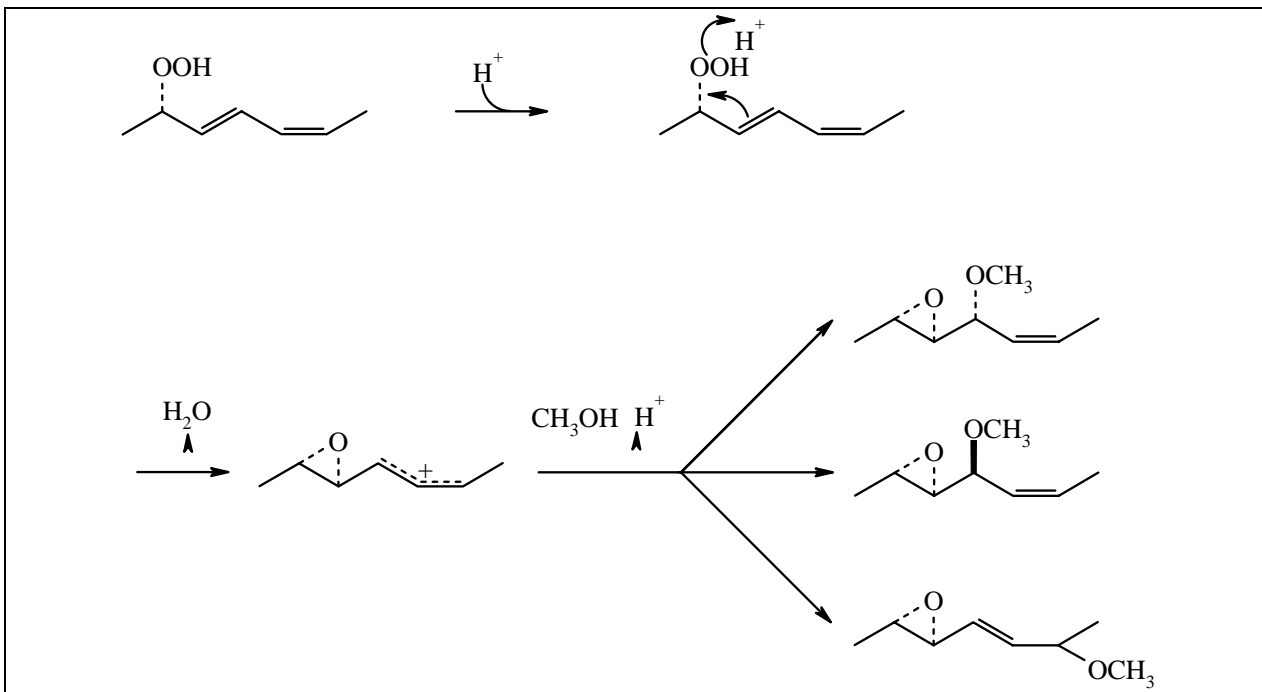


Abbildung 10 Bildung von Epoxiden bei der Reaktion von Hydroperoxiden mit starken Säuren

Auch in Gegenwart von Basen ist die Bildung von Epoxiden beobachtet worden, die dann unter diesen Bedingungen über eine Favorskii-Umlagerung in Säuren und Lactone zerfallen können.⁴² Vorwiegend erfolgt hier jedoch unter Beibehaltung der Stereochemie die Reaktion zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren. Der genaue Mechanismus dafür ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.⁴³

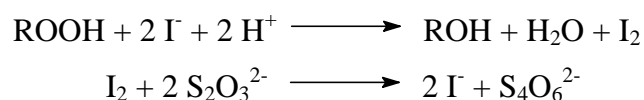
Aufgrund ihrer oxidierenden Eigenschaften bilden sich aus den Lipidhydroperoxiden die entsprechenden Hydroxyverbindungen auch in Gegenwart von Reduktionsmitteln, wie z.B. NaBH₄, LiAlH₄, PPh₃ oder auch I⁻. Diese Reaktionen sind besonders beim Nachweis der Lipidhydroperoxide von Bedeutung.

3.3 Nachweis von Hydroperoxiden

Da es sich bei den Lipidhydroperoxiden um eine schon länger bekannte und aufgrund ihrer biologischen Relevanz auch intensiv erforschte Verbindungsklasse handelt, existiert bereits eine große Anzahl von Nachweismethoden. Diese beruhen in der Regel auf der oxidierenden Wirkung der Hydroperoxygruppe. Durch Oxidation eines zugesetzten Reagenzes ist die Farb- oder Fluoreszenzänderung einer Lösung oder auch eine Chemilumineszenz meßbar. Gerade die spektrophotometrischen Verfahren wurden in der Vergangenheit zum Teil mit Erfolg auch zur Detektion in der HPLC eingesetzt. Nachstehend sind einige dieser Nachweismethoden erläutert, sofern sie im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung waren.

3.3.1 Photometrische Methoden

Eine der ältesten Bestimmungsmethoden ist die iodometrische Titration. Sie wurde schon 1929 und 1931 von Lea^{44,45} zur Untersuchung des Einflusses von Pro- und Antioxidantien auf die Lagerung von Fetten und 1932 von Wheeler⁴⁶ zum Nachweis von Lipidhydroperoxiden in Mais- und Baumwollöl eingesetzt. Das Hydroperoxid reagiert dabei mit einer Kaliumiodidlösung zu Iod, welches mit einer eingestellten Thiosulfatlösung zurücktitriert wird:



Diese Methode kann jedoch zu einem erhöhten Verbrauch an Thiosulfatlösung und somit zu einer erhöhten PO-Zahl führen (PO-Zahl = Peroxidzahl: Angabe der in 1 kg Fett enthaltenen Milliequivalente aktiven Sauerstoffs, die in einem Gemisch aus Chloroform und Eisessig aus Kaliumiodid elementares Iod freisetzen).

So wies Mehlenbacher⁴⁷ auf die Addition des freien Iods an Mehrfachbindungen (z.B. bei Öl-, Linol- und Linolenäure) und die Freisetzung von Iod aus Kaliumiodid durch in der Reaktionslösung gelösten Sauerstoff als Fehlerquellen hin. Dadurch wird u.a. die exakte Bestimmung des Titrationsendpunktes erschwert, weil infolge gelösten Sauerstoffs die Reaktionslösung oft nachdunkelt. Es wurde im Laufe der Zeit versucht, besonders die Oxidation des Iodids durch Luftsauerstoff durch geeignete apparative Methoden, wie z.B. durch Arbeiten unter Schutzgas, zu minimieren. Auch eine iodometrische Titration mit amperometrischer Endpunktsbestimmung wurde vorgeschlagen.⁴⁸

Die klassische iodometrische Titration wird heute kaum noch durchgeführt. Da die benötigte Probenmenge mit 5-10 g im Vergleich zu anderen Methoden relativ groß ist, wurde diese Methode bald abgewandelt und durch photometrische Verfahren ersetzt.

Eine weitere, ebenfalls schon sehr lange genutzte Bestimmungsmethode ist der sogenannte Thiobarbitursäure-Test (TBA-Test). Hier macht man sich die thermische Instabilität der Hydroperoxygruppe zunutze. Die Probe wird dazu im sauren Medium in Gegenwart von Thiobarbitursäure erhitzt. Unter diesen Bedingungen zerfallen die Lipidhydroperoxide zu Malondialdehyd, der mit Thiobarbitursäure eine rosafarbene Verbindung eingeht (Abbildung 11). Die Bestimmung erfolgt spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 532 nm oder fluorimetrisch.

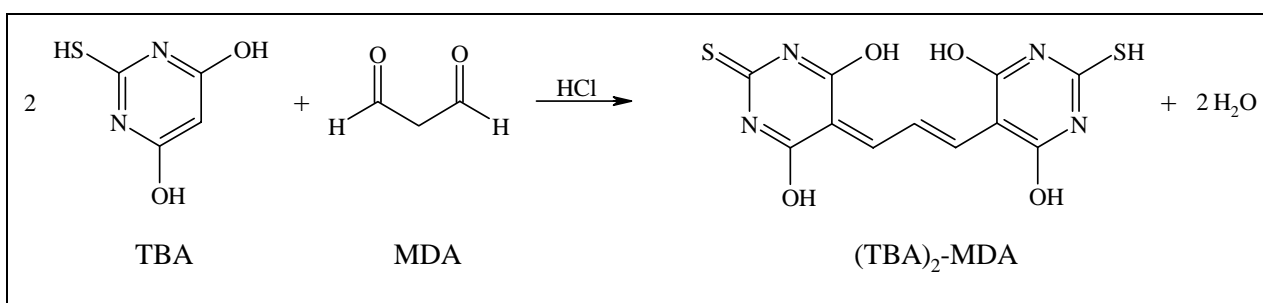


Abbildung 11 Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd (TBA-Test)

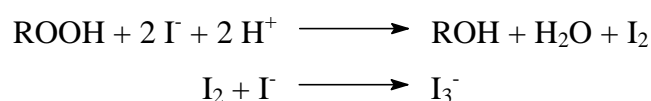
Der TBA-Test ist eigentlich nur auf solche Hydroperoxide anwendbar, die sich von ungesättigten Fettsäuren mit mindestens drei Doppelbindungen ableiten. Nur solche Verbindungen haben zur Hydroperoxygruppe β - und γ -ständige Doppelbindungen, die zur Bildung von Malondialdehyd notwendig sind.⁴⁹ Daß jedoch auch Hydroperoxide anderer Fettsäuren mit Hilfe dieses Tests gemessen wurden, zeugt von einer hohen Querempfindlichkeit gegenüber anderen Aldehyden, die ebenfalls beim Zerfall von Hydroperoxiden entstehen. Auch Glucose, Bilirubin und Sialinsäuren (bes. N-Acetylneuraminsäure) können zu Störungen führen.⁵⁰ Alle Verbindungen, die den TBA-Test stören können, werden unter der Bezeichnung "thiobarbituric acid reactive substances" (TBARS) zusammengefaßt. Die Nachteile des TBA-Testes wurden in der Literatur ausführlich diskutiert.⁴⁹⁻⁵² Zur Steigerung der Empfindlichkeit und zur Minimierung von Querempfindlichkeiten wurde in letzter Zeit statt Thiobarbitursäure besonders 1,3-Diphenyl-2-thiobarbitursäure (DPTBA) eingesetzt.⁵⁰ So zeigte DPTBA in HPLC-Versuchen gegenüber Glucose und Sialinsäuren keine Querempfindlichkeit.⁵³ Die Auswertung erfolgte bei diesem Verfahren fluorimetrisch. Die Empfindlichkeit konnte hierbei im Vergleich zum klassischen TBA-Test um das sechs- (photometrischer TBA-Test) bzw. 25-fache (fluorimetrischer TBA-Test) gesteigert⁵⁰ und gleichzeitig das Probenvolumen stark reduziert werden.

Trotz der Nachteile wird der TBA-Test auch heute noch angewendet, insbesondere für die Untersuchung oxidierter Plasma- und LDL-Proben, aber auch für die Hydroperoxidbestimmung in Lebensmitteln.⁵⁴⁻⁵⁶

Neben diesen beiden "klassischen" Methoden zur Bestimmung von Lipidhydroperoxiden wurde schon recht früh eine Reihe anderer, vorwiegend photometrischer Verfahren entwickelt.

a) Iodometrische Bestimmung mit photometrischer Auswertung

In Abänderung der Methode von Lea^{44,45} schlugen 1958 Heaton und Uri vor, bei der iodometrischen Bestimmung von Lipidhydroperoxiden einen Überschuß an Kaliumiodid einzusetzen.⁵⁷ Dieser Überschuß reagiert mit dem entstandenen Iod zum Triiodid-Anion, welches dann bei einer Wellenlänge von 362 nm photometrisch bestimmt werden kann:

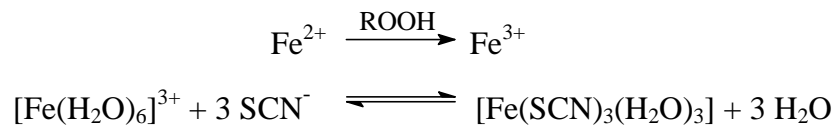


Damit ließ sich die Empfindlichkeit wesentlich erhöhen, da der molare Extinktionskoeffizient für das Triiodid-Anion $24600 \pm 250 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 362 nm beträgt. Für Iod wurde dagegen nur ein Wert von $525 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 485 nm bestimmt.^{57,58}

Durch verschiedene Änderungen, welche die Oxidation des Reagenzes durch Luftsauerstoff verhindern, konnte die Empfindlichkeit der Methode weiter gesteigert werden.⁵⁹

b) Eisen-Thiocyanat-Methode

Auch der Nachweis von Hydroperoxiden mit Hilfe von Eisen-Thiocyanat-Komplexen ist eine schon lange bekannte Methode. Dieses Verfahren wurde 1943 von Chapman und McFarlane und 1946 von Hills und Thiel zur Bestimmung der Peroxidzahl in Milchprodukten eingesetzt.^{60,61} Smith nutzte das Verfahren zur Bestimmung des Peroxidgehaltes in Fleischproben.⁶² Der Nachweis beruht auf der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch Hydroperoxide. In Gegenwart von Thiocyanat-Ionen bilden sich dann mit Fe^{3+} tiefrote Komplexe, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 510 nm vermessen werden.



Daneben treten noch Komplexionen anderer Zusammensetzung wie $[\text{Fe}(\text{SCN})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ und $[\text{Fe}(\text{SCN})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ auf.⁶³ Der Peroxidgehalt in den Probelösungen kann aus diesem Grunde nicht direkt über den molaren Extinktionskoeffizienten des Komplexes bestimmt werden. Es ist in jedem Fall die Verwendung einer Kalibrierlösung erforderlich.

Diese Bestimmungsmethode wird heute allerdings nur noch selten zur Bestimmung der Peroxidzahl in Milchprodukten eingesetzt.⁶⁴

c) FOX-Test

Der FOX-Test (FOX = ferrous oxidation in xylenol orange) wurde erstmals von Gupta⁶⁵ sowie Michaels und Hunt⁶⁶ zur Gehaltsbestimmung von Wasserstoffperoxidlösungen bzw. zum Nachweis von Hydroperoxiden in bestrahlten Nukleinsäure- und DNA-Proben eingesetzt. Jiang et al.^{67,68} und Nourooz-Zadeh et al.⁶⁹ entwickelten diesen Test zur allgemeinen Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in Plasmaproben weiter.

Der FOX-Test beruht auf der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) in Gegenwart von Lipidhydroperoxiden. Das Eisen(III) bildet mit dem zugesetzten Xylenorange einen braunroten Komplex, der bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch vermessen wird (Abbildung 12).

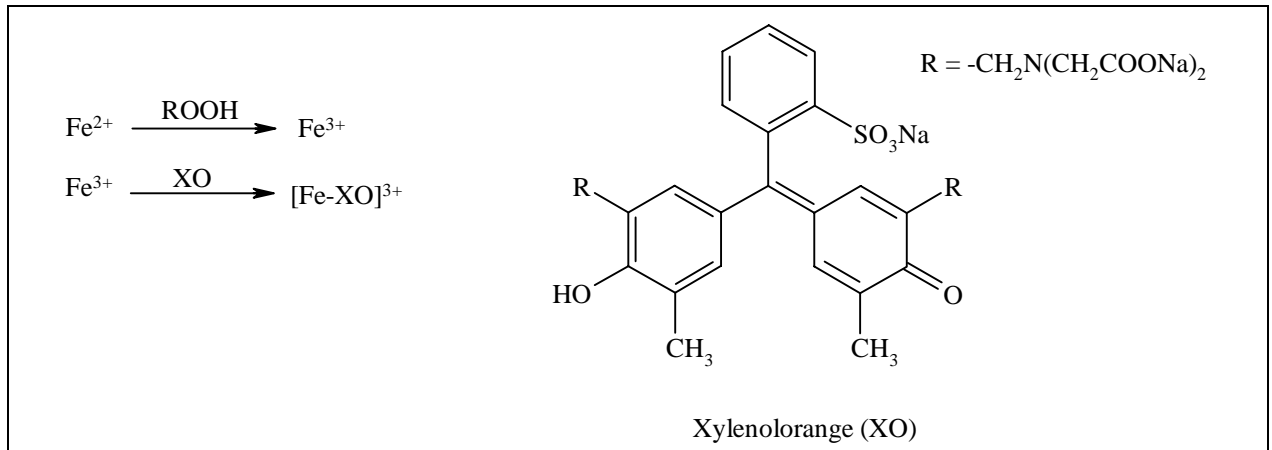


Abbildung 12 FOX-Test (FOX = ferrous oxidation in xylene orange)

Als Nachweisgrenzen für den photometrischen Test gaben Jiang et al. für Wasserstoffperoxid, Cumolhydroperoxid und tert.-Butylhydroperoxid etwa 25-50 nmol/l an.⁷⁰ Diese Werte scheinen jedoch als zu niedrig angesetzt, wie eigene Untersuchungen ergaben (vgl. Kapitel 4.2). Dennoch eignet sich die Methode gut zum Nachweis der Lipidperoxidation z. B. in Lebensmitteln.^{11,36} Vorteile des FOX-Testes sind die einfache Durchführbarkeit, der geringe Aufwand und die Verwendung leicht zugänglicher Chemikalien. Die Methode ist jedoch auf solche Lösungsmittelsysteme beschränkt, in denen sich das eingesetzte Ammoniumeisen-(II)-sulfat löst. Die Anwendung des Reaktionssystems zur Nachsäulenderivatisierung in der RP-HPLC und eine damit verbundene Analyse von Lipidhydroperoxiden in Distelölproben war ebenfalls erfolgreich.^{11,36}

d) Bestimmung von Hydroperoxiden mit Hilfe von Wurster-Salzen

Der Begriff "Wurster-Salze" ist eine Sammelbezeichnung für stark gefärbte Salze, deren Bildung erstmals von C. Wurster bei der partiellen Oxidation von N-Alkyl-1,4-phenylen-diaminen beobachtet wurde.⁷¹ Es handelt sich dabei um Radikalkationen der in Abbildung 13 dargestellten Form.

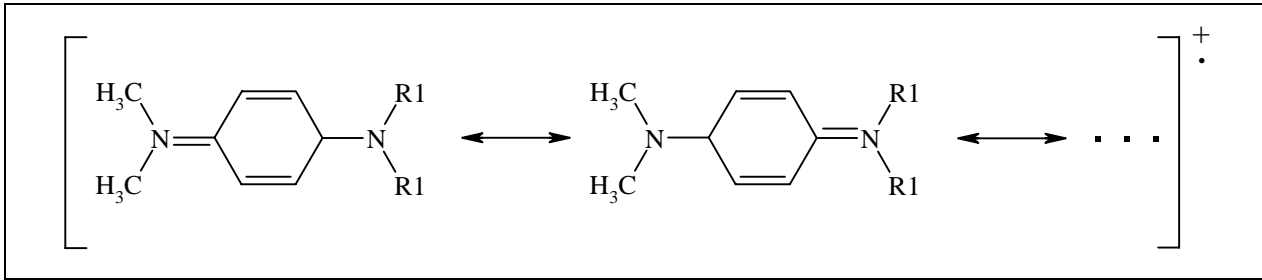


Abbildung 13 Grundstruktur der Wurster-Salze

Neben dieser Struktur existieren noch eine Reihe anderer mesomerer Grenzstrukturen, worauf letztendlich die Farbigkeit der Radikalkationen beruht.

Die Bildung der farbigen Oxidationsprodukte von N-Alkyl-1,4-phenylendiaminen wurde schon 1972 von Smith und Hill zur Bestimmung von Sterolhydroperoxiden auf Dünnschichtplatten eingesetzt.⁷² In Anwesenheit von Metallionen wird die Bildung der Radikalkationen stark katalysiert. So nutzten Hirayama und Unohara⁷³ sowie Kolotyrkina et al.⁷⁴ diese Reaktion zum Nachweis geringer Eisen(III)-Konzentrationen bis zu einer Konzentration von 40 ng/l. Die Katalyse durch Cer(IV)-Ionen wurde von Mori et al. bei einer Methode zum empfindlichen, quantitativen Nachweis von Benzoylperoxid genutzt.⁷⁵

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung von Lipidhydroperoxiden entwickelt, in dem N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin als Reagenz eingesetzt wird (vgl. Kapitel 4.2). Das Hydroperoxid oxidiert hierbei zunächst Fe²⁺ zu Fe³⁺, welches dann die Bildung des blauen Radikalkations bewirkt (Abbildung 14).

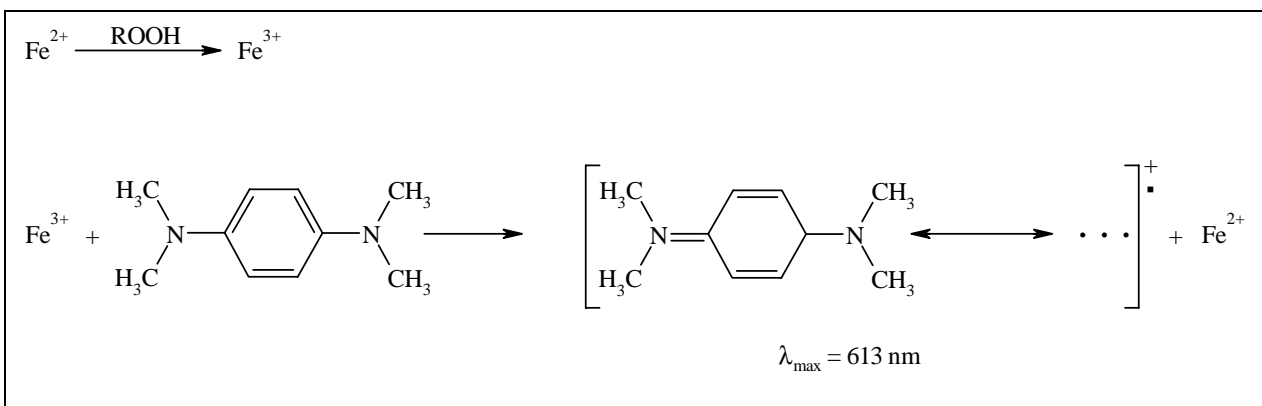


Abbildung 14 Photometrische Bestimmung von Lipidhydroperoxiden mit N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin

e) Bestimmung von Hydroperoxiden mit 1,5-Diphenylcarbohydrazid

Setzt man 1,5-Diphenylcarbohydrazid in Gegenwart einer Säure mit Hydroperoxiden um, so bildet sich bei erhöhter Temperatur ein roter Farbstoff (Diphenylcarbazon), der bei etwa 565 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.

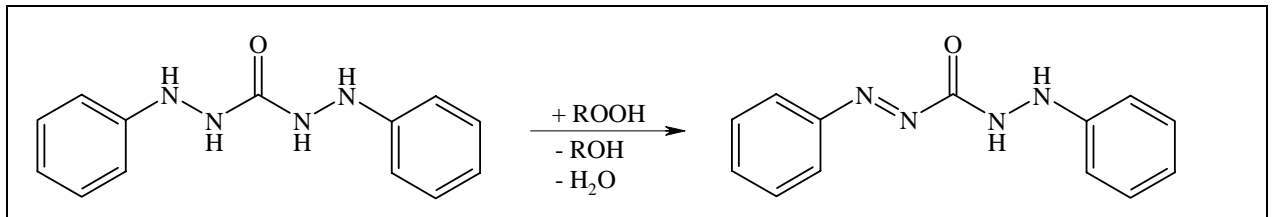


Abbildung 15 Reaktion von 1,5-Diphenylcarbohydrazid mit Hydroperoxiden

Diese Reaktion nutzte 1926 Stamm als erster zum Nachweis von oxidierten Fetten.⁷⁶ Dazu wurde das Reagenz in Vaseline suspendiert und mit dem zu untersuchenden Fett versetzt. Das Verfahren lieferte jedoch zunächst nur unbefriedigende Ergebnisse und wurde später von Korpaczky wesentlich verbessert, indem er das Reagenz in Tetrachlorethan löste und somit den Nachweis in Lösung durchführte.⁷⁷ Hamm et al. entwickelten auf dieser Grundlage eine photometrische Bestimmungsmethode für Lipidhydroperoxide und erreichten damit eine Nachweisempfindlichkeit, die in etwa auch mit anderen photometrischen Verfahren erreicht wurde.⁷⁸ Als Nachweisgrenze gaben Hamm et al. eine Peroxidzahl von 0,003 bei Einsatz von 1 g Fett an. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen entspricht das einer Konzentration von etwa 10 $\mu\text{mol/l}$. Da die Reaktion auch in apolaren, nichtwäßrigen Lösungsmitteln stattfindet, eignet sie sich zur Nachsäulenderivatisierung bei der Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in der Normalphasen-HPLC.

f) Leuko-Farbstoffe

Als Leuko-Farbstoffe (griech.: leukos = weiß, farblos) bezeichnet man weiße, farblose oder nur schwach gefärbte Verbindungen, die in der Regel die reduzierte Form von Farbstoffen darstellen. Da die oxidierte Form der Verbindungen kräftig gefärbt ist, eignen sich Leuko-Farbstoffe deshalb als Redoxindikatoren. Aufgrund der oxidierenden Eigenschaften der (Lipid-)Hydroperoxide ist auch eine Verwendung zum Nachweis und zur Quantifizierung von Hydroperoxiden denkbar.

Ueberreiter und Sorge beschrieben 1956 eine Methode zur Bestimmung organischer Peroxide, bei der Leuko-Methylenblau als Reagenz eingesetzt wurde, das mit den Peroxiden zu Methylenblau reagierte (Abbildung 16).^{79,80} Dieses konnte dann sehr empfindlich photometrisch nachgewiesen werden. Man erreichte damit eine Nachweisgrenze von etwa $3 \cdot 10^{-8}$ g aktivem Sauerstoff (entsprechend $0,095 \mu\text{mol Peroxid/l}$). Der große Nachteil besteht jedoch darin, daß das eingesetzte Leuko-Methylenblau zunächst unter erheblichem apparativem Aufwand hergestellt werden muß, da es aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit kommerziell nicht erhältlich ist und in feuchtem Zustand sehr schnell zum Methylenblau oxidiert wird.

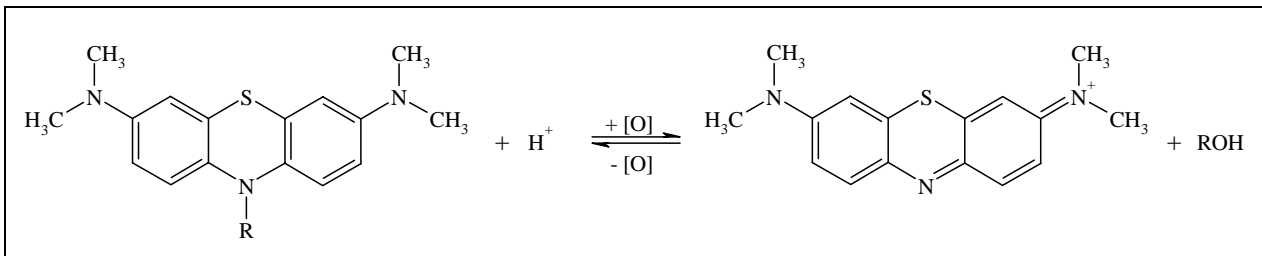


Abbildung 16 Reaktion von Leuko-Methylenblau-Derivaten mit Peroxiden ($R=H^{79}$, Benzoyl⁸¹, *N*-Methylcarbamoyl⁸³)

Um dieses Problem zu umgehen, stellten 1959 Eiss und Giesecke ein modifiziertes Verfahren vor, bei dem Benzoyl-Leuko-Methylenblau als Reagenz eingesetzt wurde.⁸¹ Diese Verbindung ist im Gegensatz zum Leuko-Methylenblau ($R = H$ in Abbildung 16) kommerziell erhältlich und wesentlich unempfindlicher gegenüber der Oxidation durch Luftsauerstoff. Allerdings geht damit auch eine Verringerung der Empfindlichkeit einher. So entwickelten Auerbach et al. mit diesem Reagenz eine Nachweismethode für Lipidhydroperoxide und erreichten damit eine Nachweisgrenze von etwa $1,6 \text{ nmol}$ (entsprechend ca. $32 \mu\text{mol/l}$).⁸² Auch der Einsatz anders substituierter Leuko-Methylenblau-Derivate führte zu keiner Steigerung der Empfindlichkeit. Yagi et al.⁸³ und Kanazawa et al.⁸⁴ erreichten durch Einsatz von 10-*N*-Carbamoylmethylenblau ebenfalls nur eine Nachweisgrenze von etwa $30 \mu\text{mol/l}$. Der Nachweis peroxidischer Verbindungen mit Hilfe anderer Leuko-Farbstoffe, insbesondere aus der Gruppe der Triphenylmethan-Farbstoffe (z.B. Leuko-Kristallviolett, Leuko-Malachitgrün oder Leuko-Patent-Blau-Violett), beschränkt sich in der Regel auf die Bestimmung von Wasserstoffperoxid. Diese Methoden sollen deshalb hier nicht weiter erläutert werden.

3.3.2 HPLC-Methoden

Die Bestimmung von Lipidhydroperoxiden mit Hilfe der HPLC gliedert sich in die Trennung an Normal (NP)- bzw. Umkehrphasen (RP) und die anschließende Detektion der eluierten Lipidhydroperoxide.

Hinsichtlich der Trennleistungen gibt es zwischen der NP- und der RP-HPLC große Unterschiede. Während an Normalphasen die Trennung isomerer Lipidhydroperoxide möglich ist, eignet sich die RP-HPLC besonders zur Trennung der Lipidklassen. Beide Methoden ergänzen sich somit. Beschränkungen in der Verwendbarkeit ergeben sich hauptsächlich durch die Detektion. Aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmittel bei der NP- und RP-HPLC gibt es jeweils sehr unterschiedliche Detektionsmöglichkeiten. Als universelle Methode eignet sich die UV-Detektion bei 234 nm (für Lipidhydroperoxide mit konjugierten Doppelbindungen) bzw. bei 200 nm (für Lipidhydroperoxide mit einer bzw. mit nicht konjugierten Doppelbindungen). Dabei muß jedoch die geringe Selektivität der Methode berücksichtigt werden. Besonders bei der Messung von Realproben kann es aufgrund vieler anderer, ebenfalls UV-aktiver Probenbestandteile zu recht komplexen Chromatogrammen kommen. Der Einsatz von selektiven Detektionsmethoden ist deshalb vorzuziehen. Aufgrund der Eigenschaften der eingesetzten Lösungsmittel stehen bei der RP-HPLC jedoch ungleich mehr solcher Nachweismethoden zur Verfügung als bei der NP-HPLC, obwohl diese bezüglich der Trennleistung überlegen ist.

3.3.2.1 Untersuchung von Lipidhydroperoxiden mittels NP-HPLC

Die bei der Oxidation von Fettsäuren und Fettsäureestern entstehenden Gemische isomerer Hydroperoxiden lassen sich mit Hilfe der Normalphasen-HPLC auftrennen. Im Gegensatz zur RP-HPLC führen bei solchen Trennsystemen jedoch schon sehr kleine Veränderungen des Eluenten (z.B. Erhöhung des 2-Propanol-Anteils im Eluenten um 1-2 %) zu großen Veränderungen in den Chromatogrammen. Auch Fremdeinflüsse machen sich sehr stark bemerkbar. So können Spuren von Wasser im Eluenten oder auf der stationären Phase die Trennleistung deutlich verringern. Der Aufbau eines stabilen Trennsystems ist aus diesem Grunde schwierig. Auch die langen Konditionierungszeiten bei einem Wechsel des Eluenten wirken sich nachteilig aus.

In der Literatur wird an Normalphasen nur die Trennung isomerer Hydroperoxyfettsäuremethylester beschrieben. Die Trennung der entsprechenden Säuren ist hingegen nicht möglich, da sie zu polar sind und auf den ebenfalls sehr polaren Kieselgelphasen zu stark retardiert werden. Dies führt letztendlich zu übermäßig langen Retentionszeiten und zu einem Verlust der Trennleistung.

Als Lösungsmittel werden in der Normalphasen-HPLC in der Regel binäre Gemische aus Hexan oder Heptan mit einem sehr geringen Zusatz von 2-Propanol, Ethanol oder Diethylether verwendet (maximal 2 %). Daneben kommen aber auch ternäre Gemische mit einem weiteren Zusatz von z.B. Eisessig zur Anwendung.⁸⁵⁻⁸⁷ Eine Trennung von Konfigurationsisomeren (*Z*),(*E*) bzw. (*E*),(*E*)), wie sie bei der Autoxidation entstehen, wurde ebenfalls beschrieben.⁸⁸

Aufgrund der eingesetzten Lösungsmittel ist man bei der Wahl geeigneter Detektionssysteme in der NP-HPLC sehr stark eingeschränkt. Der hohe Hexananteil schließt den Einsatz der meisten Nachsäulenderivatisierungsreagenzien wegen ihrer geringeren Löslichkeit aus. Auch die Verwendung enzymatischer Nachsäulenderivatisierungssysteme, bei denen z.B. Cytochrom c oder Mikroperoxidase eingesetzt werden, ist nicht ohne weiteres möglich, da Enzyme durch organische Lösungsmittel wie Hexan oder Chloroform denaturiert werden können.⁸⁹ Weiterhin laufen einige Reaktionen nur in protischen Lösungsmitteln ab oder verlangen die Anwesenheit von Wasser. Aus diesem Grunde wurden die in der Literatur beschriebenen Trennungen isomerer Lipidhydroperoxide an Normalphasen fast ausschließlich mit UV-Detektion bei 234 oder 200 nm durchgeführt.

Neben der Trennung isomerer Fettsäurehydroperoxide wurde an Normalphasen auch mehrfach die Trennung von Phospholipidhydroperoxiden beschrieben. Im Gegensatz zur Umkehrphasen-HPLC können hier Hydroperoxide verschiedener Phospholipidklassen wie z.B. Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine getrennt werden.⁹⁰ Eine Trennung in die isomeren Hydroperoxide innerhalb der Phospholipidklassen ist jedoch nicht möglich. Wegen der wesentlich höheren Polarität der Phospholipide muß für solche Trennungen auf andere Eluentensysteme zurückgegriffen werden als bei der Trennung isomerer Hydroperoxyfettsäuremethylester. So verwendeten Miyazawa et al. ein Gemisch von Methanol, Chloroform, 1-Propanol und Wasser als Eluent zur Trennung verschiedener Phospholipidhydroperoxide aus Plasma und LDL-Proben.^{91,92} Die Detektion erfolgte bei diesen Analysen durch Zudosierung einer Lösung von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) bzw.

Isoluminol (6-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) und Cytochrom c bzw. Mikroperoxidase und anschließender Messung der bei Anwesenheit von Hydroperoxiden entstehenden Chemilumineszenz. Nach Yamamoto et al. ist die Verwendung von Isoluminol aufgrund des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses dem Einsatz von Luminol vorzuziehen.^{93,94} Allgemein erlaubt die Chemilumineszenzmessung die Bestimmung sehr geringer Hydroperoxidkonzentrationen. So gaben Miyazawa et al. bei der Verwendung von Cytochrom c eine absolute Nachweisgrenze von etwa 7 nmol (entsprechend 0,7 $\mu\text{mol/l}$) für verschiedene Phospholipidhydroperoxide an.⁹⁵ Neben der hohen Empfindlichkeit hat die Chemilumineszenzbestimmung von Lipidhydroperoxiden in der HPLC den weiteren Vorteil, daß sie nicht nur in Zusammenhang mit Normalphasen, sondern auch in der RP-HPLC eingesetzt werden kann.⁹⁶

Die Bildung rot gefärbter Eisen-Thiocyanat-Komplexe (vgl. Kapitel 3.3.1) wurde im Zusammenhang mit der Trennung von Phospholipiden an Normalphasen ebenfalls als Detektionsmöglichkeit eingesetzt.⁹⁷ Die Trennung erfolgte dabei durch Gradientenelution mit Chloroform-Methanol. Die mit diesem Reaktionssystem erreichte Nachweisgrenze lag bei etwa 0,2 nmol (entsprechend ca. 0,01 $\mu\text{mol/l}$).

Akasaka et al. beschrieben 1987 eine fluorimetrische Bestimmungsmethode für Lipidhydroperoxide,⁹⁸ die später für die Nachsäulenderivatisierung in der NP-HPLC weiterentwickelt wurde.⁹⁹ Die Detektion beruht auf der Oxidation von Diphenyl-1-pyrenylphosphin durch Hydroperoxide zu dem entsprechenden Phosphinoxid (Abbildung 17). Dieses zeigte in vorangegangenen Versuchen im Vergleich zu anderen aromatischen Phosphinoxiden eine sehr starke Fluoreszenz.¹⁰⁰

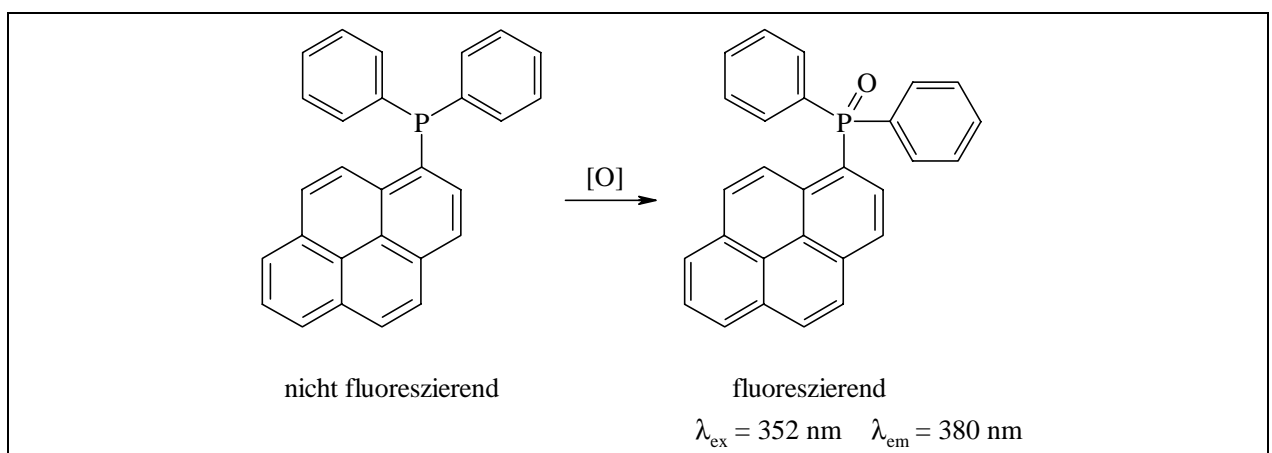


Abbildung 17 Oxidation von Diphenyl-1-pyrenylphosphin zum fluoreszierenden Phosphinoxid

Die Methode hat jedoch den Nachteil, daß das Diphenyl-1-pyrenylphosphin zunächst durch Umsetzung von Triphenylphosphin mit Lithium und 1-Brompyren synthetisiert werden muß.¹⁰⁰ Dieses Reaktionssystem wurde erfolgreich zur empfindlichen HPLC-Detektion von Triglyceridhydroperoxiden, Phospholipidhydroperoxiden und Cholesterylhydroperoxiden eingesetzt.^{101,102} Die erreichten Nachweisgrenzen lagen jeweils bei etwa 0,1 µmol/l.

3.3.2.2 Untersuchung von Lipidhydroperoxiden mittels RP-HPLC

Im Gegensatz zur Normalphasen-HPLC ist die Trennung isomerer Lipidhydroperoxide an Umkehrphasen nicht möglich. Es läßt sich hier jedoch gut eine Trennung der Lipidklassen (freie Säuren, Methylester, Mono-, Di-, Triglyceride etc.) durchführen. Als stationäre Phase kommen für diese Trennungen 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. Aus diesem Grunde steht hier eine große Anzahl verschiedener Reaktionen für die Nachsäulenderivatisierung zur Verfügung. Diese Detektionssysteme beruhen zum größten Teil auf den zuvor beschriebenen photometrischen Verfahren, die an die Bedingungen der HPLC angepaßt wurden. So wurde der von Gupta vorgestellte FOX2-Test 1990 von Wagner et al. zum selektiven Nachweis von Thymidinhydroperoxiden in der HPLC genutzt.¹⁰³ Heinmöller entwickelte daraus ein Verfahren zur HPLC-Bestimmung von linearen Alkylhydroperoxiden und Lipidhydroperoxiden und erreichte damit Nachweisgrenzen von ca. 2-5 µmol/l.¹¹

Auf Grundlage der Wurster-Salze wurde von Boddenberg ein Reaktionsdetektor für Hydroperoxide in der RP-HPLC entwickelt.¹⁰⁴ Der Nachweis beruht dabei auf der Bildung eines roten Radikalkations aus N,N-Dimethylphenylendiamin nach dem in Abbildung 14 beschriebenen Mechanismus. Die Nachweisgrenze beträgt dabei etwa 0,05 µmol/l für Wasserstoffperoxid und ca. 1-5 µmol/l für längerkettige n-Alkylhydroperoxide. Für Lipidhydroperoxide ist die Methode ebenfalls anwendbar (vgl. Kapitel 4.6).

Auch elektrochemische Detektionssysteme wurden erfolgreich in der RP-HPLC eingesetzt. Funk et al. entwickelten 1980 ein amperometrisches Detektionsverfahren und bestimmten damit tert.-Butylhydroperoxid, Cumolhydroperoxid und Hydroperoxyfettsäuren mit einer Nachweisgrenze von ca. 0,7 µmol/l.^{105,106}

Neben diesen Detektionsmöglichkeiten werden in der RP-HPLC bevorzugt Fluoreszenzsysteme zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt. Lazrus et al. entwickelten 1985 ein Fließinjektionssystem zur Analyse von Wasserstoffperoxid.¹⁰⁷ Die Detektion beruht auf der durch Meerrettichperoxidase katalysierten Dimerisierung von 4-Hydroxyphenylessigsäure in Gegenwart von Hydroperoxiden. Das entstandene Dimer (2,2'-Dihydroxy-5,5'-dicarboxymethyl-biphenyl) zeigt im Vergleich zum Monomer eine ausgeprägte Fluoreszenz.

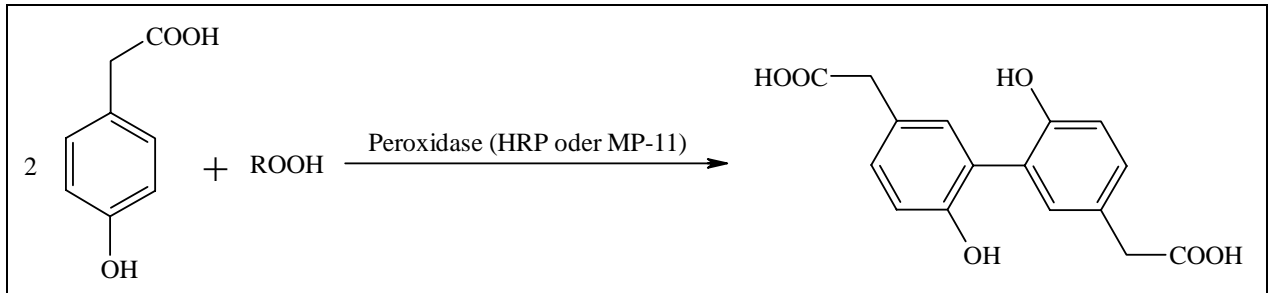


Abbildung 18 Oxidation von PES zum fluoreszierenden PES-Dimer unter katalytischer Aktivität von Peroxidase

Hellpointner und Gäb erweiterten das Verfahren, setzten es in der HPLC-Analytik von Alkylhydroperoxiden ein und erreichten damit eine Nachweisgrenze von ca. 0,07 $\mu\text{mol/l}$.¹⁰⁸ Es zeigte sich jedoch, daß bei Einsatz von Meerrettichperoxidase die Detektion sekundärer Hydroperoxide, also auch der Lipidhydroperoxide, nicht möglich ist.^{11,109} Ursache ist die bei der Meerrettichperoxidase auftretende Steuerung der Selektivität durch einen sogenannten "ligand access channel". Aufgrund sterischer Hinderungen gelangen verzweigte und länger-kettige Hydroperoxide nicht mehr zum aktiven Zentrum. Im Gegensatz dazu stellt Mikroperoxidase keine sterischen Anforderungen an das Substratmolekül. Das aktive Zentrum liegt hier frei. Mikroperoxidase MP-11 ist ein Häminundecapeptid, das mit Hilfe proteolytischer Enzyme aus Cytochrom c gewonnen wird (vgl. Abbildung 39, Seite 84). Daneben gibt es noch weitere Arten von Mikroperoxidasen, z.B. MP-8 oder MP-9, wobei die Ziffern die Anzahl der Aminosäuren im Molekül anzeigen. In der Analytik von Hydroperoxiden werden diese Mikroperoxidasen jedoch kaum eingesetzt.

Die freie Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Substratmoleküle nutzte Kurth zum Nachweis lipophiler Alkylhydroperoxide mittels der HPLC aus.¹⁰⁹ Heinmöller entwickelte das Verfahren weiter, vereinfachte es und nutzte es erstmals zur Nachsäulenderivatisierung von Fettsäurehydroperoxiden in der RP-HPLC.¹¹ Die Nachweisgrenze lag bei 2 $\mu\text{mol/l}$ für Hydroperoxide der Linol- und Linolensäure und deren Methylester.

3.3.3 GC-(MS)-Methoden

Die Bestimmung von Lipidhydroperoxiden mittels GC bzw. GC-MS wird in der Literatur ausführlich beschrieben. Im Vergleich zur Flüssigkeitschromatographie werden hier wesentlich höhere Trennleistungen erreicht, weshalb die GC-Analyse oft zur Analytik isomerer Lipidhydroperoxide aus der Autoxidation von Fettsäuremethylestern¹¹⁰⁻¹¹² bzw. zur Untersuchung der Enzymspezifität von Lipoxidasen eingesetzt wurde.^{113,114} Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Bestimmung oxidiertes Fette in Öl- bzw. Lebensmittelproben.^{115,116} In den letzten Jahren wurden auch zunehmend biologische Proben, wie z.B. Plasmaproben, mittels GC untersucht.^{117,118}

Nachteilig bei der gaschromatographischen Untersuchung von Lipidhydroperoxiden ist die relativ geringe thermische Stabilität und der hohe Siedepunkt der Verbindungen. So besitzen Öl-, Linol- und Linolensäure Siedepunkte von 190-230 °C bei 14 Torr.¹¹⁹ Die Siedepunkte der polareren Hydroperoxide dürften sogar noch etwas darüber liegen, sofern sie bei diesen hohen Temperaturen stabil sind. Aus diesem Grunde müssen vor einer GC-Analyse die Hydroperoxide in thermisch stabile, leichter flüchtige Verbindungen überführt werden. Dazu werden häufig die Fettsäuren mittels Diazomethan zu den entsprechenden Methylestern umgesetzt. Bei der Analyse von Fettsäureestern höheren Molekulargewichtes, wie Triglyceriden oder Cholesterylestern, greift man auf die Umesterung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) oder Natriummethylat zurück. Diese Methoden haben den Vorteil, daß sie einfach durchzuführen sind und genügend schnell ablaufen. Auch eine Überführung in die entsprechenden Pentafluorbenzylester anstelle der Methylester wurde zur Untersuchung von Lipidhydroperoxiden in Gewebeproben eingesetzt.¹²⁰⁻¹²²

In einem weiteren Schritt wird in der Regel die Hydroperoxygruppe mit Reduktionsmitteln, wie z.B. Natriumborhydrid, Triphenylphosphin oder Iodid, zur Hydroxygruppe reduziert, um thermisch stabilere Produkte zu erhalten. Auch die Hydrierung der Hydroperoxyfettsäuren mit Wasserstoff am PtO₂- bzw. Pt-Asbest-Katalysator zu den gesättigten Hydroxyfettsäuren wurde beschrieben. Ein weiterer Derivatisierungsschritt ist die Überführung der Hydroxy- oder Hydroperoxygruppe (falls vorher keine Reduktion bzw. Hydrierung durchgeführt wurde) mit Hilfe verschiedener Silylierungsreagenzien in Trimethylsilylether. Als Silylierungsmittel werden u.a. Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) und ein Gemisch aus Trimethylsilylchlorid und Hexamethyldisilazan eingesetzt. Die Methylierung der Hydroxygruppe mittels Methyljodid ist ebenfalls möglich.¹²²

Aufgrund der vielen Kombinationsmöglichkeiten der hier beschriebenen Derivatisierungsschritte ist eine umfassende Darstellung der in der Literatur beschriebenen Methoden in diesem Rahmen nicht möglich.

Trotz der aufwendigen Probenvorbereitung scheint die gaschromatographische Analyse isomerer Lipidhydroperoxide der Analytik mittels der Normalphasen-HPLC überlegen zu sein, insbesondere auch deshalb, weil hier mit einer massenspektrometrischen Kopplung ein sehr leistungsfähiges Detektionsverfahren zur Verfügung steht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese von Referenzsubstanzen

Die Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen ist bei der chromatographischen Untersuchung von Probenmaterialien unbedingt erforderlich, um eine eindeutige Identifizierung der Probenbestandteile zu gewährleisten.

4.1.1 Gewinnung von 9-Lipoxygenase aus Kartoffeln; Synthese von 9-Hydroperoxyoctadecadiensäure

Isomerenreine Lipidhydroperoxide lassen sich, wie bereits erläutert, nur über eine enzymatische Oxidation der Fettsäuren herstellen. So gelangt man mit Hilfe der leicht verfügbaren Sojabohnen-Lipoxygenase schnell und einfach zu den 13*S*-Hydroperoxyderivaten der Linol- und Linolensäure. Die zur Synthese anderer isomerer Hydroperoxide notwendigen Lipoxygenasen sind jedoch nicht ohne weiteres käuflich zu erwerben. Es wurde deshalb die Praktikabilität einer Enzymisolierung zur Synthese größerer Mengen von 9*S*-Hydroperoxydecadiensäure bzw. -triensäure untersucht. In Anlehnung an ein von Reddanna et al. beschriebenes Verfahren²⁷ wurde versucht, das erforderliche Enzym aus Kartoffeln zu isolieren. Die Versuche dazu fanden am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie der GSF in München statt.

4.1.1.1 Enzymisolierung

Gewaschene Kartoffeln (Hansa; 500 g) wurden bei 4 °C mit 1000 ml Pufferlösung (Phosphatpuffer 100 mmol/l pH 6,3; Natriummetabisulfit 2 mmol/l; Ascorbinsäure 2 mmol/l; EDTA 1 mmol/l) versetzt und homogenisiert. Nach Filtration des Homogenisates durch zwei Lagen Leinentuch wurde 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Das sedimentierte Pellet wurde verworfen und die überstehende Flüssigkeit zur Peptidfällung (Enzymfällung) benutzt. Dazu wurde die Flüssigkeit bis zu einer 15 %-igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und der pH-Wert der Lösung mit verdünnter Ammoniaklösung auf 6,3 eingestellt. Ausgefallenes Protein, welches das gewünschte Enzym enthalten sollte, wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 15000 g abgetrennt. Der Überstand wurde erneut mit Ammo-

niumsulfat bis zu einer Sättigung von 45 % versetzt und anschließend eine Stunde gerührt. Das ausgefallene Protein wurde durch weiteres 15-minütiges Zentrifugieren bei 15000 g abgetrennt, das entstandene Protein-Pellet in 60 ml Phosphatpuffer (40 mmol/l; pH 6,3) suspendiert und die Suspension 24 Stunden gegen 4000 ml Phosphatpuffer (40 mmol/l; pH 6,3) mit zweimaligem Pufferwechsel dialysiert. Die so gewonnene Enzymlösung wurde bei -20 °C gelagert. Eine weitere chromatographische Aufreinigung, wie sie Reddanna et al. vorschlugen,²⁷ erfolgte nicht.

4.1.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes und der Enzymaktivität

Der Proteingehalt wurde nach einer von Bradford¹²³ und Stoschek¹²⁴ beschriebenen Methode an einem ELISA-Reader bestimmt.

Für die Reagenzlösung wurden 70 mg Serva Blau G im Ultraschallbad in 50 ml Ethanol gelöst und mit 100 ml 85 % Phosphorsäure versetzt. Anschließend wurden unter Rühren 850 ml bidest. Wasser hinzugefügt. Die Lösung wurde in einer Braunglasflasche im Kühlschrank aufbewahrt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin. Durch Verdünnen mit Phosphatpuffer (40 mmol/l; pH 6,3) wurden drei Protein-Standard-Lösungen mit einem Gehalt von 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,15 mg/ml hergestellt. Die Probenlösung wurde im Verhältnis 1:100 und 1:200 verdünnt. Jeweils 10 µl Standard- bzw. Probenlösung wurden auf einer Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) mit je 200 µl der Reagenzlösung versetzt. Die Platte wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend in einem ELISA-Reader bei 590 nm vermessen. Sowohl von den Standard- als auch von den Probenlösungen erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung (für die 1:100-Verdünnung wurden 9 Werte gemessen). Die sich ergebenden Meßwerte und die entsprechende Kalibrierkurve sind nachstehend aufgeführt. Dabei kam es bei der Messung der Proben vermutlich aufgrund von Matrixeffekten zu einer größeren Streuung der Meßwerte.

Bezeichnung	Meßwerte in AU	Konzentration in mg/ml
Standard 1	0,058 ± 0,009	0,05
Standard 2	0,131 ± 0,002	0,1
Standard 3	0,186 ± 0,003	0,15
Probe 1:100	0,174 ± 0,030	0,18 ± 0,03
Probe 1:200	0,094 ± 0,024	0,10 ± 0,03

Tabelle 4 Bestimmung des Proteingehaltes von Lipoxidase aus Kartoffeln

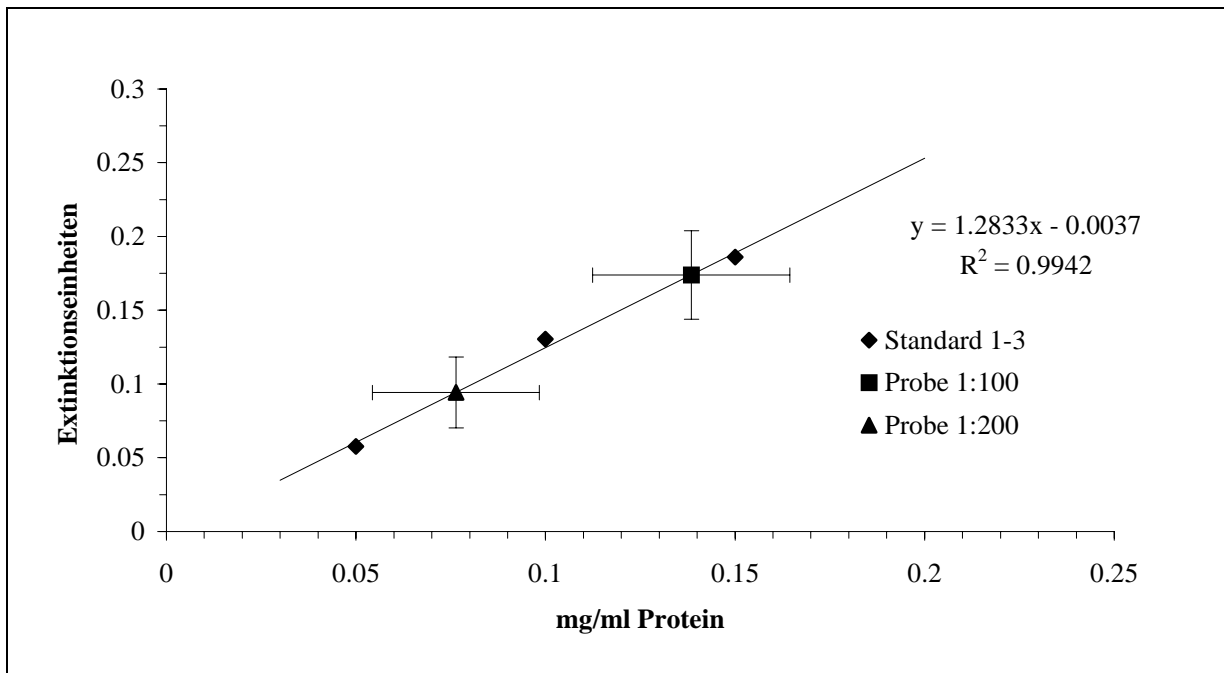


Abbildung 19 Kalibrierkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford

Nach Einrechnung der Verdünnungsfaktoren ergab sich somit ein mittlerer Proteingehalt von $(14,56 \pm 0,35)$ mg Protein/ml.

Der recht hohe Proteingehalt ließ jedoch noch keine Rückschlüsse auf die Peroxidaseaktivität zu. Es wurde deshalb zunächst versucht, die Enzymaktivität nach der von Theorell et al. beschriebenen "low-Ethanol-Methode" zu bestimmen.^{125,126} Dazu wurden in einer Küvette 1 ml Boratpuffer (0,2 mol/l; pH 9) mit 2 ml Substratlösung (bestehend aus 50 µl Linolsäure, gelöst in 50 µl Ethanol, mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt und anschließend mit 300 ml Boratpuffer verdünnt) und 50 µl Enzymlösung versetzt. Der zeitliche Verlauf der Absorption

bei 234 nm wurde in einem Spektralphotometer gemessen. Eine Aktivität war mit dieser Methode jedoch nicht feststellbar.

In einem zweiten Versuch wurde eine von Shimizu et al. beschriebene Methode zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.¹²⁷ Dazu wurden in einer Küvette 2 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 6,3) mit 50 µl der Enzymlösung und 10 µl einer Lösung von 10 mmol/l Linolsäure in Ethanol vermischt. Nach kurzem Rühren wurde der zeitliche Verlauf der Absorption bei 234 nm gemessen (Abbildung 20). Als Leerprobe diente eine Mischung aus 50 µl Enzymlösung und 2,95 ml Puffer.

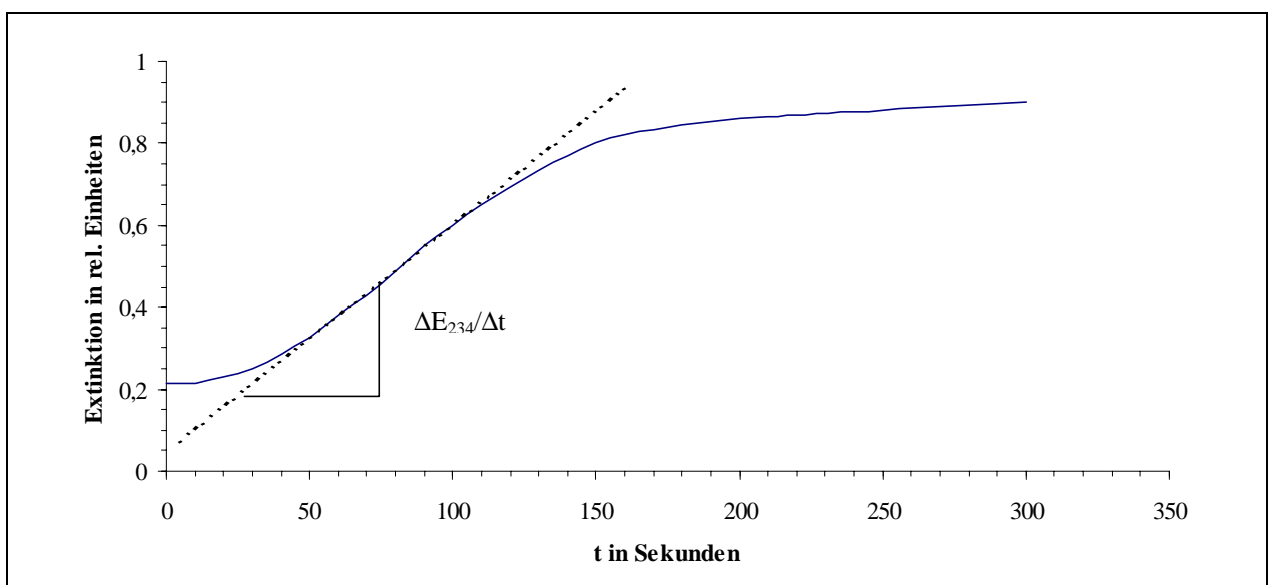


Abbildung 20 Bestimmung der Aktivität von Lipoxidase über den Anstieg der Extinktion bei 234 nm bei der Reaktion mit Linolsäure

Aus dem Anstieg der Extinktion bei 234 nm pro Zeiteinheit wurde die Enzymaktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E_{234}}{\Delta t} \cdot \frac{1}{0,001 \cdot V_{\text{Enzymlösung}}}$$

Gleichung 1

(Aktivität in Units/ml Enzymlösung; Δt in min; $V_{\text{Enzymlösung}}$ in ml; 1 Unit führt mit Linolsäure als Substrat in 3 ml Reaktionsvolumen zu einer Erhöhung der Extinktion um 0,001 Einheiten pro Minute bei 25 °C.)

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Probe-Nr.	ΔE_{234} in rel. Einheiten	Δt in min	$\Delta E_{234}/\Delta t$	Vol. Enzym-lösung in ml	Aktivität der Enzymlösung in Units/ml
1	0,68	1,57	0,43	0,02	21702
2	0,51	1,52	0,34	0,02	16813
3	0,67	1,27	0,53	0,02	26250
4	0,74	2,33	0,32	0,02	15857
5	0,78	1,43	0,54	0,02	27209
6	0,88	1,73	0,51	0,02	25384
7	0,76	1,30	0,58	0,02	29230
Mittelwert					23207 \pm 5220

Tabelle 5 Bestimmung der Aktivität von Lipoxidase aus Kartoffeln

Damit ergab sich mit dem zuvor bestimmten Proteingehalt pro ml Lösung eine Aktivität von $(23207 \pm 5220)/(14,56 \pm 0,35) = 1594 \pm 361$ Units/mg Protein.

4.1.1.3 Synthese von 9S-Hydroperoxyoctadeca-10(E),12(Z)-diensäure mit dem isolierten Enzymextrakt

100 mg (0,36 mmol) Linolsäure wurden in 5 ml einer wäßrigen 0,01 %-igen Tween 20-Lösung durch Zugabe von 2 ml 1 N NaOH gelöst. Nach Verdünnen mit Boratpuffer (20 mmol/l; pH 9,5) auf 250 ml wurde mit verdünnter Salzsäure auf pH 9,5 angesäuert. Die Lösung wurde daraufhin gekühlt und während dieser Zeit durch Einleiten von Sauerstoff mit Sauerstoff gesättigt. Nach Zugabe von 10 ml des isolierten Enzymextraktes zu der Substratlösung wurde bei 0 °C weiterhin Sauerstoff durch den Reaktionsansatz geleitet. Der Versuchsverlauf wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie kontrolliert [Hexan/Ethylacetat 80/20; $R_f(\text{Produkt}) = 0,17-0,2$].

Der Versuch wurde nach acht Stunden durch Ansäuern der Reaktionslösung mit 2 N HCl auf pH 3 abgebrochen, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine vollständige Umsetzung erfolgt war, wie die spätere NMR-Untersuchung ergab. Die angesäuerte Lösung wurde dreimal mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die etherischen Phasen wurden vereinigt, zweimal mit je 75 ml Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

Es wurden etwa 90 mg eines Gemisches von Linolsäure und 9S-Hydroperoxy-10(E),12(Z)-octadecadiensäure erhalten. Der Peroxidgehalt betrug ca. 60 % (NMR-Auswertung).

4.1.2 **Synthese von 13S-Hydroperoxy-octadeca-9(Z),11(E)-diensäure und 13S-Hydroperoxy-octadeca-9(Z),11(E),15(Z)-triensäure sowie der entsprechenden Methylester**

Zur Synthese der isomerenreinen 13S-Hydroperoxide von Linol- und Linolensäure und der entsprechenden Methylester wurde auf häufig verwendete Standardverfahren zurückgegriffen. Die Einführung der Hydroperoxygruppe erfolgte durch enzymkatalysierte Oxidation der Fettsäuren mittels Lipoxidase aus Sojabohnen.^{30,35,128} Als Produkte wurden dabei die entsprechenden 13S-Hydroperoxyfettsäuren in jeweils mehr als 98 % Ausbeute erhalten. Anschließend wurden die 13S-Hydroperoxyfettsäuren zu den entsprechenden Methylestern nach der von Schlenk und Gellermann beschriebenen Methode mit Diazomethan als Methylierungsmittel umgesetzt.¹²⁹ Die Ausbeuten betragen hier jeweils ca. 93 %.

Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen erfolgte mittels NMR-Spektroskopie (vgl. Kap. 4.1.5.2, S. 44 und Kap. 6.5, S. 134).

4.1.3 **Synthese von Hydroperoxyfettsäuremethylestern durch photosensibilisierte Oxidation**

Da die zur Oxidation von Linol- und Linolensäure eingesetzte Lipoxidase aus Sojabohnen nur Fettsäuren mit einem 1,4-Pentadienylsystem umzusetzen vermag, mußte zur Synthese von Hydroperoxiden des Ölsäuremethylesters ein anderes Verfahren angewandt werden. Die Autoxidation schied aufgrund der langen Induktionsperiode und der damit verbundenen langen Reaktionszeit aus (Tabelle 2, S. 8). Als Oxidationsmittel wurde deshalb Singulett-Sauerstoff gewählt. Damit wurde bei Verwendung von Ölsäuremethylester ein Isomerengemisch verschiedener Hydroperoxide erhalten (vgl. 3.1.2). Analog dazu wurden auch die Methylester von Linol- und Linolensäure mit Singulett-Sauerstoff zu den entsprechenden Hydroperoxiden umgesetzt. Die Synthesen erfolgten in einer Bestrahlungsapparatur mit Außenkühlung und einem wassergekühlten Bestrahlungseinsatz. Als Sensibilisator diente Methylenblau. Nachdem sich gezeigt hatte, daß der Einsatz einer Hg-Hochdrucklampe zur Zersetzung des Sensibilisators und der gebildeten Fettsäurehydroperoxide führte,³⁰ wurde als Lichtquelle eine handelsübliche 12 V-Halogenglühlampe 100 W ($\lambda_{\max} \approx 500$ nm) verwendet.

Zur Synthese wurden 250 mg Fettsäuremethylester in 300 ml Methanol gelöst und die Lösung mit 10 - 20 mg Methylenblau versetzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 0 °C wurde unter Durchleiten eines schwachen Sauerstoffstromes bestrahlt. Der Reaktionsverlauf

wurde mittels Normalphasen-HPLC verfolgt (vgl. Kapitel 4.3). Nach beendeter Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand zur Abtrennung der Produkte vom Reaktionsgemisch auf einer auf 4 °C gekühlten Kieselgelsäule mit Hexan/Ethylacetat 80/20 (v/v) chromatographiert. Die Bestrahlungsdauer und die jeweils erhaltenen Ausbeuten sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

Edukt	Bestrahlungsdauer in h	Hydroperoxid-Ausbeute in %
Ölsäuremethylester	40	42
Linolsäuremethylester	21	70
Linolensäuremethylester	18	31

Tabelle 6 Bestrahlungsdauer und Hydroperoxid-Ausbeuten bei der photosensibilisierten Oxidation von Fettsäuremethylestern

4.1.4 Synthese isomerenreiner Triglyceridhydroperoxide

Zur Synthese definierter Hydroperoxyfettsäureester hat sich die von Baba et al. beschriebene Methode³²⁻³⁴ gut bewährt, da die einzelnen Schritte leicht durchzuführen sind und kaum Nebenprodukte auftreten. Ein weiterer Vorteil der Methode ist der modulare Aufbau (vgl. Abbildung 7). Das bedeutet, daß man ausgehend von einer an der OOH-Gruppe geschützten Hydroperoxyfettsäure durch einfache Veresterung sowohl zu den entsprechenden Mono-, Di- bzw. Triglyceriden als auch zu Phospholipiden und Cholesterylestern gelangen kann. Unabhängig von dem gewünschten Endprodukt sind die Reaktionsbedingungen für alle Schritte annähernd gleich.

Bei Hydroperoxyfettsäuremethylestern wurde deshalb zunächst die Hydroperoxy-Gruppe geschützt. Anschließend wurde der Methylester zu der entsprechenden Fettsäure verseift, die dann mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und einer Alkoholkomponente (Diglycerid) zu dem Fettsäureester umgesetzt wurde. Im letzten Schritt erfolgte dann die Abspaltung der Schutzgruppe. Die Einführung einer Schutzgruppe für die Hydroperoxyfunktion war deshalb notwendig, da es bei der direkten Umsetzung der Hydroperoxide mit den Veresterungsreagenzien vermutlich zu einer inter- oder intramolekularen Veresterung kommt, bei der der aktivierte Ester der Säure mit der Hydroperoxygruppe zu einem Peroxyester (intermolekular) oder zu einem Perlacton (intramolekular) reagiert.³⁰

4.1.4.1 Synthese von 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester

In 20 ml trockenem Dichlormethan wurden 373 mg (1,14 mmol) 13*S*-Hydroperoxy-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester (13*S*-HPOD-Methylester) gelöst und unter Rühren mit 99 mg (1,37 mmol) 2-Methoxypropen sowie 45,2 mg (0,18 mmol) Pyridinium-4-toluolsulfonat (PPTS) versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt (CHCl₃/CH₃OH 97,5/2,5; R_f(Edukt) = 0,65; R_f(Produkt) = 0,77). Nach drei Stunden wurden dem Reaktionsgemisch 100 mg KHCO₃ sowie 2 ml CCl₄ zugesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt an einer gekühlten Kieselgelsäule mit Hexan/Ethylacetat 80/20 als Laufmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Laufmittel im Vakuum abgezogen. Es wurden 380 mg 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester erhalten (85 % Ausbeute).

4.1.4.2 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure

Die Synthese von 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure durch Verseifung des entsprechenden Methylesters kann nach Baba et al.³² entweder mit Lithiumhydroxid in THF/Wasser (Verfahren A) oder enzymkatalysiert mit einer Lipase (Verfahren B) erfolgen. Beide Verfahren wurden zur Synthese herangezogen.

Verfahren A:

In 25 ml THF wurden 310,5 mg (0,78 mmol) 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester gelöst und mit 16 ml Wasser bis zum Auftreten einer Trübung versetzt. Zu dieser Lösung wurden 15 mg (0,35 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat gegeben und der Reaktionsverlauf mittels DC verfolgt [Hexan/Ethylacetat 80/20; R_f(Edukt) = 0,72; R_f(Produkt) = 0,25]. Die Reaktionsdauer betrug ca. 27 Stunden, wobei die Reaktionsmischung über Nacht bei 10 °C stand.

Zur Aufarbeitung wurde die Mischung mit 0,01 molarer Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, mit 50 ml Wasser verdünnt und anschließend dreimal mit je 200 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten etherischen Phasen wurden zweimal mit je 80 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer

wurden 289,9 mg Rohprodukt (97 % Ausbeute) erhalten, in dem mittels Dünnschichtchromatographie noch geringe Mengen des Esters nachweisbar waren.

Verfahren B:

Zur enzymkatalysierten Esterverseifung wurde zu 100 mg 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester eine Lösung von 55 mg Calciumchlorid-Dihydrat in 25 ml Phosphatpuffer (10 mmol/l; pH 7,5) gegeben. Die Lösung wurde mit 1 ml Palatase 20000 L-Enzymlösung (NovoNordisk, Bagsvaerd DK, 20000 Units/g) versetzt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels DC kontrolliert [Hexan/Ethylacetat 80/20; $R_f(\text{Edukt}) = 0,73$; $R_f(\text{Produkt}) = 0,24$]. Nach beendeter Reaktion (ca. vier Stunden) wurde der Reaktionsansatz zweimal mit je 20 ml Diethylether und einmal mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden 90 mg des gewünschten Produktes (ca. 93 % Ausbeute) erhalten.

4.1.4.3 Veresterung von 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure mit 1,3-Dilinolein

125 mg (0,2 mmol) 1,3-Dilinolein wurden in 10 ml Tetrachlormethan gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Nacheinander wurden 25 mg (0,21 mmol) (4-Dimethylamino)-pyridin, 78 mg (0,21 mmol) 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure und 46 mg (0,23 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 5 ml Tetrachlormethan, hinzugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt [Hexan/Ethylacetat 80/20; $R_f(\text{Säure}) = 0,27$; $R_f(\text{Triglycerid}) = 0,72$].

Nach drei Stunden wurde der ausgefallene Harnstoff abfiltriert und das Rohprodukt nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer an einer gekühlten Kieselgelsäule mit Hexan/Ethylacetat 80/20 chromatographiert. Es wurden 150,3 mg (76 % Ausbeute) des gewünschten Produktes erhalten.

4.1.4.4 Schutzgruppenabspaltung von geschütztem Triglycerid-Hydroperoxid

147 mg (0,15 mmol) 2-[13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-dienoyl]-1,3-dilinolein wurden unter Zusatz von 0,3 % BHT in 20 ml einer Mischung von THF/Eisessig/Wasser (4/2/1) gelöst. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile geteilt, wobei ein Teil zwölf Stunden bei 4 °C, der andere Teil in der gleichen Zeit bei Raumtemperatur gerührt wurde. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt (Hexan/Ethylacetat 80/20; $R_f(\text{Edukt}) = 0,65$; $R_f(\text{Produkt}) = 0,54$). Da nach ca. 14 Stunden in dem bei 4 °C gelagerten Ansatz ein deutlich langsamerer Reaktionsverlauf zu beobachten war, und in dem bei Raumtemperatur gehaltenen Teil keine zusätzlichen Veränderungen erkennbar waren, wurden beide Teile vereinigt und weitere 60 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 30 ml Wasser verdünnt und das THF am Rotationsverdampfer entfernt. Die erhaltene wäßrige Phase wurde mit Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert und dreimal mit je 150 ml Diethylether ausgeschüttelt. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit je zweimal 80 ml Wasser wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und es wurden 119 mg (88 % Ausbeute) des gewünschten Produktes erhalten.

4.1.5 Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen

4.1.5.1 Massenspektroskopie

Die mittels Direkteinlaß und Elektronenstoßionisation (EI) gewonnenen Massenspektren der synthetisierten Verbindungen besaßen im allgemeinen nur wenig Aussagekraft. Bei allen Verbindungen trat eine starke Fragmentierung der Fettsäurekette auf, die auf komplizierte Umlagerungsmechanismen schließen ließ. Typische Signale für solche Fragmentierungen lagen bei $m/z = 41, 43, 55, 57, 67, 69, 81, 83$ und 95 . Daneben konnten fast immer Signale beobachtet werden, die aus der Abspaltung von Wasser und der Hydroperoxygruppe resultieren. Aufgrund des geringen Informationsgehaltes wurden nur die Massenspektren einiger weniger Substanzen ausgewertet:

Verbindung	m/z	rel. Intensität in %, bezogen auf das höchste Signal	Zuordnung
Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters (Isomerengemisch)	310	ca. 3	$[M-H_2O]^+$
	295	36,5	$[M-HO_2]^+$
	95	50,7	$[C_7H_{11}]^+$
	83	57,8	$[C_6H_{11}]^+$
	81	60,9	$[C_6H_9]^+$
	69	60,7	$[C_5H_9]^+$
	67	59,3	$[C_5H_7]^+$
	57	66,0	$[C_4H_9]^+$
	55	90,0	$[C_4H_7]^+$
	43	84,1	$[C_3H_7]^+$
	41	100,0	$[C_3H_5]^+$
Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters (Isomerengemisch)	308	4,0	$[M-H_2O]^+$
	293	21,8	$[M-HO_2]^+$
	95	37,1	$[C_7H_{11}]^+$
	83	27,8	$[C_6H_{11}]^+$
	81	52,8	$[C_6H_9]^+$
	69	44,0	$[C_5H_9]^+$
	67	69,1	$[C_5H_7]^+$
	57	41,3	$[C_4H_9]^+$
	55	96,4	$[C_4H_7]^+$
	43	65,8	$[C_3H_7]^+$ oder $[CH_3CO]^+$
	41	100,0	$[C_3H_5]^+$
Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters (Isomerengemisch)	306	4,4	$[M-H_2O]^+$
	291	14,8	$[M-HO_2]^+$
	95	30,3	$[C_7H_{11}]^+$
	83	21,9	$[C_6H_{11}]^+$
	81	50,5	$[C_6H_9]^+$
	69	43,6	$[C_5H_9]^+$
	67	61,9	$[C_5H_7]^+$
	57	61,6	$[C_4H_9]^+$
	55	78,1	$[C_4H_7]^+$
	43	44,3	$[C_3H_7]^+$ oder $[CH_3CO]^+$
	41	100,0	$[C_3H_5]^+$

Tabelle 7

Auswertung der EI-Massenspektren von Hydroperoxiden einiger Fettsäuremethylester aus der Oxidation mit Singulett-Sauerstoff

Verbindung	m/z	rel. Intensität in %, bezogen auf das höchste Signal	Zuordnung
13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca - 9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure	279	3,2	[M-HO ₂] ⁺
	95	11,3	[C ₇ H ₁₁] ⁺
	83	13,4	[C ₆ H ₁₁] ⁺
	81	18,9	[C ₆ H ₉] ⁺
	67	34,1	[C ₅ H ₇] ⁺
	55	52,2	[C ₄ H ₇] ⁺
	43	83,0	[C ₃ H ₇] ⁺ oder [CH ₃ CO] ⁺
	41	100,0	[C ₃ H ₅] ⁺
13 <i>S</i> -Hydroperoxyoctadeca - 9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäuremethylester	293	10,9	[M-HO ₂] ⁺
	95	35,4	[C ₇ H ₁₁] ⁺
	83	17,9	[C ₆ H ₁₁] ⁺
	81	59,2	[C ₆ H ₉] ⁺
	67	77,5	[C ₅ H ₇] ⁺
	55	73,9	[C ₄ H ₇] ⁺
	43	87,9	[C ₃ H ₇] ⁺ oder [CH ₃ CO] ⁺
	41	100,0	[C ₃ H ₅] ⁺
13 <i>S</i> -(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca -9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäuremethylester	293	13,7	[M- (OOC(CH ₃) ₂ OCH ₃) ⁺
	81	24,3	[C ₆ H ₉] ⁺
	73	100,0	[(CH ₃) ₂ C-OCH ₃] ⁺ aus der Schutzgruppe
	67	32,1	[C ₅ H ₇] ⁺
	55	31,2	[C ₄ H ₇] ⁺
	43	62,9	[C ₃ H ₇] ⁺ oder [CH ₃ CO] ⁺
	41	38,2	[C ₃ H ₅] ⁺
	13 <i>S</i> -(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca -9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure	279	4,6
81		18,3	[C ₆ H ₉] ⁺
73		100,0	[(CH ₃) ₂ C-OCH ₃] ⁺ aus der Schutzgruppe
67		26,57	[C ₅ H ₇] ⁺
55		27,5	[C ₄ H ₇] ⁺
43		80,3	[C ₃ H ₇] ⁺ oder [CH ₃ CO] ⁺
41		38,7	[C ₃ H ₅] ⁺

Tabelle 8 Auswertung der EI-Massenspektren der 13*S*-Hydroperoxyoctadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure und abgeleiteter Derivate

4.1.5.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie erwies sich in dieser Arbeit als eine zur Produktidentifizierung und zur Reaktionskontrolle besonders geeignete Methode, da strukturelle Änderungen während der einzelnen Syntheseschritte mit einer deutlichen Änderung der NMR-Spektren einhergingen. Die zur Strukturanalyse benötigten Informationen ließen sich aus den tieffeldverschobenen Resonzen bei $\delta > 2,5$ ppm im ^1H -NMR und $\delta > 45$ ppm im ^{13}C -NMR entnehmen. Diese Resonanzen konnten fast alle eindeutig den entsprechenden Strukturelementen (H- und C-Atome an den Doppelbindungen, den Schutzgruppen und den Positionen der Hydroperoxygruppen) zugeordnet werden. In den Bereichen $\delta < 2,5$ ppm bzw. $\delta < 45$ ppm, in denen jeweils die Resonanzen der Methyl- und Methylengruppen der Fettsäurekette liegen, gelang eine eindeutige Zuordnung jedoch nicht. Die NMR-Spektren zeigten in diesem Bereich eine Vielzahl sehr eng beieinanderliegender Signale, die sich besonders im Falle der ^1H -NMR-Spektren zu breiten Multipletts überlagerten. Lediglich die Methylgruppen konnten hier aufgrund ihrer scharfen Resonanzen noch relativ leicht identifiziert werden.

Bei den NMR-Spektren der durch Oxidation mit Singulett-Sauerstoff gewonnenen Hydroperoxyfettsäuremethylester war die genaue Zuordnung schwierig. Aufgrund des bei der Oxidation entstandenen Isomerengemisches kam es gerade in den ^1H -NMR-Spektren zu einer Überlagerung der Resonanzen, so daß die eindeutige Zuordnung der Signale zu einem bestimmten Isomer nicht möglich war, zumal nicht alle Signale aufgelöst werden konnten. Dennoch konnte aus der Zahl der Signale bei etwa $\delta = 88$ ppm ($\underline{\text{C}}\text{-OOR}$) und $\delta = 130$ ppm ($\text{-}\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}\text{-}$) in den ^{13}C -NMR-Spektren auf die Anzahl der vorhandenen isomeren Hydroperoxide geschlossen werden, was auch durch HPLC-Untersuchungen bestätigt wurde.

Da in früheren Arbeiten eine genauere Analyse der Spektren erfolgte, seien im folgenden die Ergebnisse nur tabellarisch aufgeführt.^{11,30}

Strukturelement	$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\} \delta$ [ppm]	Strukturelement	$^1\text{H} \delta$ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	14,19	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0,89 - 0,93
$13 \times \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$	22,78 - 34,21 (22 Signale)	$13 \times \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$	1,30 - 2,40
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	128,69 129,04 136,68 137,12	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	5,30 - 5,82
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	87,10	CH-OOH	7,81 7,87
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$	174,43	-COOCH_3	3,69 3,70
$\text{-COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$	51,57		

Tabelle 9 Auswertung der NMR-Spektren von Hydroperoxiden des Ölsäuremethyl-esters aus der Oxidation mit Singulett-Sauerstoff (vgl. 6.5.2)

Strukturelement	$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\} \delta$ [ppm]	Strukturelement	$^1\text{H} \delta$ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	14,10 14,13 14,21 14,32	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0,87 - 1,01
$11 \times \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$	22,63 - 34,82 (19 Signale)	$11 \times \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$	1,24 - 2,35
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	124,09 124,23 127,59 127,75 128,00 128,26 130,04 130,14 131,31 131,49 132,49 132,66 133,93 134,21 136,84 137,12	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	5,33 - 6,64
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	86,56 86,83 86,88	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	4,33 - 4,42
		-CH-OOH	7,91 7,94 7,98
$\text{-COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$	51,56	-COOCH_3	3,66
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$	174,43 174,51		

Tabelle 10 Auswertung der NMR-Spektren von Hydroperoxiden des Linolsäuremethyl-esters aus der Oxidation mit Singulett-Sauerstoff (vgl. 6.5.3)

Strukturelement	$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\} \delta$ [ppm]	Strukturelement	$^1\text{H} \delta$ [ppm]
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-}$	14,20 14,27 14,32	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	0,95 - 1,06
$9 \times \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$	25,05 - 34,23 (19 Signale)	$9 \times \text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$	1,22 - 2,35
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	123,32 123,97 124,49 126,47 127,04 127,10 127,60 127,71 129,71 129,78 130,07 130,18 130,60 130,72 131,01 131,70 131,75 131,88 131,95 132,70 134,12 134,44 135,78 136,92	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H-}$	5,33 - 6,64
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	86,98 86,76 86,29	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-OOH}$	4,35 - 4,47
		-CH-OOH	7,30 7,93 7,96 8,00
$\text{-COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$	51,58	-COOCH_3	3,70
$\text{-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$	174,45 174,53		

Tabelle 11 Auswertung der NMR-Spektren von Hydroperoxiden des Linolensäure-methylesters aus der Oxidation mit Singulett-Sauerstoff (vgl. 6.5.4)

Im Gegensatz zur Oxidation mit Singulett-Sauerstoff wurden bei der enzymkatalysierten Oxidation isomerenreine Verbindungen erhalten, bei denen eine genauere Analyse der NMR-Spektren möglich war. Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Abbildung 21 dargestellt.

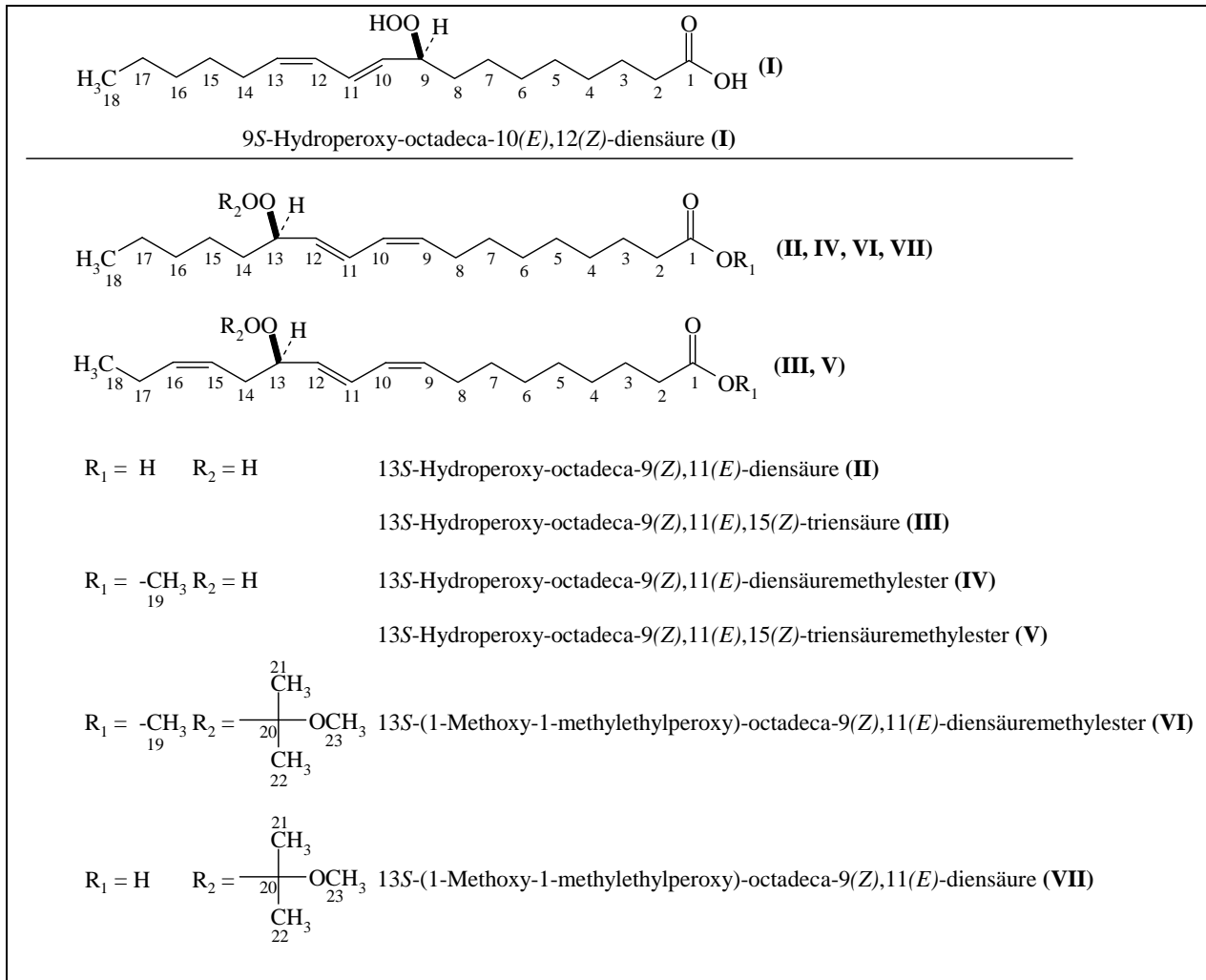


Abbildung 21 Strukturen synthetisierter Linol- und Linolensäurederivate (Legende zu Tabelle 12 und Tabelle 13)

Die entsprechenden 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Signale dieser Verbindungen sind in nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Substanz	I	II	III	IV	V	VI	VII
Protonen an C-X (Anzahl)							
C-2 (2 H)	2,33 ppm (t) $J_{2-3}=7,3$ Hz	2,37 ppm (t) $J_{2-3}=7,5$ Hz	2,34 ppm (t) $J_{2-3}=7,5$ Hz	2,29 ppm (t) $J_{2-3}=7,5$ Hz	2,29 ppm (t) $J_{2-3}=7,5$ Hz	2,33 ppm (t) $J_{2-3}=7,5$ Hz	2,37 ppm (t) $J_{2-3}=7,5$ Hz
C-3 (2 H)	—	—	1,5 - 1,65 ppm (m)	—	1,5 - 1,7 ppm (m)	—	—
C-3, 8 (4 H)	1,5 - 1,75 ppm (m)	—	—	—	—	—	—
C-3,14 (4 H)	—	1,5 - 1,75 ppm (m)	—	1,5 - 1,75 ppm (m)	—	1,5 - 1,75 ppm (m)	1,5 - 1,7 ppm (m)
C-4, 5,6,7 (8 H)	—	—	1,15-1,45 ppm (m)	—	1,1-1,5 ppm (m)	—	—
C-4, 5, 6, 7, 15,16,17 (14 H)	1,30 ppm (m)	1,23 ppm (m)	—	1,30 ppm (m)	1,29 ppm (m)	1,34 ppm (m)	1,35 ppm (m)
C-8 (2 H)	—	2,15 ppm (dt) $J_{7-8}=J_{8-9}=7,2$ Hz	2,17 ppm (dt) $J_{7-8}=J_{8-9}=7$ Hz	2,18 ppm (dt) $J_{7-8}=J_{8-9}=7$ Hz	2,17 ppm (dt) $J_{7-8}=J_{8-9}=7$ Hz	2,10 ppm (dt) $J_{7-8}=J_{8-9}=6,9$ Hz	2,22 ppm (dt) $J_{7-8}=J_{8-9}=6,9$ Hz
C-9 (1 H)	4,36 ppm (dt) $J_{8-9}=J_{9-10}\approx 7$ Hz	5,50 ppm (dt) $J_{8-9}=7,2$ Hz; $J_{9-10}=11$ Hz	5,41 ppm (dt) $J_{8-9}=7,6$ Hz; $J_{9-10}=10,8$ Hz	5,48 ppm (dt) $J_{8-9}=7,6$ Hz; $J_{9-10}=10,8$ Hz	5,42 ppm (dt) $J_{8-9}=7,6$ Hz; $J_{9-10}=10,7$ Hz	5,47 ppm (dt) $J_{8-9}=6,9$ Hz; $J_{9-10}=10,8$ Hz	5,49 ppm (dt) $J_{8-9}=6,9$ Hz; $J_{9-10}=11,1$ Hz
C-9, 15, 16 (3 H)	—	—	5,3-5,5 ppm (m)	—	5,2-5,55 ppm (m)	—	—
C-10 (1 H)	5,56 ppm (dd) $J_{9-10}=8$ Hz; $J_{10-11}=15$ Hz	6,00 ppm (dd) $J_{9-10}=J_{10-11}=11$ Hz	5,99 ppm (dd) $J_{9-10}=J_{10-11}=11$ Hz	6,00 ppm (dd) $J_{9-10}=J_{10-11}=11$ Hz	5,99 ppm (dd) $J_{9-10}=J_{10-11}=11,1$ Hz	6,02 ppm (dd) $J_{9-10}=J_{10-11}=10,2$ Hz	6,02 ppm (dd) $J_{9-10}=J_{10-11}=11,1$ Hz
C-11 (1 H)	6,55 ppm (dd) $J_{10-11}=15$ Hz; $J_{11-12}=11$ Hz	6,58 ppm (dd) $J_{10-11}=11$ Hz; $J_{11-12}=15,3$ Hz	6,57 ppm (dd) $J_{10-11}=11,1$ Hz; $J_{11-12}=15,2$ Hz	6,53 ppm (dd) $J_{10-11}=11,1$ Hz; $J_{11-12}=14,2$ Hz	6,56 ppm (dd) $J_{10-11}=11,1$ Hz; $J_{11-12}=15,2$ Hz	6,51 ppm (dd) $J_{10-11}=11,1$ Hz; $J_{11-12}=15,2$ Hz	6,51 ppm (dd) $J_{10-11}=11,1$ Hz; $J_{11-12}=15,2$ Hz
C-12 (1 H)	5,99 ppm (dd) $J_{11-12}=J_{12-13}=11$ Hz	5,61 ppm (dd) $J_{11-12}=15,3$ Hz; $J_{12-13}=7,5$ Hz	5,58 ppm (dd) $J_{11-12}=15,2$ Hz; $J_{12-13}=8$ Hz	5,56 ppm (dd) $J_{11-12}=15,2$ Hz; $J_{12-13}=8,2$ Hz	5,57 ppm (dd) $J_{11-12}=15,3$ Hz; $J_{12-13}=7,8$ Hz	5,62 ppm (dd) $J_{11-12}=15,2$ Hz; $J_{12-13}=7,4$ Hz	5,64 ppm (dd) $J_{11-12}=15,3$ Hz; $J_{12-13}=7,4$ Hz
C-13 (1 H)	5,45 ppm (dt) $J_{12-13}=11$ Hz; $J_{13-14}=7,5$ Hz	4,33 ppm (dt) $J_{12-13}=J_{13-14}=7,5$ Hz	4,42 ppm (dt) $J_{12-13}=8$ Hz; $J_{13-14}=6,7$ Hz	4,39 ppm (dt) $J_{12-13}=J_{13-14}=8,2$ Hz	4,41 ppm (dt) $J_{12-13}=7,8$ Hz; $J_{13-14}=6,7$ Hz	4,45 ppm (dt) $J_{12-13}=J_{13-14}=7,4$ Hz	4,46 ppm (dt) $J_{12-13}=J_{13-14}=7,4$ Hz
C-14 (2 H)	2,18 ppm (dt) $J_{13-14}=J_{14-15}=7,3$ Hz	—	2,0-2,2 ppm (m)	—	2,1-2,3 ppm (m)	—	—
C-18 (3 H)	0,88 ppm (t) $J_{17-18}\approx 7$ Hz	0,92 ppm (t) $J_{17-18}=6,9$ Hz	0,95 ppm (t) $J_{17-18}=7,5$ Hz	0,87 ppm (t) $J_{17-18}=6,6$ Hz	0,94 ppm (t) $J_{17-18}=7,5$ Hz	0,82 ppm (t) $J_{17-18}=6,8$ Hz	0,91 ppm (t) $J_{17-18}=6,7$ Hz
C-19 (3 H)	—	—	—	3,66 ppm (s)	3,65 ppm (s)	3,70 ppm (s)	—
C-21, 22 (6 H)	—	—	—	—	—	1,41 ppm (s)	1,41 ppm (s)
C-23 (3 H)	—	—	—	—	—	3,32 ppm (s)	3,33 ppm (s)

Tabelle 12 ¹H-NMR-Daten verschiedener Linol- und Linolensäurederivate (vgl. Abbildung 21 und Kapitel 6.5.1 und 6.5.5 bis 6.5.10)

	I δ [ppm]	II δ [ppm]	III δ [ppm]	IV δ [ppm]	V δ [ppm]	VI δ [ppm]	VII δ [ppm]
C-1	179,47	179,29	179,76	174,34	174,38	174,18	179,64
C-2	33,83	33,91	33,85	33,94	33,93	34,06	33,97
C-3	24,47	24,61	24,47	24,73	24,72	24,91	24,63
C-4, 5, 6	—	—	29,21, 28,82, 28,78	—	29,21, 28,90, 28,86	—	—
C-7	—	—	30,46	—	30,46	—	—
C-8	—	—	27,56	—	27,55	—	—
C-4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16	25,01-33,87 (Signale sind nicht eindeutig zuzuordnen)	32,55 31,72 29,35 28,93 28,91 28,86 27,67 24,92	—	32,40 31,61 29,25 28,91 28,88 28,76 27,57 24,85	—	33,09 31,88 29,52 29,09 29,07 29,00 27,72 25,06	33,08 31,76 29,49 29,05 (2 Sig- nale) 28,96 27,69 25,05
C-9, 10, 11, 12	—	133,71 131,32 129,83 127,64	—	133,72 131,19 129,86 127,44	—	132,86 132,67 128,02 127,87	132,89 132,65 128,03 127,87
C-9	86,61	—	—	—	—	—	—
C-10, 11, 12, 13	134,01 130,98 129,96 127,27	—	—	—	—	—	—
C-14	—	—	28,74	—	28,73	—	—
C-9, 10, 11, 12, 15, 16	—	—	134,23 133,92 130,21 130,02 127,40 122,95	—	134,16 133,88 130,31 129,50 127,40 123,00	—	—
C-13	—	86,70	86,07	86,66	86,03	84,62	84,62
C-17	22,39	22,46	20,56	22,37	20,55	22,49	22,48
C-18	13,89	13,93	13,96	13,88	13,96	13,97	13,96
C-19	—	—	—	51,38	51,39	51,35	—
C-20	—	—	—	—	—	104,54	104,57
C-21, 22	—	—	—	—	—	22,84 23,04	22,82 23,01
C-23	—	—	—	—	—	49,23	49,21

Tabelle 13 ¹³C-NMR-Daten verschiedener Linol- und Linolensäurederivate
(vgl. Abbildung 21 und Kapitel 6.5.1 und 6.5.5 bis 6.5.10)

Bei der Auswertung der NMR-Spektren der Triglyceride bereitete besonders die Zuordnung der ¹H-Resonanzen Schwierigkeiten, da es aufgrund der großen Anzahl ähnlicher Protonen zu breiten Signalen kam, die sich teilweise auch überlagerten. Eine genaue Zuordnung und auch eine Bestimmung von Kopplungskonstanten war deshalb kaum möglich. Lediglich einige charakteristische Resonanzen konnten eindeutig bestimmten Strukturelementen zugeordnet werden (vgl. Abbildung 22 und Tabelle 14, 15 auf den folgenden Seiten).

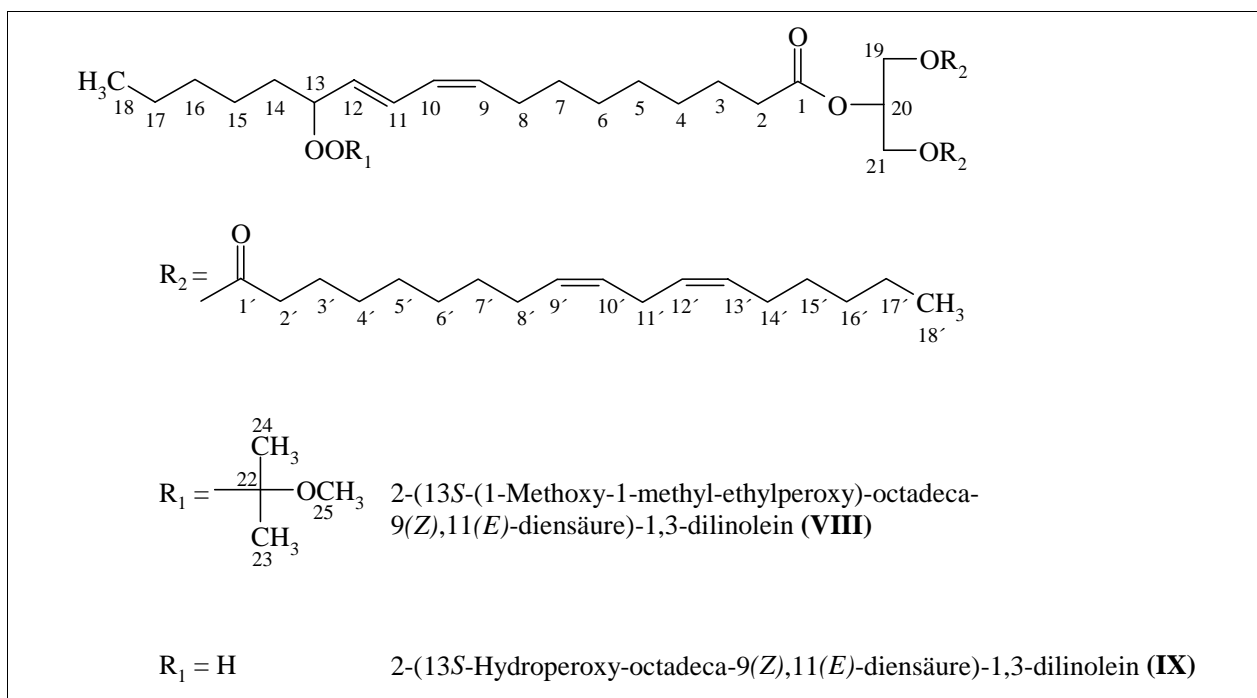


Abbildung 22 Strukturen synthetisierter Trilinolein-Derivate (Legende zu Tabelle 14 und Tabelle 15)

	VIII δ [ppm]				IX δ [ppm]			
C-1, C-1'	173,17	172,74			173,22	172,83		
C-2, C-2'	34,15	34,01			34,22	34,03		
C-3,4,5,6,7,8,14,15,16,23,24	31,78	31,51	29,67	29,59	—			
C-3',4',5',6',7',8',14',15',16	29,33	29,15	29,10	29,07				
	29,02	27,19	25,07	24,83				
C-3,4,5,6,7,8,14,15,16	—				31,74	31,52	30,33	29,60
C-3',4',5',6',7',8',14',15',16					29,41	29,33	29,16	29,10
					29,08	29,02	28,96	28,92
					27,19	25,64	24,96	24,84
C-9,10,11,12	132,92	132,59	128,08	127,83	133,69	131,38	127,64	125,49
C-9', 10', 12', 13'	130,21	129,98	127,90		130,22	130,00	129,85	128,09
	(8 C-Atome)				127,91 (8 C-Atome)			
C-11'	25,63				25,64			
C-17,23,24; C-17'	23,04	22,85	22,54	22,50	—			
C-17, C-17'	—				22,55	22,48		
C-19, 21	68,95				68,98			
C-20	62,08				62,09			
C-18	13,98	14,01			13,96	14,02		
C-18'								
C-22	104,54				—			
C-13	84,60				86,70			
C-25	49,23				—			

Tabelle 14 ^{13}C -NMR-Daten verschiedener Trilinolein-Derivate (vgl. Abbildung 22 und Kapitel 6.5.11 und 6.5.12)

Substanz	VIII	IX
Protonen an C-X (Anzahl)		
C-3,4,5,6,7,14,15,16,17 C-2',3',4',5',6',7',15',16',17' (54 H)	1,2 - 1,8 ppm (m)	1,2 - 1,8 ppm (m)
C-2,8 C-2',8',11',14' (12 H)	2,0 - 2,5 ppm (m)	2,1-2,5 ppm (m)
C-9 (1 H)	—	5,52 ppm (dt) J _{8,9} =6,8 Hz; J _{9,10} =11,1 Hz
C-20 C-9',10',12',13' (9 H)	—	5,3-5,4 ppm (br m)
C9,20 C-9',10',12',13' (11 H)	5,3-5,5 ppm (br m)	—
C-10 (1 H)	6,04 ppm (dd) J _{9,10} =J _{10,11} =11 Hz	6,05 ppm (dd) J _{9,10} =J _{10,11} =11,1 Hz
C-11 (1 H)	6,55 ppm (dd) J _{10,11} =11 Hz; J _{11,12} =15 Hz	6,61 ppm (dd) J _{10,11} =11,1 Hz; J _{11,12} =15,2 Hz
C-12 (1 H)	5,65 ppm (dd) J _{11,12} =15 Hz; J _{12,13} =7 Hz	5,62 ppm (dd) J _{11,12} =15,2 Hz; J _{12,13} =7,1 Hz
C-13 (1 H)	4,41 ppm (dt) J _{12,13} =J _{13,14} =7 Hz	4,42 ppm (dt) J _{12,13} =J _{13,14} =7,4 Hz
C-18, C-18' (9 H)	0,86-0,94 ppm (m)	0,85 - 0,96 ppm (m)
C-19, 21 (4 H)	4,18 ppm (m), 4,33 ppm (m)	4,19, 4,34 ppm (m)
C-23, 24 (6 H)	1,41 ppm (s)	—
C-25 (3 H)	3,33 ppm (s)	—

Tabelle 15 ¹H-NMR-Daten verschiedener Trilinolein-Derivate (vgl. Abbildung 22 und Kapitel 6.5.11 und 6.5.12)

4.1.6 Diskussion der Ergebnisse

Zur Synthese isomerenreiner Hydroperoxyfettsäuren hat sich die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit Lipoxidase aus Sojabohnen gut bewährt. Auf diese Weise lassen sich in relativ kurzer Zeit große Mengen der 13*S*-Hydroperoxyverbindungen von Linol- und Linolensäure synthetisieren. Analog zu Scheller et al.¹²⁸ konnten bei Durchführung der Reaktion bei pH 10 keine anderen Isomere nachgewiesen werden. Die Synthese der entsprechenden 9*S*-Hydroperoxy-octadeca-10(*E*),12(*Z*)-diensäure verlief dagegen nicht zufriedenstellend. Zwar gelang die Enzymisolierung und eine erste Aufreinigung durch Dialyse ohne Probleme, die Enzymaktivität reichte jedoch mit 1594 ± 361 Units/mg Protein (im Vergleich zu 100000 Units/mg bei der ebenfalls verwendeten Sojalipoxidase Typ I-B) bei weitem nicht aus, eine hinreichend große Menge Produkt zu isolieren. Eine weitere chromatographische Aufreinigung der Proteinlösung im Anschluß an die Dialyse wäre somit von Vorteil gewesen. Galliard und Phillips²⁶ sowie und Reddana et al.²⁷ beschreiben nach einer solchen Reinigung eine

Aktivitätssteigerung um das Sechs- bis Zehnfache der Aktivität des Rohextraktes. Gleichzeitig war damit jedoch auch jeweils eine Verringerung der Proteingehaltmenge um bis zu 95 % verbunden, wodurch letztlich die absolute Menge des gewonnenen Enzyms stark abnahm. Aufgrund der langwierigen Isolierungsprozedur und der danach benötigten Aufreinigung stellte sich das Verfahren als nicht effizient heraus, zumal das Enzym nach der Reaktion nicht wiedergewonnen werden konnte. Ein Ausweg wäre hier eine Immobilisierung gewesen, wie sie verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben.¹³⁰⁻¹³²

Die Synthese definierter Hydroperoxyverbindungen von Trilinolein bereitete keine Schwierigkeiten. Die Einführung einer Schutzgruppe erfolgte nach dem von Baba et al. beschriebenen Verfahren.³²⁻³⁴ Abweichend von früheren Versuchen³⁰ wurde die daran anschließende Verseifung von 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethyl-ester zu der entsprechenden Säure mit einem deutlichen Unterschluß an LiOH in einem THF-Wasser-Gemisch durchgeführt. Die Bildung einer Carbonylverbindung als Nebenprodukt konnte so vermieden werden. Als alternative und aufgrund der kürzeren Reaktionszeit auch schonendere Methode wurde die Verseifung zusätzlich auch enzymkatalysiert durchgeführt. Bei der dazu eingesetzten Palatase 20000 L handelt es sich um eine gereinigte 1,3-spezifische Lipase aus *Rhizomucor miehei*. Das Enzym hat ein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 40 °C. Mit Hilfe dieses Enzyms konnte bei annähernd gleicher Substratmenge die Reaktionszeit zur Esterverseifung in etwa halbiert werden. Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung der auf chemischem und enzymatischem Wege hergestellten 13*S*-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure waren keine Unterschiede zwischen den Produkten nachweisbar.

Zur Charakterisierung der synthetisierten Substanzen hat sich die NMR-Spektroskopie, insbesondere die ¹³C-NMR-Spektroskopie, als besonders geeignet herausgestellt. Lediglich bei sehr großen Molekülen war die Zuordnung einzelner Signale schwierig, die Resonanzen der bei den Synthesen betroffenen C-Atome konnten jedoch in allen Fällen gut erkannt werden. Die massenspektrometrische Untersuchung der Verbindungen durch Direkteinlaß und ohne vorherige Derivatisierung erwies sich für eine genauere Charakterisierung hingegen als ungeeignet, da sich die erhaltenen Spektren zu sehr ähnelten und sich auch keine eindeutigen Beziehungen zwischen den Signalen und der Molekülstruktur finden ließen. Nur in wenigen Fällen konnten die [M-H₂O]⁺ bzw. die [M-OOH]⁺-Signale als "quasi-Molekülonen" beobachtet werden. Weitere Aussagen, insbesondere zur Lage der Doppelbindungen und deren relativer Stellung zueinander, konnten nicht getroffen werden.

4.2 Vergleich verschiedener photometrischer Methoden zur Gehaltsbestimmung von Lipidhydroperoxiden

4.2.1 Vorüberlegungen und Vorversuche

Da in der Literatur zur Bestimmung des Gesamtgehaltes von Lipidhydroperoxiden viele photometrische Methoden beschrieben werden (vgl. Kapitel 3.3.1), wurden einige dieser Testmethoden (TBA-Test, Messung der I_3^- -Absorption, FOX2-Test) miteinander verglichen. Zusätzlich wurde auf Grundlage der N,N'-substituierten Phenylendiamine eine weitere photometrische Bestimmungsmethode entwickelt. Diese Verbindungen reagieren, wie in Kapitel 3.3.1 bereits dargestellt, in Anwesenheit von Hydroperoxiden zu farbigen Radikalkationen, den Semichinondiimininen (Wurster'sche Salze). Im weiteren Verlauf können diese jedoch zu entsprechenden Chinondiimininen oxidiert werden (Abbildung 23). Im Gegensatz zu den radikalischen Semichinondiimininen besitzen sowohl die Phenylendiamine als auch die Chinondiimine keine Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich.¹³³

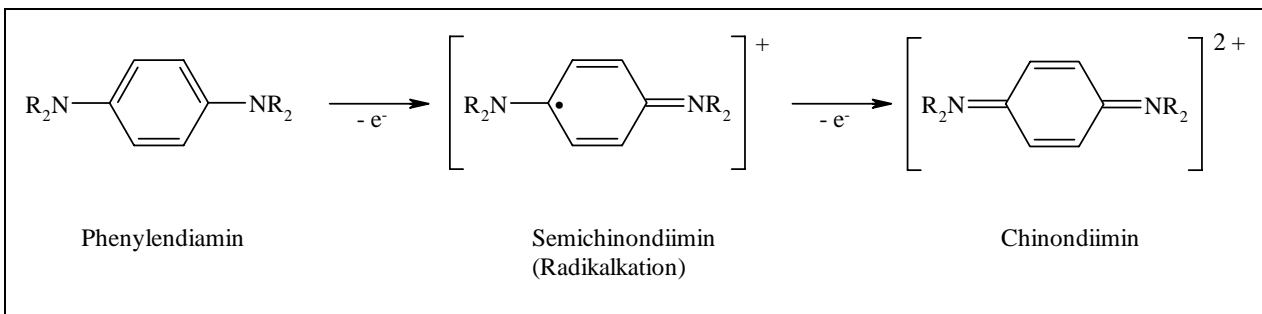


Abbildung 23 Oxidation substituierter Phenylendiamine zu Semichinondiimininen und Chinondiimininen¹³³

Nach Michaelis und Hill¹³⁴ synproportionieren Phenylendiamin und Chinondiimin zu dem entsprechenden Semichinondiimin. Um einen Nachweis von Hydroperoxiden auf Grundlage der Wurster'schen Salze durchführen zu können, muß daher in der Reagenzlösung ein genügend großer Anteil an Phenylendiamin vorhanden sein, damit nach Zugabe des Analyten alle drei Oxidationsstufen nebeneinander vorliegen. Ein Entfärben der Reaktionslösung, wie es in Vorversuchen mit einer N,N-Dimethylphenylendiamin-Lösung geringer Konzentration und einer größeren Menge Wasserstoffperoxid nach einiger Zeit beobachtet werden konnte, kann bei hohen Konzentrationen von Phenylendiamin zunächst verhindert werden. Es wurde des-

halb mit konzentrierten Lösungen von N,N-Dimethylphenylendiamin (DMPD) und N,N,N',N'-Tetramethylphenylendiamin (TMPD) in Methanol gearbeitet (jeweils 5 mmol/l). Damit ergab sich in den einzelnen Testreihen selbst bei Hydroperoxidkonzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ ein 50-facher Überschuß des Reagenzes.

In einem weiteren Versuch wurden zwei Fe^{2+} -haltige Lösungen von DMPD und TMPD gleicher Konzentration mit jeweils der gleichen Menge tert.-Butylhydroperoxid versetzt. Nach ca. 20 Minuten wurde von beiden Lösungen ein Absorptionsspektrum aufgenommen.

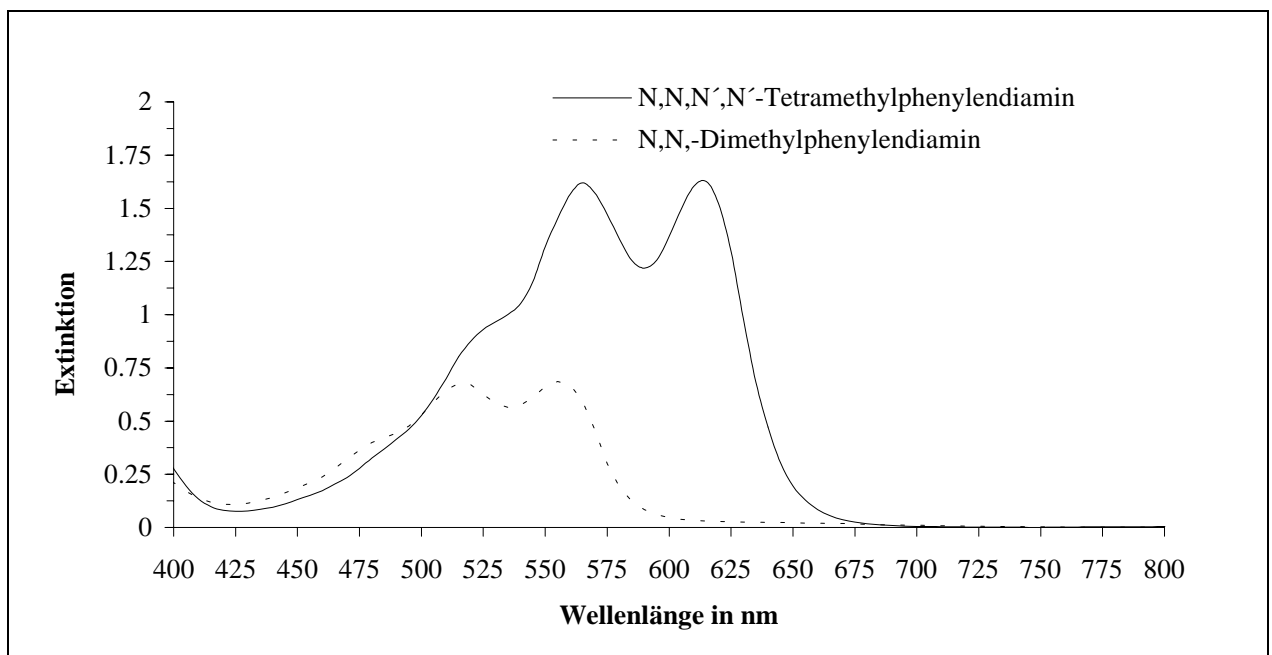


Abbildung 24 Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich einer Lösung von DMPD und TMPD (jeweils 2,5 mmol/l) in Anwesenheit von je 0,25 mmol/l Ammonium-eisen(II)-sulfat nach Zusatz jeweils gleicher Mengen tert.-Butylhydroperoxid

Die ähnlichen Strukturen von DMPD und von TMPD spiegeln sich auch in den entsprechenden UV/VIS-Spektren wider. Beide Verbindungen zeigten jeweils zwei um 40 - 50 nm auseinanderliegende Absorptionsmaxima. Für TMPD ergaben sich diese Maxima bei 564 und 613 nm. Das DMPD hatte Absorptionsmaxima bei 518 und 557 nm. Weiterhin zeigte sich bei diesem Versuch, daß der molare Extinktionskoeffizient des TMPD-Radikalkations größer war als der Wert der entsprechenden DMPD-Verbindung. Dies wurde auch später durch Mori et al. bestätigt,⁷⁵ wonach unter gleichen Bedingungen die Reaktion von Benzoylperoxid mit TMPD ca. 1,5-fach höhere Extinktionswerte lieferte als die

entsprechende Reaktion mit DMPD. Dementsprechend wurde für die photometrische Bestimmung im folgenden nur das N,N,N',N'-Tetramethylphenylendiamin eingesetzt. Eine Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten sowohl für TMPD als auch für DMPD erschien nicht sinnvoll, da die genaue Konzentration der entsprechenden farbigen Radikalkationen aus oben erläuterten Gründen nicht bekannt war. Eine quantitative Hydroperoxidbestimmung konnte somit nur auf der Grundlage einer Kalibriergeraden erfolgen.

Entsprechend der Literatur wurde eine starke Katalyse der Reaktion durch Fe^{3+} -Ionen festgestellt. So stellte sich nach Zugabe einer Hydroperoxyoctadecadiensäure-Lösung (HPOD-Lösung) zu einer Fe^{2+} -haltigen Lösung von TMPD in Methanol/Schwefelsäure der Endwert der Extinktion bei 613 nm schon nach etwa 3 Minuten ein, während in Abwesenheit von Fe^{2+} nur ein sehr langsamer Anstieg der Absorption zu beobachten war (vgl. Abbildung 25). Die Zugabe von Fe^{3+} zu einer Phenylendiaminlösung führte hingegen zu einer sofortigen Färbung.

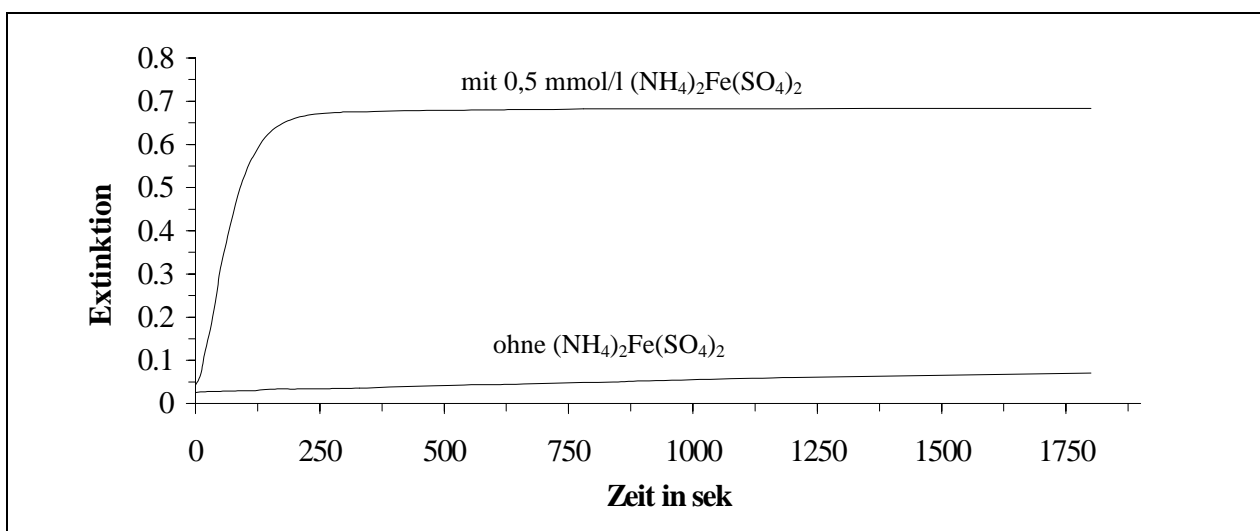


Abbildung 25 Änderung der Extinktion einer Lösung von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin bei 613 nm nach Zugabe von Hydroperoxyoctadecadiensäure ohne und mit Fe^{2+} -Katalyse

Die blaue Färbung des TMPD war über mehrere Stunden stabil. Eine leichte Abnahme der Absorption im Laufe der Zeit, wie sie Boddenberg für das DMPD beschrieb,¹⁰⁴ konnte hier nicht festgestellt werden.

Da die Fe^{2+} -Ionen bei der Reaktion nur katalytisch wirken, wurde für die Reagenzlösung eine im Vergleich zur TMPD-Menge fünffach geringere Konzentration (1 mmol/l in Methanol/Schwefelsäure) eingesetzt. Die Schwefelsäure wurde bei der Herstellung der Reagenzien-

lösung zur Stabilisierung des Fe^{2+} genutzt, um die rasche Oxidation zum Fe^{3+} durch Luftsauerstoff zu verhindern, was eine Verfärbung der Reagenzienlösung und somit eine mögliche Verfälschung von Meßwerten zu Folge gehabt hätte. Trotz Ansäuern und kühler Lagerung im Dunkeln gelang es aber nicht, die Reagenzienlösung länger als einen Tag zu stabilisieren. Auch die Zugabe von Ascorbinsäure oder BHT als Antioxidantien zeigte nicht die gewünschte Wirkung (Abbildung 26).

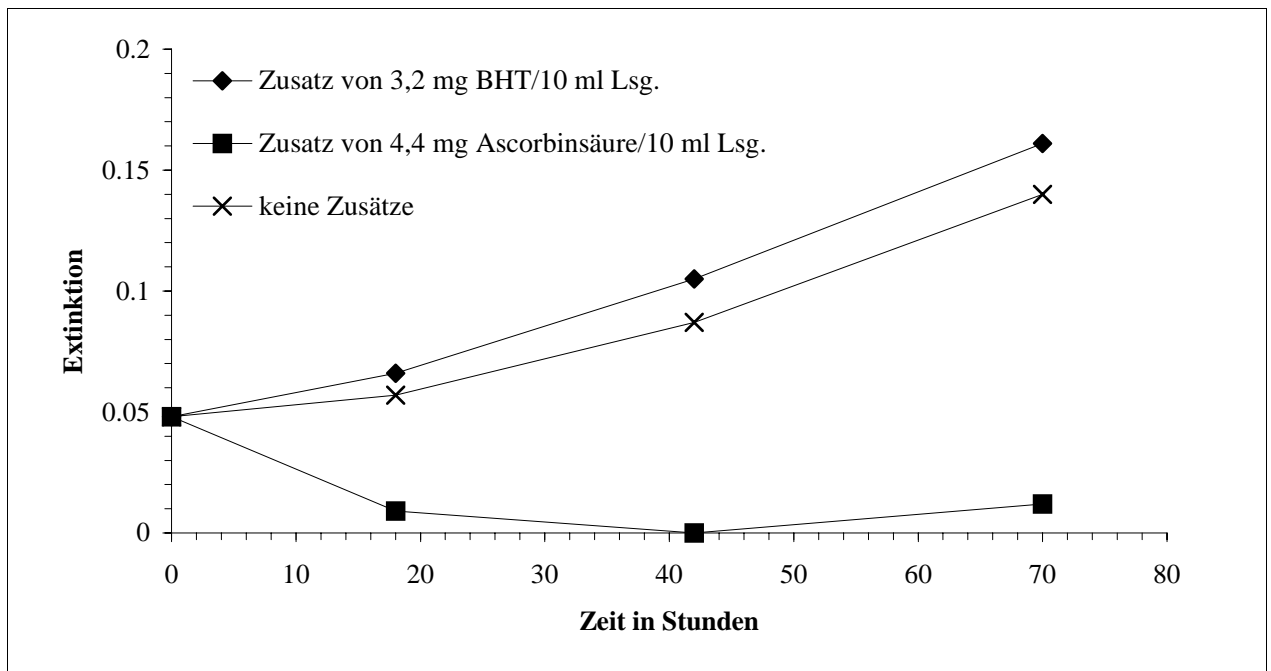


Abbildung 26 Alterung des TMPD-Reagenzes in Abhängigkeit verschiedener Zusätze

Zwar war nach Zusatz von Ascorbinsäure nach 70 Stunden eine deutlich geringere Verfärbung der Reagenzienlösung zu beobachten, eine Nachweisreaktion auf Hydroperoxide gelang mit dieser Lösung jedoch nicht mehr. Vermutlich setzte die Ascorbinsäure als starkes Reduktionsmittel die in der Testlösung vorhandene geringe Hydroperoxidmenge rasch um, so daß eine Oxidation des Fe^{2+} zum Fe^{3+} und somit die Bildung eines farbigen Radikalkations nicht mehr stattfand. Aus diesem Grunde wurden zur Bestimmung der Hydroperoxide zwei Reagenzienlösungen (TMPD bzw. Ammoniumeisen(II)-sulfat enthaltend) jeweils frisch angesetzt und erst kurz vor der eigentlichen Bestimmung zusammengegeben.

4.2.2 Durchführung der Messungen

Zum Vergleich der verschiedenen photometrischen Bestimmungsmethoden wurden jeweils Verdünnungsreihen von Wasserstoffperoxid, tert.-Butylhydroperoxid, 13*S*-Hydroperoxyoctadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure und 13*S*-Hydroperoxyoctadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester angesetzt und diese entsprechend vermessen. Die Analyse der Lipidhydroperoxide erfolgte in methanolischer Lösung. Wasserstoffperoxid und tert.-Butylhydroperoxide wurden in wässriger Lösung vermessen. Die photometrische Auswertung erfolgte an einem Zeiss PM6 Photometer. Aus den erhaltenen Kalibriergeraden wurden Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze in Anlehnung an die Norm DIN 32645 ermittelt.¹³⁵ Die einzelnen Arbeitsvorschriften sind nachstehend aufgeführt.

4.2.2.1 Iodometrische Titration

Zur iodometrischen Titration wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen jeweils 10-15 mg Fettsäurehydroperoxid bzw. 10 ml einer ca. 0,2 %-igen wässrigen Lösung von Wasserstoffperoxid oder tert.-Butylperoxid mit 20 ml entgastem Eisessig versetzt. Der Lösung wurde 1 ml einer wässrigen, gesättigten Kaliumiodidlösung zugesetzt und der Kolben anschließend mit Stickstoff ausgeblasen. Die Proben wurden für 30 Minuten an einen dunklen Ort gestellt und anschließend mit einer 0,05 molaren Natriumthiosulfatlösung unter Zusatz weniger Tropfen Stärkelösung bis zur Farblosigkeit titriert.

4.2.2.2 TBA-Test

335 mg Thiobarbitursäure (TBA) wurden unter leichtem Erwärmen in 5 ml Ethanol (enthält 6 mmol/l BHT) gelöst und diese Lösung dann mit Ethanol auf 50 ml aufgefüllt. Zur Messung wurden 700 µl der TBA-Lösung mit jeweils 150 µl der Probenlösung und einer 40 %-igen wässrigen Trichloressigsäurelösung versetzt. Die Proben wurden 15 Minuten bei 80° C inkubiert. Ihre Extinktionen wurden anschließend bei 530 nm vermessen.

4.2.2.3 Bestimmung der I_3^- -Absorption

In Analogie zu dem von Cramer et al.¹³⁶ beschriebenen Verfahren wurden 350 μ l einer Mischung aus Eisessig und Dichlormethan (3/2 v/v) mit 0,001 % BHT, 15 μ l einer wässriger Kaliumiodidlösung (1,2 g KI/ml Wasser) und 1 ml einer 0,35 %-igen wässrigen $CdCl_2$ -Lösung zusammengegeben. Dazu wurden 100 μ l der Standardlösung pipettiert. Die Proben wurden drei Minuten im Dunkeln in einem verschlossenen Gefäß inkubiert und anschließend bei 353 nm vermessen. Anschließend wurden zu jeder vermessenen Probe jeweils 10 μ l Natriumthiosulfatlösung (0,2 mol/l) hinzugegeben und erneut die Extinktion bei 353 nm gemessen. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß keine Störungen durch andere Substanzen vorlagen, die ebenfalls in diesem Wellenlängenbereich absorbierten. Um Störungen durch Sauerstoff auszuschließen, wurden alle Lösungsmittel vor Gebrauch gründlich entgast.

4.2.2.4 FOX2-Test

Die Bestimmung der Hydroperoxide mit dem FOX2-Test erfolgte nach der von Jiang et al.⁷⁰ beschriebenen Methode. Dazu wurden zur Herstellung einer Stammlösung 98,0 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat in 14 ml H_2SO_4 (175 g/l) gelöst. Anschließend wurden 76,1 mg (0,1 mmol) Xylenorange zugesetzt und die Lösung mit tridest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Zur Messung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit einer methanolischen BHT-Lösung (4 mmol/l) verdünnt und 900 μ l der so erhaltenen Reagenzlösung mit 100 μ l der Probenlösung versetzt. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 560 nm gegen eine entsprechende Blindlösung mit gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Hydroperoxid, gemessen.

4.2.2.5 TMPD-Test

400 μ l einer Lösung von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin in gründlich entgastem Methanol (5 mmol/l) und 400 μ l einer 1 mmol/l Lösung von Ammoniumeisen(II)-sulfat in Methanol/ H_2SO_4 (175 g/l; 98/2 v/v) wurden in einer Küvette zusammengegeben. Zu dieser Reagenzlösung wurden 200 μ l der Hydroperoxidstandardlösung gegeben. Nach zehn Minuten wurde die Extinktion der blau gefärbten Lösung bei 613 nm gemessen. Als Blindlösung

diente eine Mischung aus 400 μl TMPD-Lösung, 400 μl Ammoniumeisen(II)-sulfatlösung und 200 μl Wasser bzw. Methanol (je nach Art der zu vermessenden Probe).

4.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Die für den FOX2-Test, den TMPD-Test und die Bestimmung der I_3^- -Absorption erhaltenen Werte für die Nachweisgrenzen sind in Abbildung 27 einander gegenübergestellt. Die Nachweisgrenzen des TBA-Testes lagen mit 694 $\mu\text{mol/l}$ (für 13S-HPOD) bzw. 801 $\mu\text{mol/l}$ (für 13S-HPOT) um bis zu zwei Größenordnungen darüber. Die einzelnen Werte für die Kalibrierfunktionen, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze sind in Tabelle 16 auf Seite 62 aufgeführt.

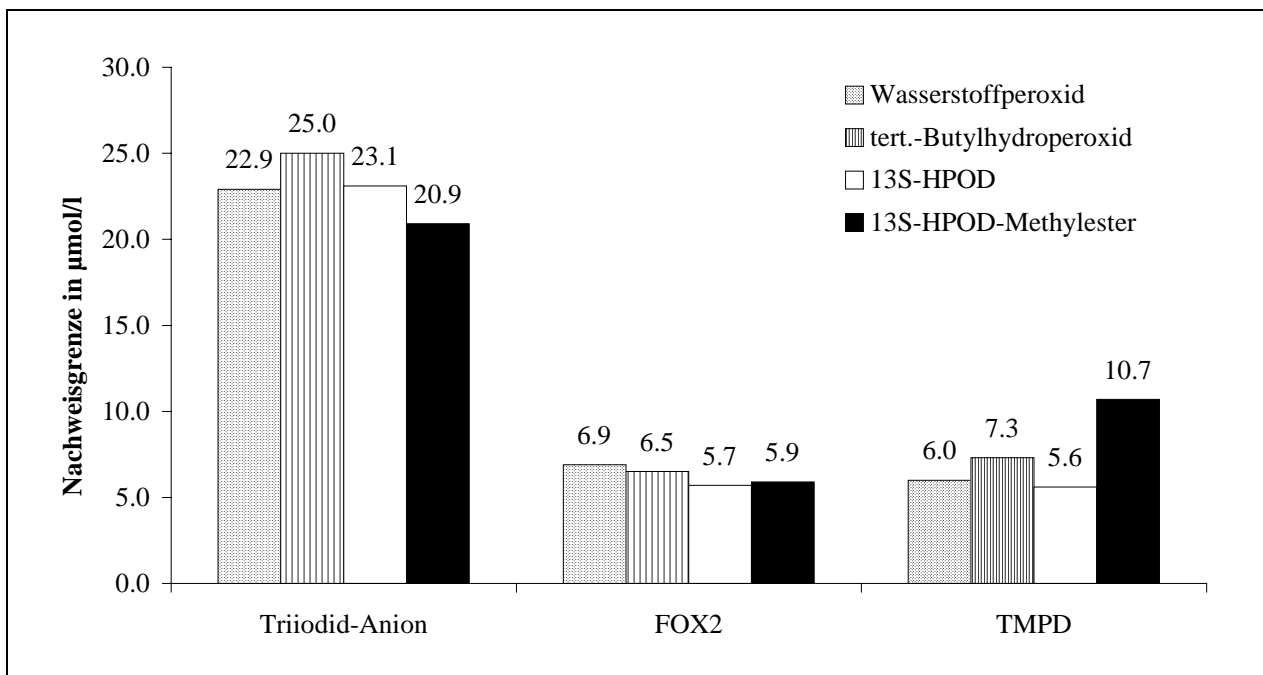


Abbildung 27 Vergleich der Nachweisgrenzen photometrischer Bestimmungsmethoden für Lipidhydroperoxide (vgl. Tabelle 16)

Die oben beschriebene iodometrische Titration mit visuell-optischer Endpunktsbestimmung ist aufgrund des nur sehr schwachen Farbumschlages von hellgelb nach farblos in den verdünnten Lösungen nur für Proben mit einem relativ hohen Hydroperoxidgehalt ($> 1 \text{ mmol/l}$) geeignet. Bei der Titration der Lipidhydroperoxide kam es dabei jedoch zu sehr

großen Fehlern. Die Titration wäßriger Wasserstoffperoxidlösungen bereitete dagegen keine Probleme. Ursache für solche Fehler war ein Nachdunkeln bereits austitrierter Proben. Da die Reaktionsgeschwindigkeit des Iodids mit den Lipidhydroperoxiden wesentlich geringer als mit Wasserstoffperoxid ist (Gebicki und Guille⁵⁹ geben für 13*S*-HPOD 25 Minuten und für H₂O₂ nur 3 Minuten an), konnte nicht bestimmt werden, ob die Ursache für dieses Nachdunkeln auf einer Reaktion des Iodids mit noch nicht umgesetzten Lipidhydroperoxiden oder mit Luftsauerstoff beruht. Die sich daraus ergebenden Schwankungen des Hydroperoxidgehaltes lagen im Bereich von bis zu 20 %. Eine Steigerung der Empfindlichkeit durch Zugabe von Stärkelösung, wie sie bei der Bestimmung in wäßrigen Medien vorgeschlagen wird,¹³⁷ konnte nicht festgestellt werden. Wheeler⁴⁶ beschrieb als Alternative dazu eine Zweiphasentitration, bei der das in einer Essigsäure/Wasser-Phase gebildete Iod zunächst mit Chloroform extrahiert wurde. Bei anschließender Titration mit Thiosulfatlösung verschwand dann die violette Färbung der organischen Phase. Diese Methode hat aber ebenfalls den großen Nachteil, daß auch sie nur für Proben mit einem hohen Hydroperoxidgehalt bzw. nur mit relativ großen Probemengen (3 bis 10 g) befriedigende Ergebnisse liefert. Die iodometrische Titration schien somit zur Bestimmung geringer Hydroperoxidmengen in kleinen Probenvolumina ungeeignet. Sie deshalb auch nicht weiter mit den photometrischen Bestimmungsmethoden verglichen.

Auch der TBA-Test erwies sich zur quantitativen Bestimmung von Hydroperoxiden als nicht geeignet. Wie in Kapitel 3.3.1 erläutert, beruht der TBA-Test auf der Reaktion von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure unter Bildung eines farbigen Produktes. Der Malondialdehyd bildet sich jedoch nur aus solchen Lipidhydroperoxiden, die über drei Doppelbindungen verfügen. Dennoch wurden auch mit 13*S*-Hydroperoxyoctadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäure (13*S*-HPOD) beim TBA-Test positive Ergebnisse erhalten. Ursache war hier die Bildung sogenannter "thiobarbituric acid reactive substances" (TBARS), die analog zum Malondialdehyd ebenfalls mit TBA zu gefärbten Reaktionsprodukten führten. Die Probenlösungen mit Linol- und Linolensäure hatten nach Zugabe von TBA und Inkubation dementsprechend auch eine etwas unterschiedliche Färbung. Nach dem Auftragen der bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessenen Extinktionen gegen die Lipidhydroperoxidkonzentrationen ergab sich sowohl für 13*S*-HPOD als auch für 13*S*-HPOT ein linearer Verlauf. Im Falle des 13*S*-HPOD hatte die erhaltene Kalibriergerade jedoch eine deutlich geringere Steigung (Abbildung 28).

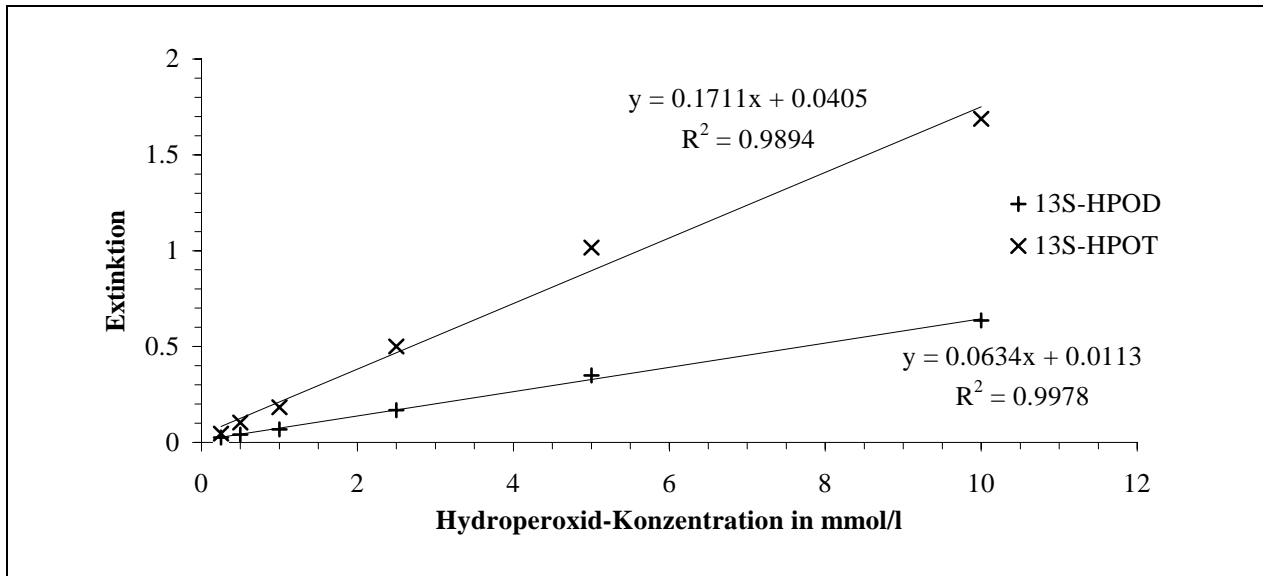


Abbildung 28 Kalibriergeraden für 13S-HPOD und 13S-HPOT beim TBA-Test

Zur Summenbestimmung des Hydroperoxidgehaltes in Proben, die verschiedene mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, war diese Methode deshalb nicht geeignet, da für solche Bestimmungen eine gleiche Reaktivität der Hydroperoxide gegenüber dem Reagenz gewährleistet sein muß. Beim TBA-Test reagieren jedoch nicht die Hydroperoxide selbst, sondern deren Abbauprodukte, deren Art und Zusammensetzung von den in der Probe vorhandenen Fettsäuren abhängt. Die erforderliche Messung mit Malondialdehyd als externem Standard wurde deshalb nicht weiter durchgeführt. Auf diese Weise hätte zwar eine Korrelation zwischen den gemessenen Werten und einer Malondialdehydkonzentration hergestellt werden können, eine Übertragung der Ergebnisse auf Realproben wäre jedoch trotzdem nicht möglich gewesen.

Mit den gemessenen Fettsäurestandards wurden beim TBA-Test im Vergleich zu den anderen photometrischen Methoden wesentlich größere Werte für die Nachweisgrenze erhalten. Ein empfindlicher Nachweis von Lipidhydroperoxiden ist mit dem TBA-Test auch aus diesem Grunde nicht möglich. Bei Proben mit gleicher Matrix und Fettsäurezusammensetzung kann mit diesem Test jedoch zumindest eine qualitative Aussage über den Grad der Oxidation getroffen werden. Für genauere Analysen empfiehlt es sich aber, auf andere photometrische Verfahren auszuweichen.

Bessere Ergebnisse lieferte die Bestimmung der I_3^- -Absorption. Aber auch hierbei lag die Nachweisgrenze mit ca. $23 \mu\text{mol/l}$ wesentlich über den Werten, die für den FOX2- oder den TMPD-Test bestimmt wurden (Abbildung 27). Der Zusatz von Cd^{2+} sollte die Oxidation des

Iodids in der Reagenzienlösung verhindern. Eine Störung durch Luftsauerstoff konnte auf diese Weise jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zur Steigerung der Empfindlichkeit stellten Gebicki und Guille⁵⁹ ein Meßverfahren vor, bei dem die Reaktion des Hydroperoxids mit dem Iodid und die photometrische Messung unter Schutzgas durchgeführt werden. Allerdings war aufgrund des dazu notwendigen apparativen Aufwands eine schnelle und einfache Messung nicht mehr möglich.

Die Bestimmung der Hydroperoxide lieferte sowohl mit dem FOX2-Test als auch mit dem TMPD-Test annähernd gleiche Nachweisgrenzen von 6 - 11 $\mu\text{mol/l}$. Die Art des verwendeten Hydroperoxides hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse, wie sich aus der Steigung der entsprechenden Kalibriergeraden ergab (vgl. Tabelle 16 auf Seite 63).

Die von Jiang et al.⁷⁰ für Wasserstoffperoxid und tert.-Butylhydroperoxid angegebenen Nachweisgrenzen von 25-50 nmol/l für den FOX2-Test konnten allerdings nicht bestätigt werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte lagen um etwa den Faktor 100-250 darüber.

Die Bestimmung von Hydroperoxiden mittels des TMPD-Testes schien nach diesen Versuchen eine dem FOX2-Test gleichwertige Methode zu sein. Nachteilig wirkte sich jedoch die vergleichsweise geringe Stabilität der TMPD-Reagenzienlösung aus. Durch den sehr hohen Methanol-Anteil (> 98 %) bestand beim TMPD-Test jedoch die Möglichkeit, auch in wäßrigem Medium schwer- bzw. unlösliche Hydroperoxide, wie z.B. Cholesterylester- oder Phospholipid-Hydroperoxide, zu bestimmen.

Methode	Hydroperoxid	Konz.-bereich in $\mu\text{mol/l}$	Steigung in $1 \cdot \text{AU}/\mu\text{mol}$	Achsenabschn. in Extinktionseinheiten (AU)	R^2	NG in $\mu\text{mol/l}$	EG in $\mu\text{mol/l}$	BG in $\mu\text{mol/l}$
TBA	13S-HPOD	250-100000	$0,634 \cdot 10^{-4}$	$1,13 \cdot 10^{-2}$	0,998	694	1390	2130
	13S-HPOT	250-100000	$1,711 \cdot 10^{-4}$	$4,05 \cdot 10^{-2}$	0,989	801	1600	2660
I_3^-	H_2O_2	10-250	$1,13 \cdot 10^{-3}$	$4,14 \cdot 10^{-2}$	0,997	22,9	45,8	75,8
	tert.-BHP	10-250	$8,59 \cdot 10^{-4}$	$3,37 \cdot 10^{-2}$	0,995	25,0	50,1	83,4
	13S-HPOD	10-250	$1,40 \cdot 10^{-3}$	$4,44 \cdot 10^{-2}$	0,996	23,1	46,2	76,4
	13S-HPOD-Methylester	10-250	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$3,01 \cdot 10^{-2}$	0,997	20,9	41,9	69,4
FOX2	H_2O_2	2,5-100	$3,29 \cdot 10^{-3}$	$1,07 \cdot 10^{-2}$	0,998	6,9	13,8	23,0
	tert.-BHP	2,5-100	$3,63 \cdot 10^{-3}$	$1,61 \cdot 10^{-2}$	0,998	6,5	13,0	21,8
	13S-HPOD	2,5-100	$3,96 \cdot 10^{-3}$	$-9,42 \cdot 10^{-4}$	0,998	5,7	11,4	19,0
	13S-HPOD-Methylester	2,5-100	$3,72 \cdot 10^{-3}$	$8,31 \cdot 10^{-3}$	0,999	5,9	11,8	19,7
TMPD	H_2O_2	1-100	$4,85 \cdot 10^{-3}$	$2,28 \cdot 10^{-2}$	0,998	6,0	12,0	20,1
	tert.-BHP	1-100	$4,65 \cdot 10^{-3}$	$1,85 \cdot 10^{-2}$	0,998	7,3	14,6	24,4
	13S-HPOD	1-100	$4,79 \cdot 10^{-3}$	$1,70 \cdot 10^{-2}$	0,998	5,6	11,3	18,8
	13S-HPOD-Methylester	1-100	$4,88 \cdot 10^{-3}$	$4,44 \cdot 10^{-2}$	0,993	10,7	21,4	35,6

Tabelle 16 *Kalibrierfunktionen, Korrelationskoeffizienten (R^2), Nachweis- (NG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenzen (BG) photometrischer Bestimmungsmethoden für Hydroperoxide*

4.3 HPLC-Trennung von Lipidhydroperoxiden an Normalphasen

Wie in Kapitel 3.3.2.1 bereits erläutert, ist an Normalphasen die Trennung isomerer Lipidhydroperoxide möglich. In der Literatur beschriebene Trennungen lassen sich aber aufgrund der großen Empfindlichkeit der Trennsysteme gegenüber äußeren Einflüssen nur mit Schwierigkeiten auf andere HPLC-Systeme übertragen, da sich z. B. schon geringe Änderungen in der Polarität des Eluenten (durch Zusatz entsprechender Komponenten oder durch Anwesenheit von Wasser) sehr stark auf die Trennleistung auswirken. Die in der Literatur am häufigsten beschriebene mobile Phase ist das Gemisch von Hexan und 2-Propanol im Verhältnis 99:1, das auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Durch Chromatographie an Kieselgel (LiChrospher Si 60) gelang es, den Reaktionsverlauf bei der photosensibilisierten Oxidation von Fettsäuremethylestern zu verfolgen (Kapitel 4.1.3). Dazu wurden in festgelegten Zeitabständen dem Reaktionsansatz Proben entnommen und diese durch Filtrieren über Kieselgel vom Methylenblau und dessen Oxidationsprodukten befreit. Die Detektion erfolgte bei 200 und bei 234 nm, wodurch für Linol- und Linolensäuremethylester eine Zuordnung der Peaks zu den entstandenen Hydroperoxiden mit konjugierter bzw. nichtkonjugierter Doppelbindung möglich war (vgl. Abbildung 29-34). Zur Erläuterung der Abkürzungen siehe Anhang, Kapitel 6.1 und 6.2.

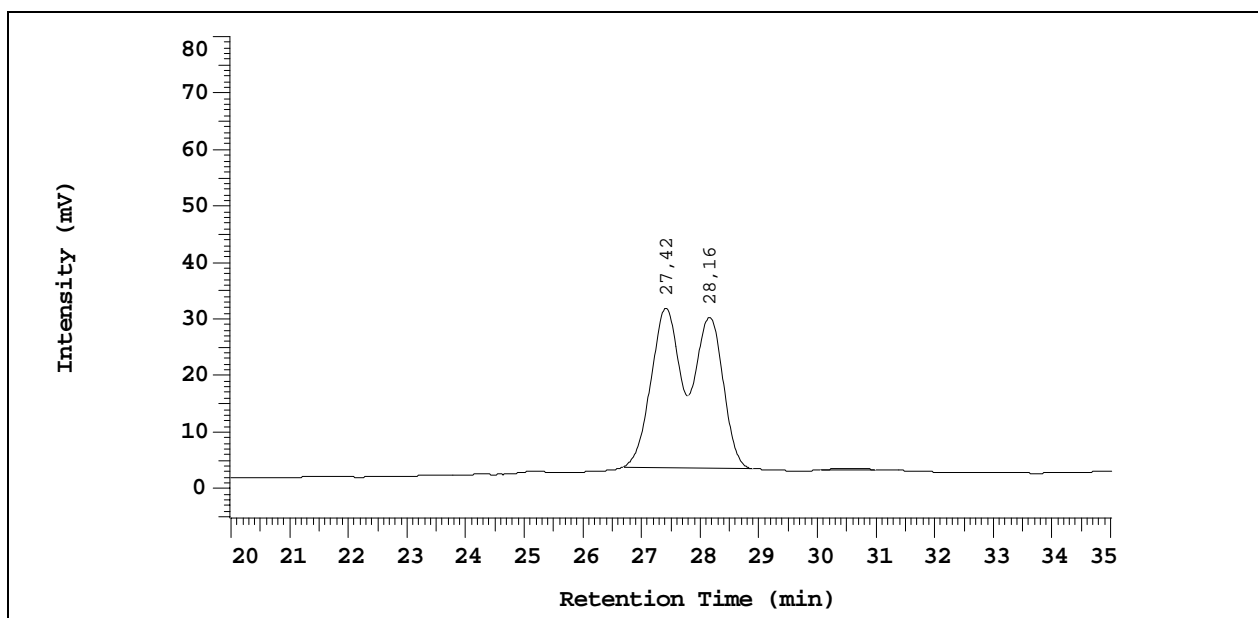


Abbildung 29 Trennung der Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 200 nm; Reaktionszeit 14 Stunden
 $t_r = 27,42 \text{ min}, 28,16 \text{ min}$: 9-HPO-Me-Ester, 10-HPO-Me-Ester

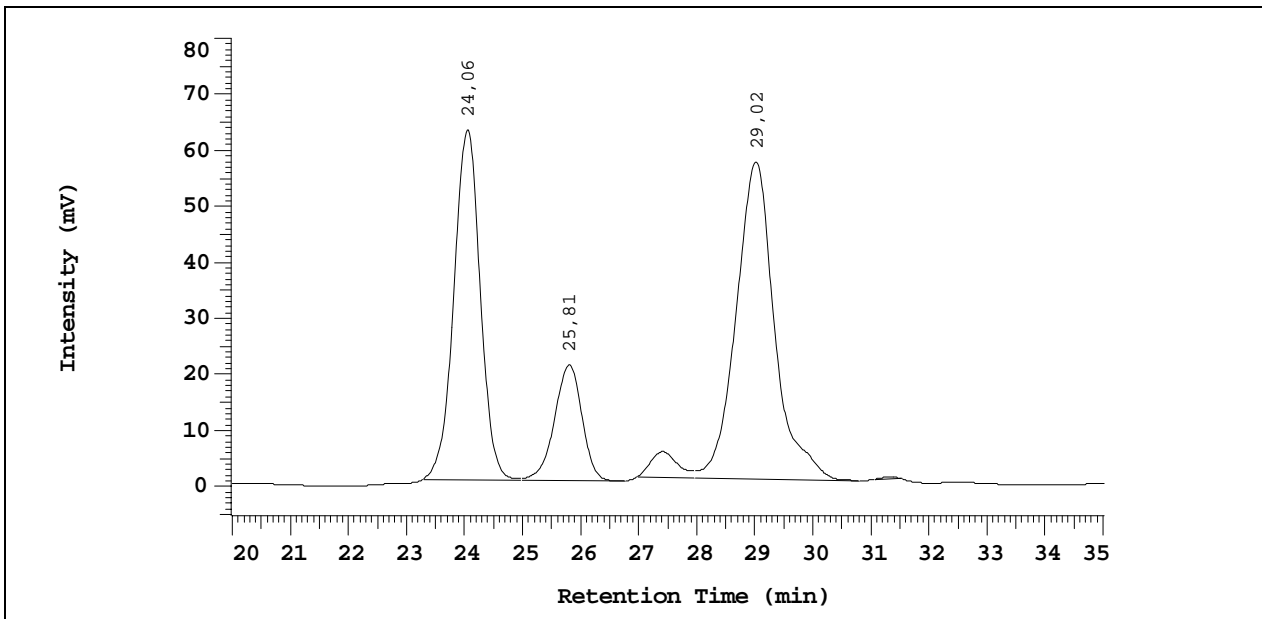


Abbildung 30 Trennung der Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 200 nm; Reaktionszeit 16 Stunden
 $t_r = 24,06$ min: 13-HPOD-Me-Ester; $t_r = 29,02$ min: 9-HPOD-Me-Ester;
 $t_r = 25,81$ min, $29,02$ min: 10-HPOD-Me-Ester, 12-HPOD-Me-Ester;
 $t_r = 27,4$ min: unbekannte Verunreinigung

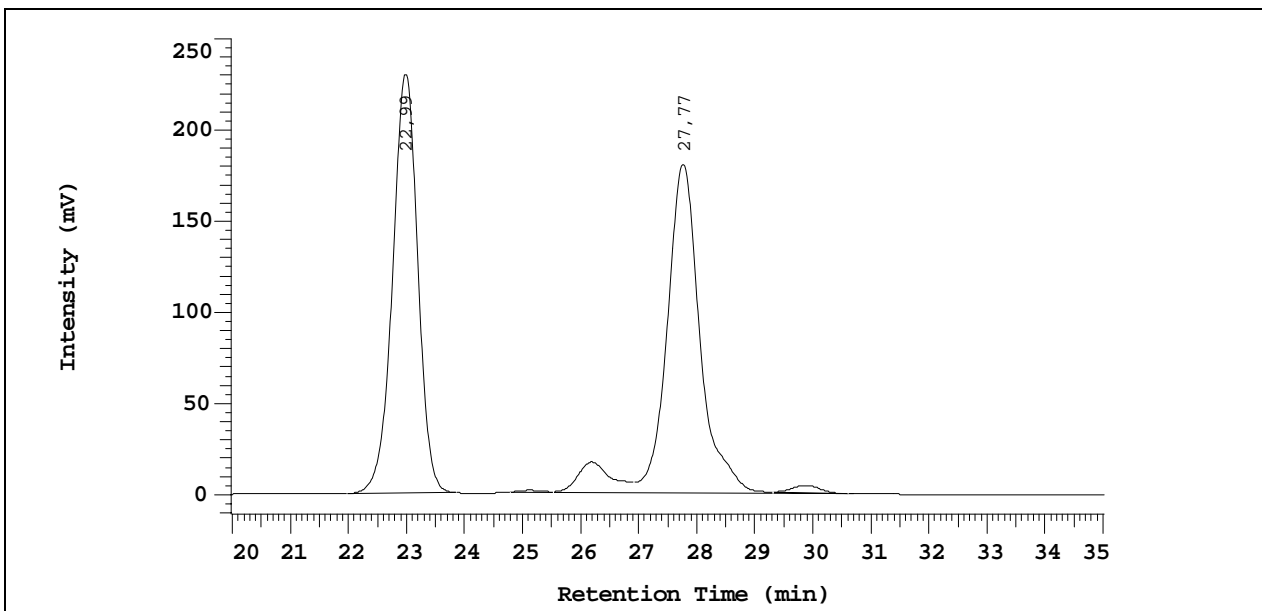


Abbildung 31 Trennung der Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 234 nm; Reaktionszeit 16 Stunden
 $t_r = 22,99$ min: 13-HPOD-Me-Ester; $t_r = 27,77$ min: 9-HPOD-Me-Ester;
 $t_r = 26,2$ min: unbekannte Verunreinigung

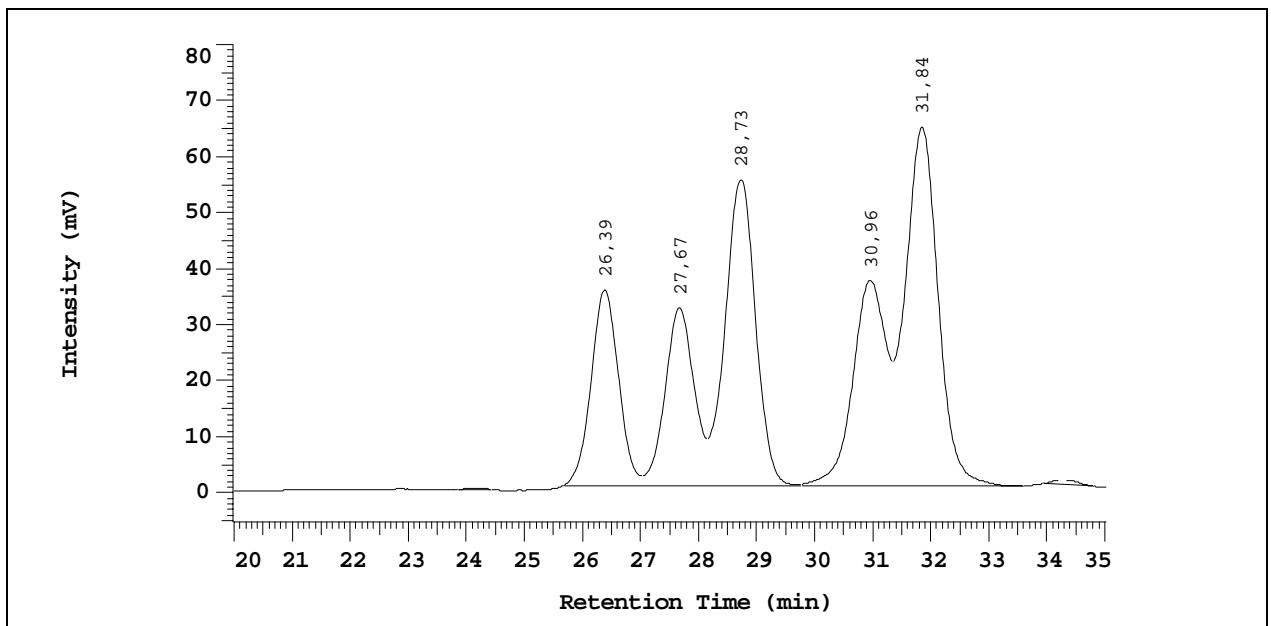


Abbildung 32 Trennung der Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 200 nm; Reaktionszeit 8 Stunden

$t_r = 26,39$ min, $27,67$ min, $28,73$ min, $30,96$ min: 9-HPOT-Me-Ester, 12-HPOT-Me-Ester, 13-HPOT-Me-Ester, 16-HPOT-Me-Ester;
 $t_r = 31,84$ min: 10-HPOT-Me-Ester, 15-HPOT-Me-Ester

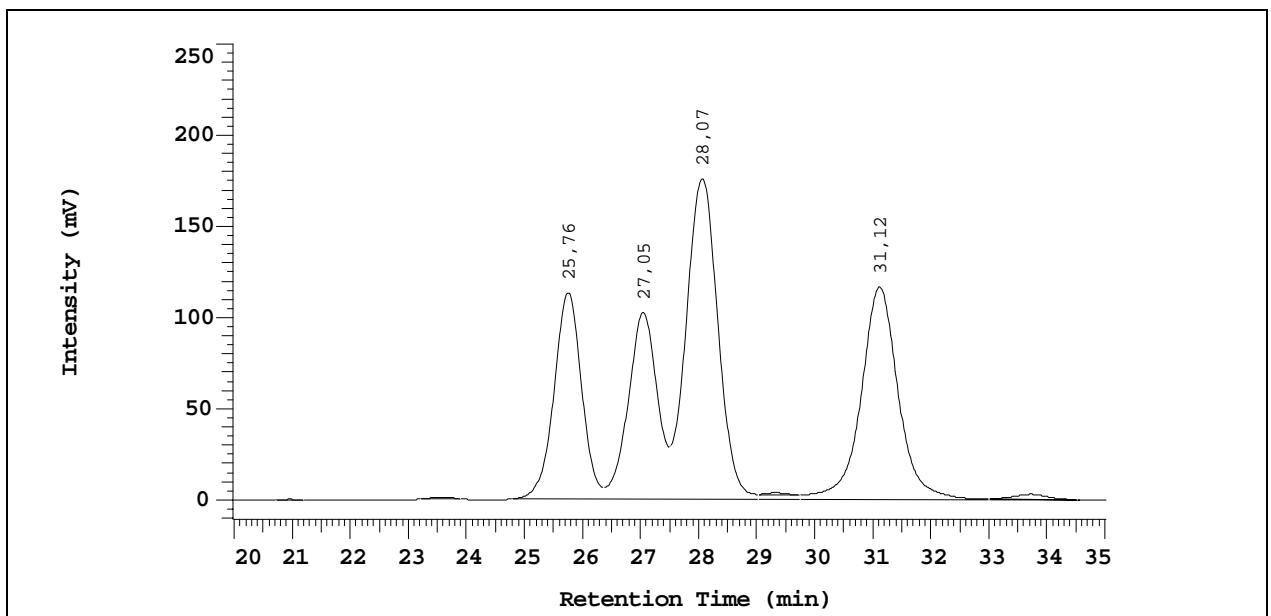


Abbildung 33 Trennung der Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionswellenlänge 234 nm; Reaktionszeit 8 Stunden

$t_r = 25,76$ min, $27,05$ min, $28,07$ min, $31,12$ min: 9-HPOT-Me-Ester, 12-HPOT-Me-Ester, 13-HPOT-Me-Ester, 16-HPOT-Me-Ester

Eine vollständige Trennung aller Isomeren gelang bei Verwendung von Hexan/2-Propanol 99/1 als Eluent nicht, wie aus den abgebildeten Chromatogrammen hervorgeht. Zwar konnten bei den Linol- und Linolensäuremethylesterderivaten jeweils drei der vier bzw. fünf der sechs isomeren Hydroperoxide getrennt werden, im Falle des Ölsäuremethylesters erfolgte jedoch nur eine Antrennung (Abbildung 29). Die kleinen Signale bei ca. 27,4 bzw. 26,2 Minuten in Abbildung 30 und 31 rühren von Verunreinigungen her.

Eine Verbesserung der Trennleistung hätte sich entweder durch Erhöhung der Kapazitätsfaktoren, d.h. durch Verringerung des 2-Propanol-Anteils im Eluenten, oder durch Austausch von 2-Propanol gegen eine andere Komponente bei annähernd gleichbleibendem Kapazitätsfaktor erreichen lassen.

Es wurde deshalb in einem weiteren Versuch eine Mischung aus Hexan/2-Propanol 99,5/0,5 als Eluent eingesetzt. Damit gelang im Falle der Ölsäuremethylesterhydroperoxide eine nahezu vollständige Trennung. Die Retentionszeiten verdoppelten sich dabei, was gleichzeitig auch zu einer wesentlich größeren Peakbreite führte (Abbildung 34). Auf einen Ersatz von 2-Propanol durch andere Lösungsmittel mit ähnlichem Polaritätsindex wurde verzichtet, da sich in Vorversuchen zeigte, daß die Zeit zur Konditionierung der Säule bei einem Wechsel des Eluenten in der Regel mindestens 1-2 Tage betrug. Hier sind noch weitere Untersuchungen wünschenswert.

Die langen Konditionierungszeiten deuteten schon auf einen wesentlichen Nachteil der Trennung von Lipidhydroperoxiden an Normalphasen hin. Darüber hinaus bestätigte sich die bereits erwähnte große Anfälligkeit des Trennsystems gegenüber Änderungen der Eluentenzusammensetzung. Die geringe Stabilität des Systems zeigte sich auch beim Vergleich der Retentionszeiten zweier aufeinanderfolgender HPLC-Analysen. So unterschieden sich die Retentionszeiten der Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters um bis zu 1,3 Minuten, obwohl die zugehörigen HPLC-Messungen direkt nacheinander erfolgten.

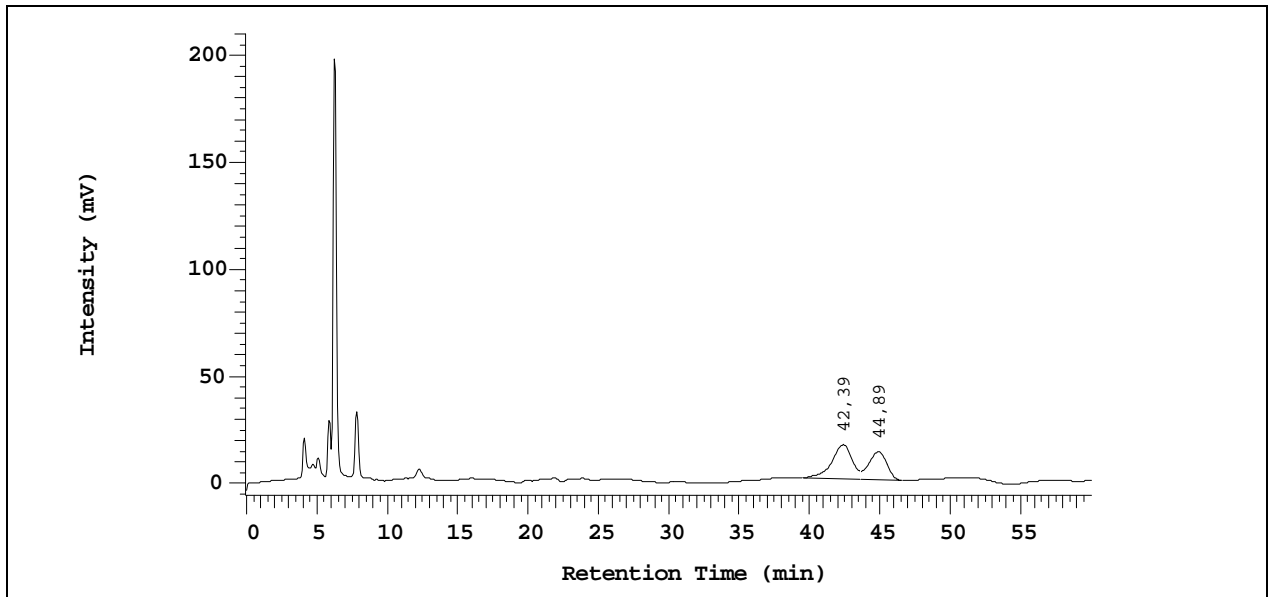


Abbildung 34 Trennung der Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters an LiChrospher Si 60 mit Hexan/2-Propanol 99,5/0,5; Detektionswellenlänge 200 nm; Reaktionszeit 14 Stunden

Aus den Versuchen ging hervor, daß durch Einsatz von Normalphasen auch in der HPLC, wie bei der Kapillarelektrophorese, eine Trennung isomerer Hydroperoxide von Fettsäuremethylestern gut möglich ist. Die Trennleistung mit dem getesteten Lösungsmittelgemisch Hexan/2-Propanol 99/1 reichte jedoch nicht an die mit der Kapillarelektrophorese erreichten Trennungen heran. Insbesondere die gleichzeitige Trennung isomerer Hydroperoxide von Öl-, Linol- und Linolensäure, wie sie Schmitz für die Kapillarelektrophorese beschrieb,^{138,139} gelang aufgrund der sehr ähnlichen Retentionszeiten nicht. Trotz dieser Nachteile ist die hier beschriebene Methode zur Trennung isomerer Lipidhydroperoxide eine sinnvolle Alternative. Die eindeutige Zuordnung der Signale bei der Trennung von Gemischen verschiedener Fettsäuremethylesterhydroperoxide ist dabei jedoch nur schwer möglich. Durch Einsatz eines Diodenarraydetektors (DAD), der leider für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand, ließen sich solche Zuordnungsprobleme vermutlich leichter lösen. Bei der Messung von Realproben würde der Einsatz selektiver Nachweismethoden für Hydroperoxide, gegebenenfalls in Verbindung mit einer vorgeschalteten UV-Detektion mittels eines DAD, die Leistungsfähigkeit des beschriebenen Trennsystems beträchtlich erhöhen.

4.4 Entwicklung einer Detektionsmethode zum selektiven Nachweis von Lipidhydroperoxiden in der Normalphasen-HPLC

Wie in Kapitel 3.3.2.1 bereits erläutert, finden sich in der Literatur nur wenige Methoden zur selektiven Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in der Normalphasen-HPLC. Um die oben beschriebene Trennleistung mit einer selektiven Nachweismethode zu verbinden, wurde deshalb ein neues Nachsäulenderivatisierungsverfahren entwickelt.

4.4.1 Vorüberlegungen

Aufgrund des in der NP-HPLC als Eluent eingesetzten Lösungsmittelgemisches mit hohem Hexan-Anteil wurden einige besondere Anforderungen an ein geeignetes Reaktionssystem gestellt:

- Die Reaktion mußte in einem mit Hexan mischbaren Lösungsmittel ablaufen. Der Einsatz wäßriger oder methanolischer Lösungen schied somit aus.
- Sowohl das Reagenz als auch das Reaktionsprodukt mußten unter den gegebenen Bedingungen, d.h. in einem Lösungsmittelgemisch mit hohem Hexan-Anteil, löslich sein, um nach der Zudosierung ein Verstopfen der Kapillaren zu verhindern.
- Die Reaktion des Hydroperoxids mit dem Reagenz sollte zu einer möglichst großen Änderung der UV/VIS-Aktivität oder der Fluoreszenzeigenschaften der Probenlösung führen.
- Die Reaktion sollte möglichst ohne Katalyse ablaufen. Der Einsatz enzymkatalysierter Reaktionen, wie sie bei der RP-HPLC eingesetzt wurden, schien wegen des hohen Hexananteils nicht sinnvoll.

Anhand dieser Vorgaben wurden einige Substanzen als Nachsäulenderivatisierungsreagenzien getestet (Tabelle 17). Als Hydroperoxidstandard diente dabei eine Lösung von 13S-HPOD mit einer Konzentration von 1 mmol/l.

Reagenzzusammensetzung	Detektion	mögliche Reaktion mit Hydroperoxid
1,5-Diphenylcarbohydrazid in 2-Propanol/Eisessig 90/10	UV/VIS; $\lambda = 565 \text{ nm}$	Bildung eines roten Farbstoffes (vgl. Abbildung 15)
1,5-Diphenylcarbohydrazid in Chloroform/Eisessig 90/10	UV/VIS; $\lambda = 565 \text{ nm}$	Bildung eines roten Farbstoffes (vgl. Abbildung 15)
Fluorescein in 2-Propanol/Eisessig 90/10	Fluoreszenz; $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$	Bildung von Fluorescein
Fluorescein in Chloroform/Eisessig 90/10	Fluoreszenz; $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$	Bildung von Fluorescein
Fluorescein in Chloroform/Eisessig 97,5/2,5	Fluoreszenz; $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$	Bildung von Fluorescein
N-(4-Hydroxyphenyl)-N-(3,5-dichlor-4-hydroxyphenyl)-amin in 2-Propanol/Eisessig 90/10	UV/VIS; $\lambda = 520 \text{ nm}$	Bildung von 2,6-Dichlor-4-[(4-hydroxyphenyl)imino]-2,5-cyclohexadien-1-on
N-(4-Hydroxyphenyl)-N-(3,5-dichlor-4-hydroxyphenyl)-amin in Chloroform/Eisessig 90/10	UV/VIS; $\lambda = 520 \text{ nm}$	Bildung von 2,6-Dichlor-4-[(4-hydroxyphenyl)imino]-2,5-cyclohexadien-1-on
N-(4-Hydroxyphenyl)-N-(3,5-dichlor-4-hydroxyphenyl)-amin, 58 mg/l Ascorbinsäure in 2-Propanol/Eisessig	UV/VIS; $\lambda = 520 \text{ nm}$	Bildung von 2,6-Dichlor-4-[(4-hydroxyphenyl)imino]-2,5-cyclohexadien-1-on
Anthrarobin in 2-Propanol/Eisessig 90/10	UV/VIS; $\lambda = 440 \text{ nm}$	Bildung von Alizarin
Leuko-Benzoylmethylenblau, Trichloressigsäure in Chloroform	UV/VIS; $\lambda = 620 \text{ nm}$	Bildung von Benzoyl-Methylenblau
Leuko-Benzoylmethylenblau in Chloroform/Eisessig 95/5	UV/VIS; $\lambda = 620 \text{ nm}$	Bildung von Benzoyl-Methylenblau

Tabelle 17 Untersuchte Reaktionssysteme zur Nachsäulenderivatisierung in der NP-HPLC von Lipidhydroperoxiden

Die Bestimmungen wurden in einer für diese Zwecke leicht modifizierten HPLC-Anlage durchgeführt. Auf den Einbau einer Trennsäule wurde verzichtet, da mit einer isomerenreinen Standardverbindung gearbeitet wurde. Gleichzeitig konnte dadurch die zur Durchführung der Versuche benötigte Zeit drastisch reduziert und eine erhebliche Menge an Lösungsmittel eingespart werden. Der Aufbau der Anlage ist in Kapitel 6.6.2 schematisch dargestellt.

Für die Vorversuche wurden jeweils 20 μl der Hydroperoxidstandardlösung bei verschiedenen Flußraten (0,25 und 0,5 ml/min) und verschiedenen Temperaturen der Reaktionskapillare (25 und 55 °C) in das System injiziert.

Trotz der relativ hohen Hydroperoxidkonzentration ergab sich nur mit 1,5-Diphenylcarbohydrazid ein eindeutig identifizierbares Signal, wobei das mit Chloroform angesetzte Reagenz wesentliche bessere Ergebnisse lieferte. Die damit erhaltenen Signale waren etwa um etwa den Faktor 65 größer als bei der Verwendung von 2-Propanol (Abbildung 35).

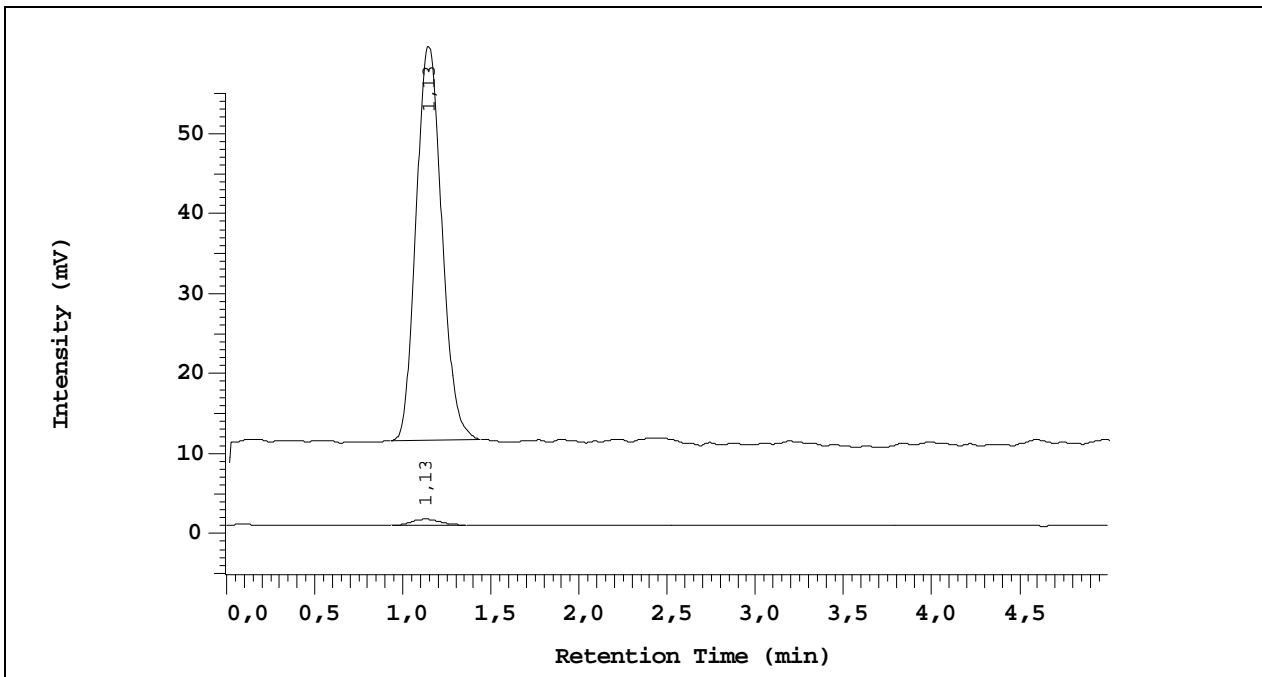


Abbildung 35 Vergleich des Responseverhaltens von 1,5-Diphenylcarbohydrazid (DPC) in Abhängigkeit vom eingesetzten Lösungsmittel
 (oberes Chromatogramm: DPC in CHCl_3 /Eisessig 90/10;
 unteres Chromatogramm: DPC in 2-Propanol/Eisessig 90/10;
 weitere Bedingungen siehe Text und Tabelle 17)

Die anderen Reagenzien zeigten unter den gegebenen Bedingungen entweder keine Reaktion oder führten zu großen Schwankungen der Basislinie, so daß eine eindeutige Peakerkennung nicht möglich war. Die Ursache für solche Schwankungen war vermutlich die geringe Löslichkeit der Substanzen in dem apolaren Eluenten (Hexan/2-Propanol 99/1).

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde daraufhin ein Nachsäulenderivatisierungsverfahren zur Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in der NP-HPLC auf der Basis von 1,5-Diphenylcarbohydrazid entwickelt. In Vorversuchen zeigte sich weiterhin, daß Reagenzienlösung und Eluent bei Verwendung von Chloroform/Eisessig als Lösungsmittel für das 1,5-Diphenylcarbohydrazid schlecht durchmischt wurden, was sich in einer stark rauschenden Basislinie äußerte. Ursache waren vermutlich die großen Dichteunterschiede zwischen dem Hexan im Eluenten und dem Chloroform in der Reagenzienlösung. Auch der Einsatz eines speziellen Mischungs-T-Stückes mit Fritte und Verwirbelungskammer brachte nur geringe Abhilfe. Um die Dichte der Reagenzlösung zu verringern, wurde deshalb nicht mit reinem Chloroform, sondern mit einem Chloroform-Hexan-Gemisch (3/1 v/v) und

Eisessig gearbeitet. Damit gelang es, Schwankungen der Basislinie weitgehend zu unterdrücken, ohne daß es zu einer Ausfällung des 1,5-Diphenylcarbohydrazids kam.

4.4.2 Optimierung des Systems

Abweichend von der oft praktizierten Verfahrensweise, bei der die zu optimierenden Parameter einzeln variiert werden und somit die Abhängigkeit der Signalstärke von jeweils nur einem Parameter betrachtet wird, wurde hier die Optimierung des Nachsäulenderivatisierungssystems in Anlehnung an ein von Arpadjan beschriebenes Verfahren¹⁴⁰ durchgeführt. Mit dieser sogenannten "linearen statistischen Optimierung" war es möglich, gleichzeitig mehrere Parameter zu variieren und somit auch Wechselwirkungen zwischen den Parametern, die zu einer Änderung des Signals führen konnten, zu berücksichtigen.

Da bei Einsatz isomerenreiner Standardsubstanzen (in diesem Fall 13S-HPOD) zur Optimierung der Detektion eine vorhergehende Trennung nicht notwendig war, wurde ebenfalls mit dem in Kapitel 6.6.2 dargestellten System ohne Trennsäule gearbeitet.

Die Vorgehensweise bei der statistischen Optimierung sei im folgenden kurz erläutert. Die mathematischen Hintergründe sind im Anhang ab Seite 156 dargestellt.

Die lineare statistische Optimierung erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde als zu optimierende Zielgröße y die Peakhöhe ausgewählt, die unter den gegebenen Bedingungen (keine Säule und damit auch nur eine sehr geringe Peakverbreiterung) der Konzentration proportional war. Im Zuge der Optimierung sollte die Peakhöhe einen möglichst großen Wert annehmen.

Im nächsten Schritt wurden sämtliche mögliche Einflußfaktoren x_u ($u = A, B, C, D, E$) auf die zu optimierende Größe (Peakhöhe) festgelegt. Wie sich aus den Vorversuchen ergab, war die Peakhöhe stark abhängig von der Konzentration des Reagenzes, der Temperatur der Reaktionskapillare und der Flußrate des Reagenzes. Ein möglicher Einfluß durch die Zusammensetzung des Reagenzienlösemittels wurde ebenfalls berücksichtigt. Da Hamm et al. in ihrem Verfahren zur photometrischen Lipidhydroperoxidbestimmung mit DPC eine Reaktionszeit von ca. 30 Minuten anführten,⁷⁸ wurde die Reaktionszeit ebenfalls als Einflußgröße auf die Peakhöhe betrachtet. Die Steuerung der Reaktionszeit erfolgte durch Variation der Länge der Reaktionskapillare. Man erhielt somit die folgenden fünf Einflußfaktoren:

Einflußfaktor	Beschreibung
x_A	Konzentration des Reagenzes
x_B	Gehalt an Essigsäure im Lösungsmittel
x_C	Länge der Reaktionskapillare
x_D	Flußrate des Reagenzes
x_E	Temperatur der Reaktionskapillare

Tabelle 18 Einflußfaktoren auf die Peakhöhe

Der Zusammenhang zwischen der Peakhöhe y und den fünf Einflußfaktoren x_A bis x_E konnte somit als Funktion $y = f(x_A, x_B, x_C, x_D, x_E)$ beschrieben werden.

Zur Optimierung wurde nun für jeden der fünf Einflußfaktoren jeweils ein Grundniveau x_u^0 festgelegt, von dem gemäß

$$x_u^+ = x_u^0 + p_u \quad x_u^- = x_u^0 - p_u \quad p_u = \text{Schrittweite}$$

Gleichung 2

jeweils eine obere und eine untere Stufe berechnet wurde. Die einzelnen Werte für die Schrittweite p_u wurden während des gesamten Optimierungsprozesses nicht geändert. Die "natürlichen Variablen" x_u^+ und x_u^- wurden dann zur Aufstellung des Versuchplanes nach

$$X_u^+ = \frac{x_u^+ - x_u^0}{p_u} = +1 \quad X_u^- = \frac{x_u^- - x_u^0}{p_u} = -1$$

Gleichung 3

in entsprechende codierte Variablen X_u^+ und X_u^- umgerechnet.

Anhand dieser codierten Variablen wurde ein Versuchsplan 1. Ordnung erstellt, in dem alle möglichen Kombinationen von X_u^+ und X_u^- aufgeführt waren. Dabei handelte es sich um sogenannte "vollständige Faktorpläne", mit denen alle Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Einflußfaktoren und deren Wirkungen auf die Zielgröße betrachtet wurden. Die Zahl der Versuche m war in diesem Fall exponentiell von der Zahl der betrachteten Parameter n gemäß $m = 2^n$ abhängig. Demnach waren zur Optimierung $2^5 = 32$ Versuche notwendig. Alternativ war auch der Einsatz sogenannter "unvollständiger Faktorpläne nach Plackett und

Burmann" möglich,¹⁴⁰ bei denen nur die Hauptwirkungen der Faktoren auf die zu optimierende Größe betrachtet wurden. Der experimentelle Aufwand wäre dann nur linear mit der Versuchsgröße angestiegen. Da durch das Weglassen der Trennsäule der zeitliche Aufwand pro Messung von ca. 25 Minuten auf 3 Minuten gesenkt werden konnte, wurde zur Optimierung mit vollständigen Faktorplänen gearbeitet.

Aus den für die unterschiedlichen Parameterkombinationen erhaltenen Meßwerten wurde ein Regressionspolynom berechnet, das die Richtung des steilsten Anstiegs auf dem Weg zur maximalen Peakhöhe lieferte. Daraus ergaben sich je nach Größe des Einflusses der einzelnen Faktoren (Tabelle 18) auf die Peakhöhe neue Startwerte $x_u^0(neu)$. Diese wurden analog Gleichung 2 und Gleichung 3 umgerechnet, woraus jeweils ein neuer Versuchsplan entstand. Die der Optimierung zugrunde liegenden Versuchspläne sind im Anhang (Kapitel 6.7.2) dargestellt.

Eine Zusammenfassung der ersten drei nach dieser Methode durchgeführten Optimierungsschritte ist in Tabelle 19 aufgeführt. Die Wirksamkeit W_u bezeichnet dabei jeweils die Stärke des Einflusses, den der entsprechende Faktor auf die zu optimierende Größe ausübt.

		Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
		c(DPC) in mg/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß in ml/min	Temperatur in °C
1. Optimierungsschritt	Nullniveau x_u^0	20	15	5	0,35	35
	Schrittweite	10	5	2	0,10	10
	Wirksamkeit W_u	55598	-27897	30409	-426	149409
	vorgeschlagene neue natürliche Koordinaten	23,72	13,13	7,04	0,33	45
2. Optimierungsschritt	Nullniveau x_u^0	25	15	7	0,35	45
	Schrittweite	10	5	2	0,10	10
	Wirksamkeit W_u	122615	-42087	71463	-1061	422063
	vorgeschlagene neue natürliche Koordinaten	27,91	14,00	8,69	0,33	55
3. Optimierungsschritt	Nullniveau x_u^0	30	15	9	0,35	55
	Schrittweite	10	5	2	0,10	10
	Wirksamkeit W_u	383218	-58864	122322	-329	829756
	vorgeschlagene neue natürliche Koordinaten	34,61	14,29	10,47	0,35	65

Tabelle 19 Zusammenfassung der Ergebnisse für die ersten drei Optimierungsschritte

Die vorgeschlagenen neuen Werte wurden für den jeweils nächsten Optimierungsschritt in der Regel auf- oder abgerundet, um die Versuchsbedingungen möglichst einfach zu halten.

Die im dritten Schritt vorgeschlagene Erhöhung der Reaktionstemperatur auf ein Grundniveau $x_E^0 = 65 \text{ °C}$ (vgl. Tabelle 19) und somit eine Messung bei $x_E^+ = 75 \text{ °C}$ erfolgte nicht mehr, da aufgrund der Siedepunkte der verwendeten Lösungsmittel die Gefahr des Ausgasens bestanden hätte [Siedepunkt(Hexan) = 69 °C ; Siedepunkt(CHCl_3) = 62 °C]. Die Temperatur wurde deshalb in den folgenden Schritten auf 65 °C eingestellt und nicht weiter optimiert. Ein Ausgasen konnte dabei durch den Einsatz des Rückdruckreglers (max. 6 bar) verhindert werden. Der Essigsäuregehalt der Reagenzienlösung wurde in den ersten drei Optimierungsstufen beibehalten, da die vorgeschlagenen neuen Werte nur zu einer Änderung des Essigsäuregehaltes um ca. 1 % geführt hätten. Um eine unnötige Peakverbreiterung auszuschließen, wurde weiterhin die maximale Länge der Reaktionskapillare zunächst auf 11 m begrenzt. Die weitere Optimierung beruhte somit nur noch auf den drei Einflußgrößen Reagenzienkonzentration, Essigsäuregehalt und Flußrate. Die Zahl der im Versuchsplan aufgeführten notwendigen Versuche sank dementsprechend auf $2^3 = 8$. Die aus diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

		Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
		c(DPC) in mg/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzienlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß in ml/min	Temperatur in °C
4. Optimierungsschritt	Nullniveau x_u^0	35	15	11	0,35	65
	Schrittweite	10	5	—	0,10	—
	Wirksamkeit W_u	306721	-115851	—	-2846	—
	vorgeschlagene neue natürliche Koordinaten	45,0	11,22	—	0,26	—
5. Optimierungsschritt	Nullniveau x_u^0	45	15	11	0,35	65
	Schrittweite	10	5	—	0,10	—
	Wirksamkeit W_u	155121	-165532	—	-3343	—
	vorgeschlagene neue natürliche Koordinaten	55,0	4,329	—	0,135	—

Tabelle 20 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Optimierungsschritte 4 und 5

Wie aus den in Tabelle 19 dargestellten Wirksamkeiten für die einzelnen Parameter hervorgeht, hatte die Flußrate der Reagenzienlösung im Vergleich zu den anderen Parametern nur einen sehr geringen Einfluß auf die Peakhöhe. Das entsprechende Nullniveau wurde deshalb im vierten Optimierungsschritt zunächst nicht geändert

Der Einfluß des Essigsäuregehaltes und der Flußrate auf die Peakhöhe wurde in den letzten beiden Optimierungsstufen bei konstanter Reaktionszeit und Reaktionstemperatur sehr groß (vgl. Wirksamkeit W_u für die einzelnen Faktoren in Tabelle 20). Die Flußrate wurde jedoch nicht weiter verringert, da bei den niedrigeren Flußraten kein ausreichender Gegendruck mehr auf die Pumpe wirkte, und somit die Pumpe nicht mehr reproduzierbar förderte. Auch die durch Einsatz des Rückdruckreglers bewirkte Druckerhöhung im System um etwa 6 bar reichte in diesem Falle nicht aus, ein reproduzierbares Fördern der Pumpe zu gewährleisten.

Der Essigsäureanteil in der Reagenzienlösung wurde ebenfalls konstant gehalten, da sich in Vorversuchen zeigte, daß die Reaktion nur in Anwesenheit einer Säure ausreichend schnell ablief. Außerdem führte eine Erniedrigung des Essigsäuregehaltes aufgrund der geringen Löslichkeit des 1,5-Diphenylcarbohydrazids in apolaren Lösungsmitteln zum Ausfallen des Reagenzes in den Kapillaren.

Die als Ergebnis des fünften Optimierungsschrittes vorgeschlagene Erhöhung der Reagenzienkonzentration konnte nicht mehr erfolgen, da es schon bei einer Konzentration von 55 mg DPC/100 ml Lösungsmittel (Hexan/ CHCl_3 /HOAc 63,75/21,25/15) zu einem teilweisen Ausfallen des Reagenzes in der Kapillare und somit zu einer Verstopfung des Systems kam. Dies zeigte sich in starken Druckschwankungen und in einem starken Rauschen der Basislinie. Durch Verringerung des Hexan-Anteils in der Reagenzienlösung hätte man dieses Problem umgehen können. Auf der anderen Seite war es jedoch zur Verringerung der Dichte notwendig, mit einem gewissen Hexan-Anteil zu arbeiten, um eine wesentlich bessere Durchmischung mit dem Eluenten zu gewährleisten (vgl. Kapitel 4.4.1).

Eine weitere Erhöhung der Signalhöhe war im Anschluß an diese Optimierungsschritte also nur noch durch eine Verlängerung der Reaktionskapillare möglich. Aus diesem Grunde wurde die bestehende Stahlkapillare von 11 m Länge und 0,25 mm Innendurchmesser (ID) gegen eine PTFE-Kapillare mit 25 m Länge und 0,3 mm Innendurchmesser ausgetauscht. Die Reaktionszeit konnte dadurch um den Faktor 3 erhöht werden. Gleichzeitig bewirkte dies eine Vergrößerung der Peakhöhe um das Zehnfache. Die durch die längere Reaktionskapillare und deren größeren Innendurchmesser bewirkte Peakverbreiterung fiel nach Einbau einer Trennsäule jedoch kaum mehr ins Gewicht (Tabelle 21).

Länge der Reaktionskapillare in m	Innendurchmesser in mm	Peakbreite auf halber Höhe in min
3	0,25	0,17 (ohne Säule)
5	0,25	0,16 (ohne Säule)
7	0,25	0,17 (ohne Säule)
9	0,25	0,17 (ohne Säule)
11	0,25	0,17 (ohne Säule)
25	0,3	0,22 (ohne Säule)
25	0,3	0,51 (mit Säule)

Tabelle 21 Breite der Peaks auf halber Höhe in Abhängigkeit von der verwendeten Reaktionskapillare (Mittelwerte aus je drei Bestimmungen)

Nach der Optimierung ergaben sich somit folgende Werte für die einzelnen Parameter:

c(DPC)	45 mg/100 ml
Reagenzienlösungsmittel	85 % CHCl ₃ /Hexan (3/1 v/v); 15 % HOAc
Reaktionskapillare	25 m PTFE-Kapillare, 0,3 mm ID
Reagenzienfluß	0,25 ml/min
Temperatur der Reaktionskapillare	65 °C

Tabelle 22 Parameter für die optimierte Nachsäulenderivatisierung mit 1,5-Diphenylcarbohydrazid

Während der Versuche zeigte sich, daß die jeweils eingesetzte Reagenzlösung gegenüber der Oxidation durch Luftsauerstoff nicht sehr stabil war. Schon nach kurzer Zeit trat, besonders nach Zugabe von Essigsäure, eine deutliche Rotfärbung der Lösung auf. Dadurch kam es zu Beginn einer Analysenreihe in der Regel zu einer Abnahme des Response. Erst nach ca. 60 Minuten lieferte das HPLC-System Peaks mit gleichbleibender Intensität (vgl. Abbildung 36). Zur quantitativen HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden mit diesem System ist es somit erforderlich, die verwendeten Lösungsmittel zur Entfernung von Sauerstoff gründlich zu entgasen und das gesamte Nachsäulenderivatisierungssystem vor Beginn einer Analyse ausreichend lange zu konditionieren.

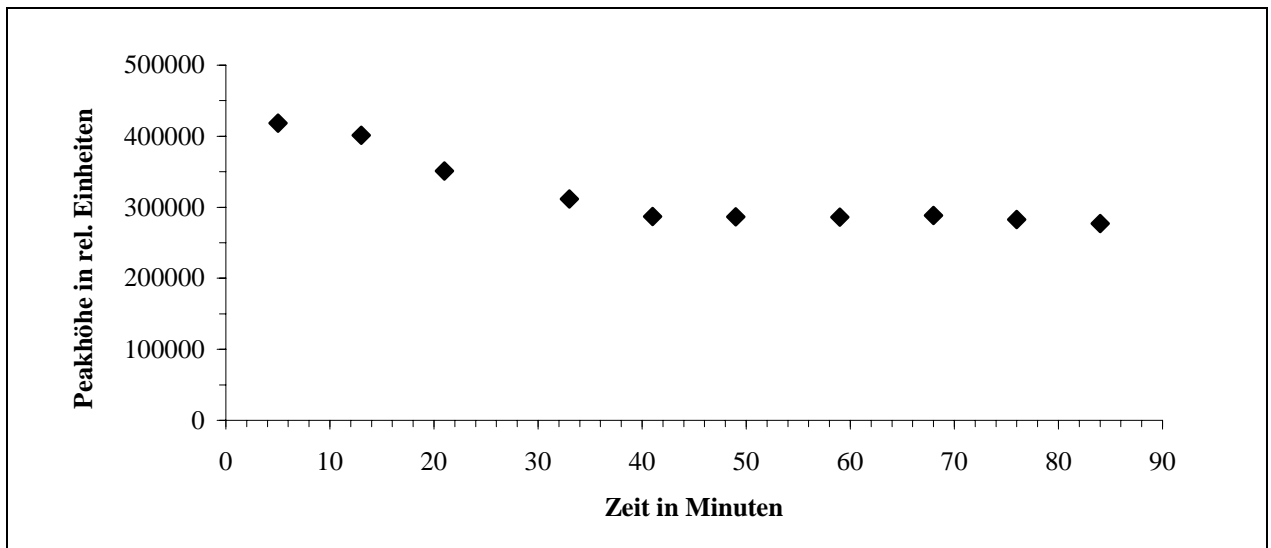


Abbildung 36 Zeitlicher Verlauf der Peakhöhen bei der mehrmaligen Injektion einer Lösung von 13S-HPOD-Me-Ester 500 $\mu\text{mol/l}$ (30 mg DPC/50 ml; 25 m PTFE-Kapillare 0,3 mm ID; 65°C)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde in das zur Optimierung genutzte HPLC-System eine Trennsäule (Superspher Si 60) eingebaut und die in Tabelle 22 aufgeführten Parameter eingestellt. Als Standard diente isomerenreiner 13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E)-diesäuremethylester. Die Auftragung der Peakflächen gegen die Konzentration ergab nur im Bereich unterhalb 250 $\mu\text{mol/l}$ einen linearen Zusammenhang. Oberhalb dieser Konzentration flachte die Kurve aufgrund von Sättigungseffekten ab (Abbildung 37).

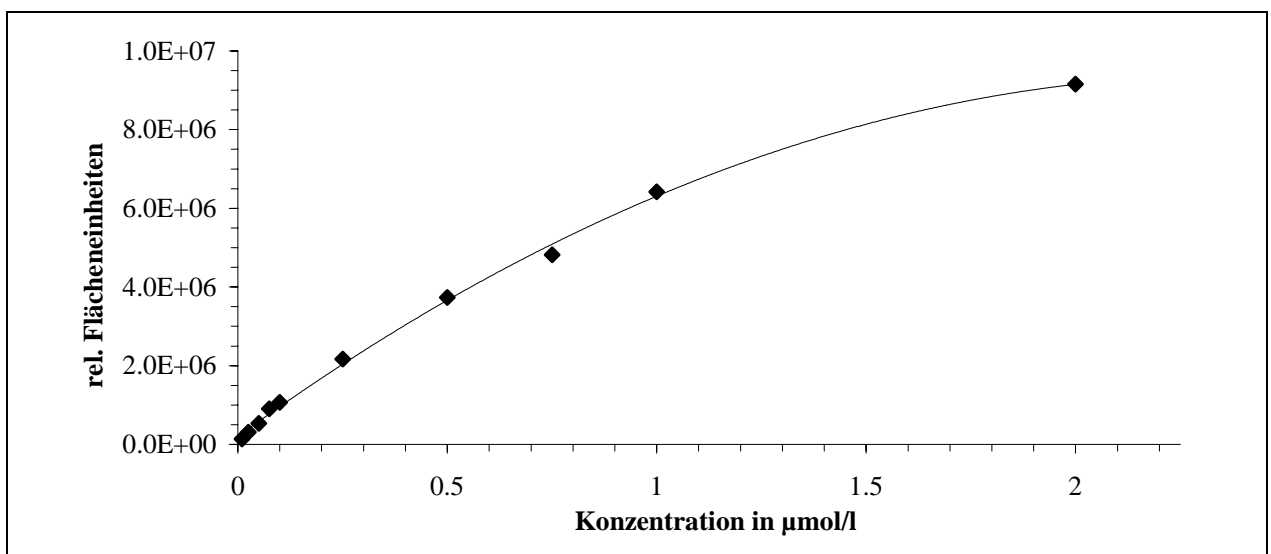


Abbildung 37 Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration bei der Nachsäulenderivatisierung mit DPC (Mittelwerte aus drei Messungen)

Für Konzentrationen kleiner 250 $\mu\text{mol/l}$ wurde die Nachweisgrenze in Anlehnung an die DIN 32645¹³⁵ bestimmt. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 20 μl . Die erhaltenen Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle aufgeführt:

Achsenabschnitt in Flächeneinheiten (FE)	Steigung in $\text{FE} \cdot \text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}$	Korrelationskoeffizient	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze	Nachweisgrenze (absolut)
102617	8815,4	0,995	16,6 $\mu\text{mol/l}$	33,1 $\mu\text{mol/l}$	33,2 pmol

Tabelle 23 Kenngrößen der Kalibriergeraden und berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von 13S-HPOD-Me-Ester bei Verwendung des optimierten DPC-Systems

Wie in Kapitel 4.3 bereits erläutert, eignet sich die NP-HPLC zur Trennung isomerer Hydroperoxyfettsäuremethylester. Um das entwickelte System mit diesen Verbindungen zu überprüfen, wurden Hydroperoxid-Gemische aus der Oxidation von Öl-, Linol- und Linolensäuremethylester mit $^1\text{O}_2$ in das Trennsystem injiziert. Der Gesamtgehalt an Hydroperoxid in der Lösung betrug jeweils 1 mmol/l. Die erhaltenen Chromatogramme sind auf Seite 80 in Abbildung 38 dargestellt. Analog zu früheren Analysen gelang auch hier keine vollständige Trennung aller Isomere.

4.4.3 Diskussion der Ergebnisse

Das hier eingesetzte Verfahren der "linearen statistischen Optimierung" erwies sich zur Optimierung des Nachsäulenderivatisierungssystems als gut geeignet. Mit Hilfe des zugrunde liegenden, allgemein gehaltenen mathematischen Modells ist auch die Optimierung anderer Prozesse durchaus möglich, zumal alle Auswirkungen auf die Ergebnisfläche, die aus der gleichzeitigen Veränderung mehrerer Parameter resultieren, berücksichtigt werden. Der benötigte Rechenaufwand kann, wie in diesem Fall geschehen, durch Einsatz eines Tabellenkalkulationsprogrammes auf ein Minimum reduziert werden.

Aufgrund der oben beschriebenen experimentellen Einschränkungen (Temperatur, Löslichkeit des Reagenzes) gelang es im Laufe der Optimierung jedoch nicht, das Maximum der Ergebnisfläche genau zu treffen. Wie aus den im Anhang (Kapitel 6.7.3, Seite 164 ff.) aufgeführten

Werten für das jeweilige Bestimmtheitsmaß der einzelnen Schritte hervorgeht, war zur Beschreibung der Ergebnisfläche die Annahme eines Polynoms 1. Ordnung angebracht. Gleichzeitig deutete aber die Abnahme des Bestimmtheitsmaßes in den letzten beiden Optimierungsschritten die Nähe des Maximums an. Zur Findung des Maximums hätte dann in weiteren Schritten ein Polynom 2. Grades zugrunde gelegt und die Schrittweiten der einzelnen Faktoren verkleinert werden müssen. Dadurch wäre es allerdings nur noch zu sehr kleinen Änderungen der Parameter gekommen, deren Realisierung nicht immer möglich war. Auf eine weitergehende Optimierung wurde deshalb verzichtet.

Trotz dieser Näherungen wurde im Zuge des Optimierungsprozesses die Empfindlichkeit des Systems um den Faktor 200 gesteigert. Die letztendlich bestimmte Nachweisgrenze von ca. 16 $\mu\text{mol/l}$ lag allerdings wesentlich höher als die, die Akasaka et al.^{101,102} für die Nachsäulenderivatisierung mit Diphenylpyrenylphosphin angab (vgl. Kapitel 3.3.2.1). Der Einsatz von 1,5-Diphenylcarbohydrazid bietet demgegenüber jedoch den großen Vorteil, daß das Reagenz leicht verfügbar ist und nicht vorher synthetisiert werden muß.

Wie aus der NP-HPLC-Bestimmung der isomeren Hydroperoxyfettsäuremethylester hervorgeht (Abbildung 38), ist das System zur selektiven Bestimmung solcher Verbindungen durchaus geeignet. Eine Limitierung ist dabei weniger durch die etwas geringere Empfindlichkeit der Nachsäulenderivatisierung gegeben, als vielmehr durch die Trennleistung des Systems. Der Einfluß der eingesetzten langen Reaktionskapillare auf die Peakverbreiterung und somit auf die Trennleistung scheint dagegen nur von geringer Bedeutung zu sein. Im Vergleich zu der in der NP-HPLC fast ausschließlich eingesetzten UV-Detektion erlaubt dieses Verfahren somit eine selektive Bestimmung von Lipidhydroperoxiden, wenn auch die Empfindlichkeit im Vergleich zur UV-Detektion (NWG ca. 2 $\mu\text{mol/l}$) etwas geringer ist.

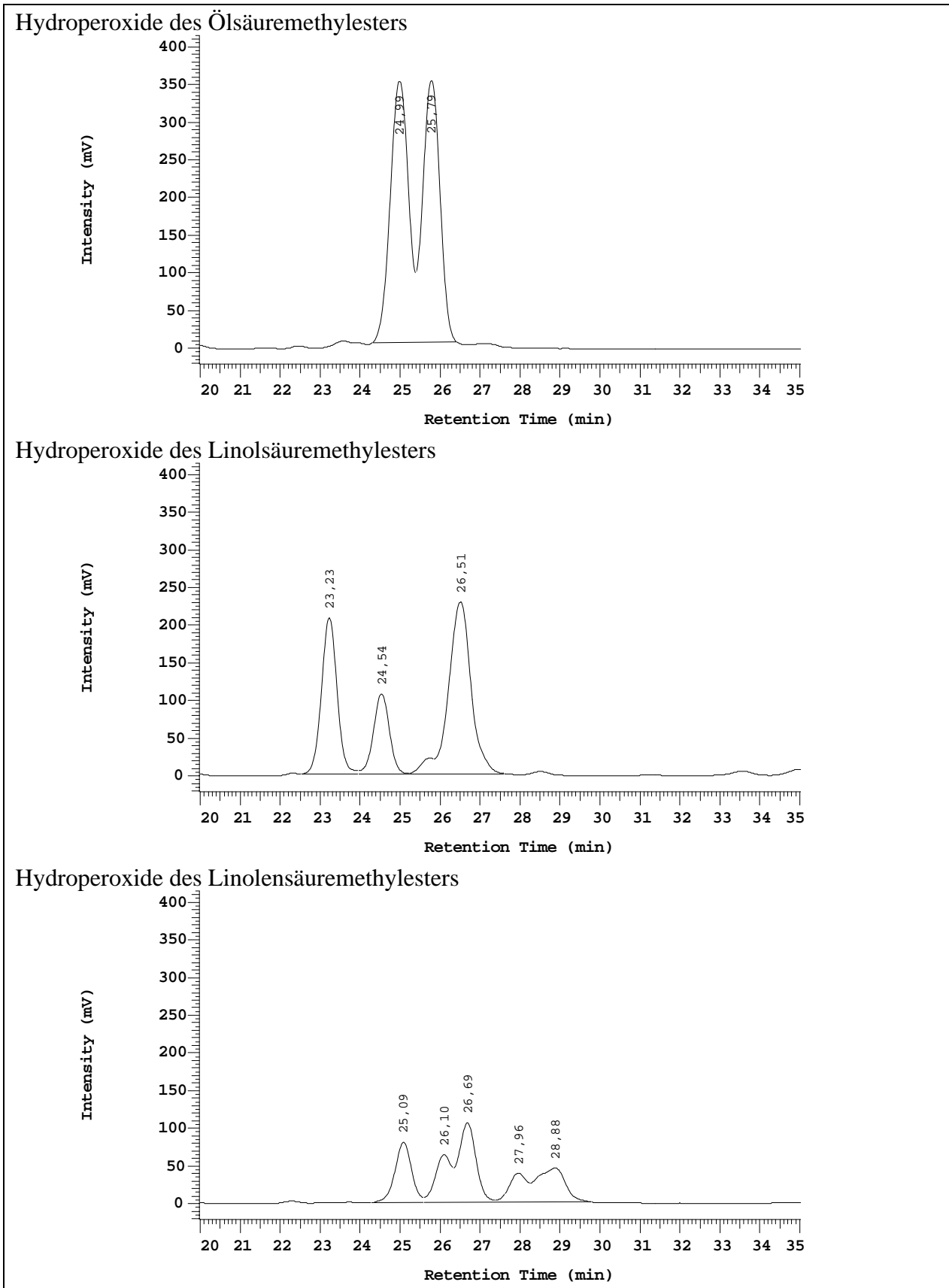


Abbildung 38 Analyse verschiedener Hydroperoxide aus der Oxidation von Fettsäuremethylestern mit Singulett-Sauerstoff (Säule: Superspher Si 60; 250-4; Eluent: Hexan/2-Propanol 99/1; Detektionsbedingungen siehe Tabelle 22)

4.5 Entwicklung eines Enzymreaktors zur Detektion von Lipidhydroperoxiden in der HPLC

Das von Heinmöller¹¹ optimierte System zur enzymatischen Nachsäulenderivatisierung von Lipidhydroperoxiden mittels 4-Hydroxyphenylessigsäure (PES) und Mikroperoxidase-11 (MP-11) hat den großen Nachteil, daß es aufgrund des Verbrauches von MP-11 sehr kostenintensiv ist. So beträgt der durchschnittliche Preis für 250 mg Mikroperoxidase etwa 2000,- DM. Zur Lösung dieses Problems gab es mehrere mögliche Ansatzpunkte, die in nachstehender Tabelle aufgeführt sind:

Ansatzpunkt	Vorteile	Nachteile
Einsatz eines anderen, preiswerteren Enzyms	- geringere Kosten	- Methode muß neu entwickelt werden - ggf. geringere Selektivität gegenüber Lipidhydroperoxiden - ggf. geringere Empfindlichkeit
Einsatz anderer, nicht-enzymatischer Methoden	- geringere Kosten - relativ große Auswahl an Reaktionssystemen, damit auch leichte Anpassung an unterschiedlichste Trennprobleme (RP-HPLC/NP-HPLC)	- Methode muß neu entwickelt werden - ggf. geringere Selektivität gegenüber Lipidhydroperoxiden - ggf. geringere Empfindlichkeit
Immobilisierung von Mikroperoxidase an Trägermaterialien	- Einsparung von MP-11, selbst bei relativ kurzer Standzeit des Reaktors - System kann ohne größere Änderungen übernommen werden - Selektivität sollte erhalten bleiben	- ggf. geringere Empfindlichkeit

Tabelle 24 Vor- und Nachteile verschiedener Lösungsansätze zur Minimierung der Betriebskosten bei der MP-11/PES-Nachsäulenderivatisierung

Um nicht auf die Vorteile des bestehenden Trennsystems zu verzichten und trotzdem die laufenden Kosten wesentlich zu senken, bot es sich demnach an, die Mikroperoxidase zu immobilisieren. Die grundsätzliche Eignung eines solchen Systems zur Nachsäulenderivatisierung in der HPLC wurde u.a. von Kurth für das System Meerrettichperoxidase/4-Hydroxyphenylessigsäure beschrieben.^{109,141}

4.5.1 Allgemeines zur Immobilisierung von Enzymen

Als Immobilisierung bezeichnet man verschiedene Verfahren, die zur Fixierung von biologischem Material, insbesondere von Enzymen, an bestimmten Trägern dienen. Dabei erfolgt die Bindung des Enzyms in der Weise, daß die dreidimensionale Struktur am aktiven Zentrum des Moleküls und damit die katalytische Aktivität nicht verändert werden.¹ Zur Immobilisierung gibt es drei unterschiedliche Konzepte.¹⁴²⁻¹⁴⁴

trägergebundene Enzyme	Anbindung des Enzyms u.a. durch <ul style="list-style-type: none"> - kovalente Bindungen - physikalische Adsorption (H-Brücken, van der Waals-Kräfte) - elektrostatische Kräfte (Ionenbindung)
Quervernetzung von Enzymen	Einsatz bi- oder multifunktionaler Reagenzien, kein Trägermaterial notwendig
Einschluß von Enzymen	Gel-Matrix Mikroverkapselung Hohlfasern Liposomen

Tabelle 25 Konzepte zur Enzymimmobilisierung¹⁴²⁻¹⁴⁴

Das gebräuchlichste Verfahren ist die kovalente Bindung des Enzyms an ein geeignetes Trägermaterial. Gerade in Fließsystemen ist eine Anbindung durch eine physikalische Adsorption oder über eine Ionenbindung jedoch nicht möglich, da die Enzyme dabei nur relativ schwach gebunden sind und somit leicht vom Trägermaterial heruntergewaschen werden können. Zudem sind solche Bindungen sehr anfällig gegenüber Veränderungen der Temperatur, der Ionenstärke oder des Lösungsmittels.

Als Trägermaterialien kommen sowohl natürliche Polymere (Polysaccharide, Cellulose) als auch synthetische Polymere (Polystyrol, Polyacrylate etc.) zum Einsatz. Aufgrund der vergleichsweise geringen mechanischen und chemischen Stabilität sind diese Materialien zum Einsatz in HPLC-Systemen allerdings weniger geeignet. Hier werden besonders sogenannte CPG-Beads (mikroporöse Glaskugeln; CPG = controlled pore glass) eingesetzt. Diese besitzen an der Oberfläche eine Vielzahl von OH-Gruppen, die sich direkt oder nach einer Derivatisierung zur kovalenten Anbindung eines Enzyms eignen. Eine kovalente Bindung kann

jedoch nur dann erfolgen, wenn auch das Enzym über entsprechende funktionelle Gruppen verfügt. Die Auswahl solcher Gruppen beschränkt sich bei Enzymen in der Regel auf Amino-, Thiol-, Hydroxy- oder Carboxylgruppen. Je nach Art der Derivatisierung kann es zu verschiedenen Bindungen zwischen Enzym und Träger kommen (Tabelle 26).

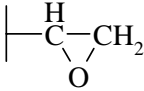
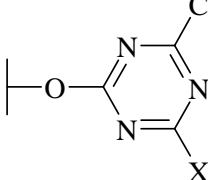
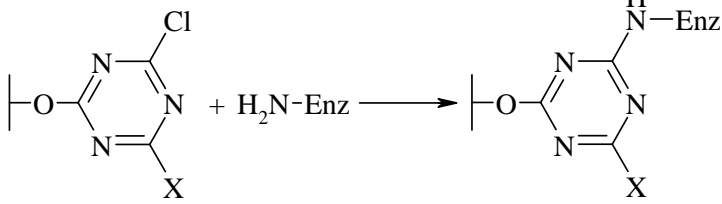
funktionelle Gruppe am Träger	funktionelle Gruppe am Enzym	Art der Bindung
—NH_2	Enz—COOH	Peptid- bzw. Amidbindung in Gegenwart von Kondensierungsreagenzien
—NH_2	Enz—NH ₂	Peptid- bzw. Amidbindung in Gegenwart von Kondensierungsreagenzien und Dicarbonsäuren
	Enz—NH ₂ Enz—OH Enz—SH	Alkylierung, z.B: $\text{—C} \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array} \text{—CH}_2 + \text{H}_2\text{N—Enz} \longrightarrow \text{—CH} \begin{array}{l} \text{H} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{—CH}_2 \text{—N—Enz}$
—CHO	Enz—NH ₂	Bildung von Schiff'schen Basen: $\text{—CHO} + \text{H}_2\text{N—Enz} \longrightarrow \text{—C} \begin{array}{l} \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} \text{=N—Enz}$
 X = Cl, NH ₂ etc.	Enz—NH ₂	Arylierung, z.B:  X = Cl, NH ₂ etc.

Tabelle 26 Beispiele für funktionelle Gruppen an Trägermaterialien und an Enzymen, die zur Immobilisierung genutzt werden können^{143,144}

Einen guten Überblick über die verschiedenen Techniken zur Immobilisierung von Enzymen geben Scouten et al.^{145,146}

Im Falle der in dieser Arbeit eingesetzten Mikroperoxidase-11 (Abbildung 39) standen als funktionelle Gruppen vier Carboxylgruppen (zwei am Hämingerüst und zwei an der Glutaminsäure) und zwei Aminogruppen (je eine an Valin und an Lysin) zur Verfügung.

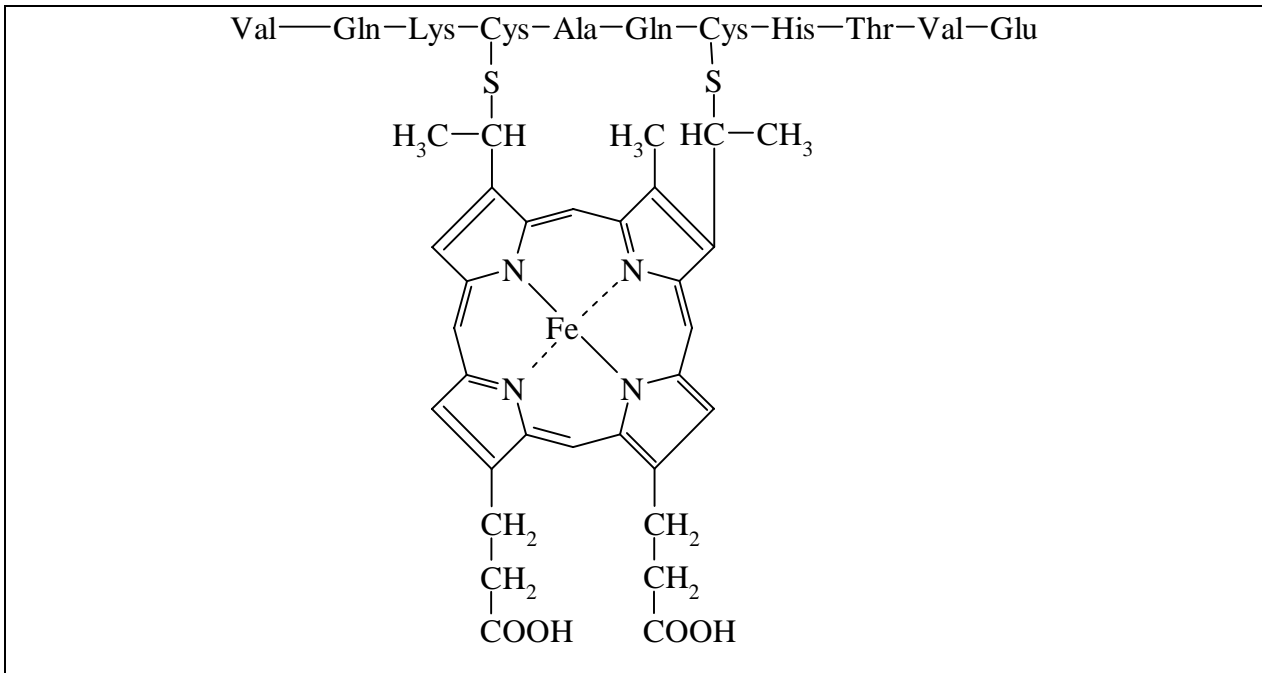


Abbildung 39 Strukturformel von Mikroperoxidase-11 (MP-11)

4.5.2 Bisherige Arbeiten zur Immobilisierung von Mikroperoxidase-11

Obwohl das Häminundecapeptid Mikroperoxidase-11 schon länger zum Nachweis von Hydroperoxiden eingesetzt wird, gibt es erst sehr wenige Arbeiten zu dessen Immobilisierung. So beschrieben Wadano et al. die Anbindung von MP-11 an Gele und den anschließenden Einsatz des so immobilisierten Enzyms zur Bestimmung von tert. Butylhydroperoxid und 13S-HPOD mittels Chemilumineszenz in einem Fließinjektionssystem.¹⁴⁷ Die damit erreichte Nachweisgrenze lag bei etwa 20 µmol/l. Jacob versuchte die Anbindung von MP-11 sowohl über die Amin- als auch über die Carboxylgruppen des Enzyms an aminopropyl-derivatisierte CPG-Beads mit Hilfe von Glutaraldehyd als Spacer.¹⁴⁸ Die daraus resultierende größere Beweglichkeit des Enzyms sollte in Analogie zu Hartmeier zu einer Erhöhung der Enzymaktivität führen.¹⁴⁹ Mikroperoxidase wurde mit diesem Verfahren zwar kovalent gebunden,

die postulierte Aktivitätssteigerung konnte von Jacob hingegen nicht beobachtet werden. Vielmehr zeigten entsprechende Versuche eine starke Abnahme der katalytischen Aktivität. Zur Entwicklung reagenzienloser amperometrischer Biosensoren immobilisierten Lötzbeyer und Schuhmann Mikroperoxidase an modifizierten Goldoberflächen.^{150,151} Die Anbindung des Enzyms erfolgte dabei über die Carboxylgruppen der Mikroperoxidase direkt an die Oberfläche ohne Verwendung eines Spacers. Die katalytische Aktivität blieb unter diesen Bedingungen erhalten.

4.5.3 Vorversuche

Die von Lötzbeyer und Schuhmann beschriebene Methode schien bei Einsatz entsprechend derivatisierter Beads aufgrund ihrer Einfachheit zur Immobilisierung von Mikroperoxidase gut geeignet zu sein. Dieses Konzept wurde deshalb weiter verfolgt.

Für die Immobilisierung von Enzymen über deren Carboxylgruppen lassen sich Trägermaterialien einsetzen, die über freie Aminogruppen verfügen. In der Regel werden diese durch Umsetzung nativer CPG-Beads (mit freien OH-Gruppen) mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin hergestellt. Da schon entsprechend derivatisierte Aminopropyl-CPG-Beads zur Verfügung standen, wurde eine derartige Derivatisierung hier nicht durchgeführt. Die physikalischen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Beads sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

Bezeichnung	Bead Durchmesser	Porengröße	spezifische Oberfläche	Porenvolumen
50/63,2	50-100 µm	63,2 nm	58,48 m ² /g	1098,39 mm ³ /g
50/78,8	50-100 µm	78,8 nm	42,02 m ² /g	1014,13 mm ³ /g
50/99,8	50-100 µm	99,8 nm	36,97 m ² /g	1100,57 mm ³ /g
50/125	50-100 µm	125 nm	27,49 m ² /g	1004,55 mm ³ /g

Tabelle 27 *Physikalische Eigenschaften der verwendeten Aminopropyl-Beads*

Um die grundsätzliche Eignung dieser CPG-Beads zur Immobilisierung zu testen, wurde in einem Vorversuch zunächst die im Vergleich zu Mikroperoxidase wesentlich kostengünstigere Glucoseoxidase (GOD) immobilisiert.

Dazu wurden 20 mg Glucoseoxidase in 5 ml 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer (10 mmol/l; pH 7,8) gelöst und diese Lösung zu 100 mg Amino-propyl-CPG-Beads (50/63,2) gegeben. Die Immobilisierung wurde durch Zugabe von 20 mg 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde während der fünf Stunden andauernden Reaktion durch Überleiten eines schwachen Stickstoffstromes ständig in Bewegung gehalten und durchmischt. Eine mechanische Belastung der Beads, wie sie z. B. bei Einsatz eines Magnetrührers hätte auftreten können, konnte auf diese Weise vermieden werden. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Beads abfiltriert und gründlich mit ca. 25 ml Wasser gewaschen. In nachstehender Abbildung ist der allgemeine Reaktionsverlauf der hier eingesetzten Methode zur Enzymimmobilisierung wiedergegeben.

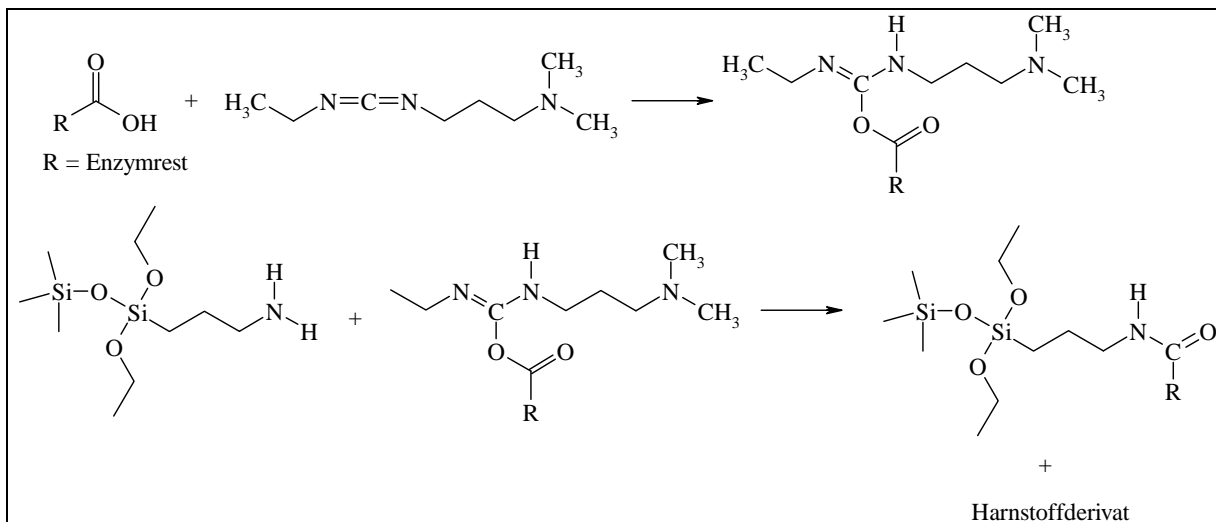


Abbildung 40 Reaktionsverlauf der Immobilisierung von Enzymen mit EDAC an Amino-propyl-CPG-Beads

Mit den gewaschenen Beads wurde ein Stahlreaktor (Chromatographie-Leersäule 20-4,6; 20 mm Länge; 4,6 mm Innendurchmesser, vgl. Tabelle 29) gefüllt. Um die Aktivität und somit eine erfolgreiche Immobilisierung nachzuweisen, wurde der Reaktor in der Weise in eine HPLC-Anlage eingebaut, daß eine entsprechende Reagenz bzw. die Testlösung im Kreis gefördert werden konnte (vgl. Kapitel 6.6.4). Der Nachweis der Aktivität des immobilisierten Enzyms erfolgte nach Schuhmann¹⁵¹ durch Zusatz von Glucose zu der Testlösung. Im Falle von immobilisierter Glucoseoxidase wird dabei Glucose zu Wasserstoffperoxid umgesetzt. Dieses bildet dann in einer zweiten enzymkatalysierten Reaktion (Meerrettichperoxidase,

4-Aminoantipyrin, Phenol) einen roten Farbstoff mit einem Extinktionsmaximum bei 492 nm (Abbildung 41). Diese Reaktion wurde erstmals von Gallati zur Aktivitätsbestimmung von Peroxidase vorgeschlagen.¹⁵² Akaza und Aota verwendeten eine abgewandelte Form dieser Reaktion zur Bestimmung von Lipidhydroperoxiden,¹⁵³ bei der N,N-Diethylanilin anstelle des Phenols eingesetzt wurde.

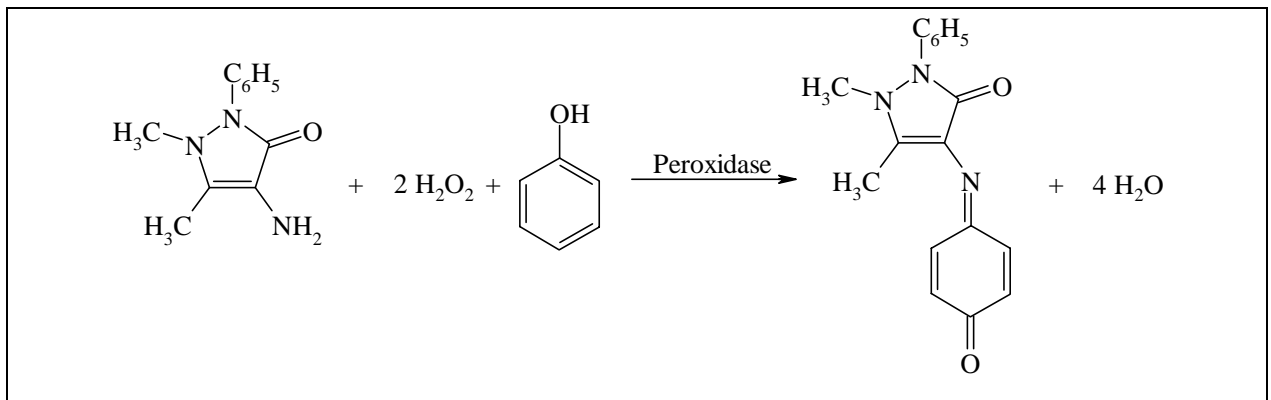


Abbildung 41 Nachweis von Hydroperoxiden durch enzymkatalysierte Kupplung von 4-Aminoantipyrin mit Phenol

Zur Aktivitätsbestimmung wurden nach Schuhmann¹⁵¹ zunächst zwei Reagenzienlösungen angesetzt, die erst unmittelbar vor der Messung miteinander gemischt wurden. Lösung 1 enthielt 140 mg (1,49 mmol) Phenol und 250 mg (0,81 mmol) 4-Aminoantipyrin gelöst in 50 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 7). Für die Lösung 2 wurden 90 mg (0,50 mmol) Glucose und 6 mg Meerrettichperoxidase (HRP) in 50 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 7) gelöst. Zur Messung wurden die Lösungen jeweils im Verhältnis 1:20 verdünnt. Nach gründlichem Spülen des HPLC-Systems mit der verdünnten Lösung 1 wurde 1 ml der verdünnten Glucose/HRP-Lösung (Lösung 2) zugesetzt. Der Umsatz der zugesetzten Glucose zu Wasserstoffperoxid konnte durch den zeitlichen Verlauf der Extinktion bei 492 nm verfolgt werden (Abbildung 42). Ohne Enzymreaktor war ein solcher Anstieg der Extinktion nicht zu beobachten.

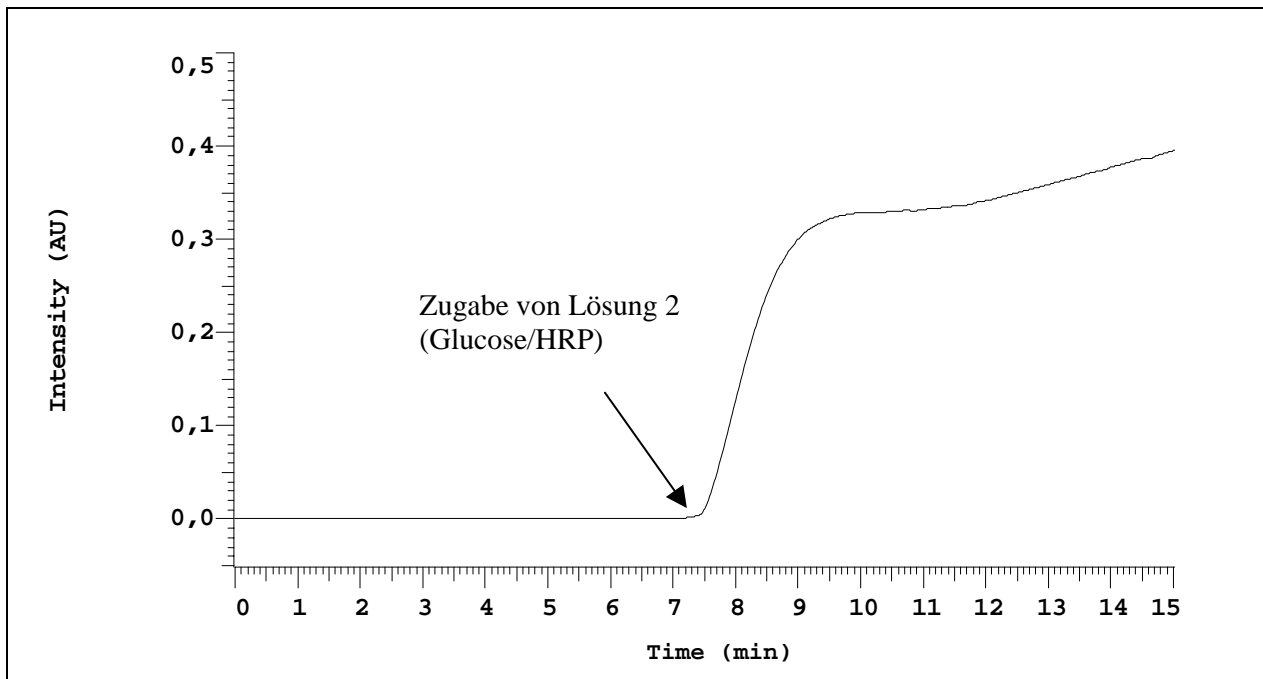


Abbildung 42 Nachweis der Aktivität immobilisierter Glucoseoxidase (Erklärung siehe Text)

Da die Ausgangslösungen mit tridestilliertem Wasser angesetzt wurden und somit frei von Hydroperoxiden waren, kann der deutlich erkennbare Extinktionsanstieg nach Zugabe der Glucose nur auf der Umsetzung von Glucose mit Glucoseoxidase beruhen. Die eingesetzten Aminopropyl-CPG-Beads schienen damit zur Immobilisierung von Enzymen geeignet.

4.5.4 Immobilisierung von Mikroperoxidase-11

Aufgrund der positiven Ergebnisse der Vorversuche wurde nun in weiteren Versuchen Mikroperoxidase-11 (MP-11) eingesetzt. Die Immobilisierung sollte nach dem gleichen Prinzip wie bei der Glucoseoxidase erfolgen (kovalente Bindung zwischen den Carboxylgruppen des Enzyms und den Aminofunktionen des Trägers). Um eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Beschaffenheit des verwendeten Trägers festzustellen, wurde Mikroperoxidase auf allen vier zur Verfügung stehenden Beadsorten (vgl. Tabelle 27) immobilisiert. Dazu wurden in einem Spitzkolben jeweils 300 mg Aminopropyl-CPG-Beads vorgelegt und eine Lösung von ca. 10 mg MP-11 in 5 ml HEPES-Puffer (10 mmol/l; pH 7,8) hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden dem Reaktionsansatz 25 mg EDAC zugefügt. Analog zur Immobilisierung von Glucoseoxidase wurde auch hier ein leichter Stickstoffstrom

über den Reaktionsansatz geleitet. Nach vier Stunden Reaktionszeit wurden die nunmehr tiefrot gefärbten Beads abfiltriert und mit 25 ml tridestilliertem Wasser gewaschen. Die Beads wurden unter Wasser bei 4 °C gelagert. Da das Filtrat noch eine deutlich rote Färbung aufwies, wurde davon ausgegangen, daß die unter den gegebenen Bedingungen maximal mögliche Menge an Mikroperoxidase an den Beads immobilisiert worden war.

4.5.5 Bestimmung der Trägerbelegung

Um eine genaue Aussage über den Erfolg der Immobilisierung bei den einzelnen Beadsorten zu treffen, war es notwendig, die Menge des jeweils gebundenen Enzyms zu bestimmen. In der Literatur werden dazu verschiedene Verfahren vorgeschlagen. Die einfachste Methode ist die Differenzbildung aus eingesetzter und nach der Immobilisierung in Reagenzlösung und Waschflüssigkeiten vorliegender Enzymmenge.¹⁵⁴ Die Bestimmung des Enzymgehaltes in den Lösungen kann dabei auf unterschiedliche Weise erfolgen. So bestimmte Jacob den Enzymgehalt bei der Immobilisierung von Mikroperoxidase, Katalase und Meerrettichperoxidase über die atomabsorptionsspektrometrische Messung des Eisengehaltes der jeweiligen Lösung.¹⁴⁸ Gabel und Axén nutzten verschiedene titrimetrische und photometrische Methoden, bei denen ein Reagenz mit charakteristischen Gruppen des Enzyms (in der Regel Carboxyl-, Carbonyl-, Amino- oder Thiol-Gruppen) zu einer gefärbten Verbindung oder einem farbigen Komplex reagierte.¹⁵⁵ Aus der Intensität der Färbung konnte dann der Enzymgehalt berechnet werden. Auch die elementaranalytische Untersuchung des Immobilisates ist bei genau bekannter Zusammensetzung des Enzyms möglich. Allerdings sind die daraus erhaltenen Werte in der Regel mit großen Fehlern behaftet, da der C-, H- und N-Gehalt der mit dem Enzym belegten Beads im Verhältnis zur Gesamtmasse sehr klein ist, und somit eine Bestimmung im untersten Meßbereich erfolgt.¹⁴⁸

Da jeweils nur geringe Mengen mit MP-11 belegter Beads zur Verfügung standen, und die elementaranalytische Bestimmung stark fehlerbehaftet schien, wurden die Enzymgehalte der in Kapitel 4.5.4 hergestellten Enzymimmobilisate mittels AAS über die Eisenkonzentration bestimmt. Dazu wurde zunächst die oben genannte "Differenz"-Methode eingesetzt. Um Matrixeinflüsse auszuschließen, wurde mit der Standardadditionsmethode gearbeitet (vgl. Kapitel 6.8). Zur Überprüfung der so erhaltenen Werte wurde im Anschluß an die Immobilisierung jeweils eine geringe Menge der Beads mehrere Tage bei 120 °C getrocknet

und anschließend mit konz. Salpetersäure aufgeschlossen. Nach mehrtägiger Reaktionszeit wurde der Eisengehalt der überstehenden Flüssigkeit ebenfalls mittels AAS bestimmt. Die Messungen dazu erfolgten am Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie in Dortmund. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

Beadsorte	Trägerbelegung (Differenzmethode) in mg MP-11/100 mg CPG	Trägerbelegung (Aufschlußmethode) in mg MP-11/100 mg CPG
50/63,2	2,88	2,34
50/78,8	3,22	2,19
50/99,8	3,10	2,30
50/125	2,99	1,97

Tabelle 28 Ermittelte Belegungen von Aminopropyl-CPG-Beads mit Mikroperoxidase-11 (AAS-Messungen)

Wie aus der Tabelle hervorgeht, lieferten beide Bestimmungsmethoden ähnliche Ergebnisse. Die durch Differenzmessungen bestimmten Trägerbelegungen lagen jedoch etwas über den Werten, die durch den Aufschluß der Beads erhalten wurden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Messung des Eisengehaltes in der Reaktionslösung nach der Immobilisierung ohne Standardaddition im unteren Meßbereich des Atomabsorptionsspektrometers erfolgte. Die mit der Standardadditionsmethode erhaltenen Werte (Spalte 2 in Tabelle 28) wiesen deshalb eine relativ große Unsicherheit auf. Darüberhinaus ist es auch möglich, daß nach der Reaktion ein Teil der Mikroperoxidase nur adsorptiv gebunden war und somit eine höhere Trägerbelegung vorgetäuscht wurde. Auf der anderen Seite konnte es aufgrund der Lagerungsbedingungen in der Zeit zwischen der Immobilisierung und dem Aufschluß der Beads zu einem Auswaschen von Eisen kommen. Die über den Aufschluß mit Salpetersäure bestimmten Werte für die Trägerbelegung wären demnach als zu niedrig anzusehen. Da die Farbe der Beads sich jedoch auch nach längerer Lagerung nicht änderte, und auch keine Braunfärbung der überstehenden Flüssigkeit festgestellt wurde, dürfte der aus der Auswaschung von Eisen resultierende Fehler sehr gering sein. Insgesamt liegen die erhaltenen Werte wesentlich über denen, die Jacob für die Immobilisierung von Mikroperoxidase auf Beads einer Größe von 120-200 mesh (74-125 µm) und 140 nm Porengröße angab.¹⁴⁸ Mit einer Belegung von etwa 0,09 mg MP-11/100 mg CPG sind die dort angegebenen Werte um den Faktor 25 geringer. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Beadsorte bzw. der spezifischen Oberfläche (Tabelle 27) und der Menge der immobilisierten Mikroperoxidase konnte nicht festgestellt werden.

4.5.6 Packen der MP-11-Reaktoren

Zum Einsatz der immobilisierten Mikroperoxidase in der HPLC müssen die Beads in Reaktoren gepackt werden. Dafür haben sich besonders sogenannte Festbettreaktoren bewährt, bei denen die Feststoffteilchen während der Durchströmung ruhen. In diesen Reaktoren ist das Enzymimmobilisat am dichtesten gepackt, so daß eine Peakverbreiterung möglichst minimiert wird. Weiterhin wird bei Reaktoren dieser Art bezogen auf das Reaktorvolumen der größte Stoffumsatz pro Zeiteinheit erzielt. In dieser Arbeit wurden kurze Chromatographie-Leersäulen aus Edelstahl als Reaktoren verwendet. Sie haben den Vorteil, daß sie chemisch inert sind, aufgrund ihrer Endverschraubungen leicht in HPLC-Systeme eingebaut werden können und mehrfach verwendbar sind. Die Abmessungen der eingesetzten Reaktoren sind in Tabelle 29 zusammengefaßt. Die effektive Länge ist dabei die Länge des für die Füllung zur Verfügung stehenden Säuleninnenraumes.

Reaktor	Gesamtlänge	effektive Länge	Innendurchmesser	Reaktorvolumen
20-4	20 mm	13 mm	4 mm	163,1 mm ³
20-4,6	20 mm	13 mm	4,6 mm	216,0 mm ³

Tabelle 29 Abmessungen der verwendeten Reaktoren

Das Füllen von Chromatographiesäulen erfolgt bei Materialien mit einem Durchmesser von mehr als 20 µm in der Regel mit trockenen Sorbentien bzw. Füllmaterial.¹⁵⁶ Da die in dieser Arbeit hergestellten Enzymimmobilisate unter Pufferlösung bzw. unter Wasser gelagert wurden, und um eine mögliche Inaktivierung der Mikroperoxidase durch Trocknen der Beads zu vermeiden, konnte die Methodik des Trockenfüllens der Reaktoren hier nicht eingesetzt werden. Auf der anderen Seite erwies sich das Füllen nach der Suspensions-Technik (slurry-Technik) als sehr schwierig, da sich die Teilchen aufgrund ihrer Größe zu schnell absetzten. Auf den Einsatz organischer Lösungsmittel mit hoher Dichte, die das Immobilisat in Suspension zu halten vermochten, wurde verzichtet, um eine mögliche Inaktivierung der Mikroperoxidase zu vermeiden.

Das Füllen erfolgte somit mit einer Kombination beider Techniken:

Der Reaktor wurde mit einer Suspension des Enzymimmobilisates gefüllt. Anschließend wurde ein erhöhter Stickstoffstrom durch den Reaktor geleitet, wobei sich das Immobilisat absetzte, und die Flüssigkeit aus dem Reaktor getrieben wurde. Es wurde jeweils darauf geachtet, daß die Beads nicht austrockneten und immer eine geringe Restfeuchte vorhanden war. Im nächsten Schritt wurde der Reaktor verschlossen und mit 10-20 ml HEPES-Puffer (10 mmol/l; pH 7,8) bei einer Flußrate von 10 ml/min gespült. Nach erneutem Austreiben der Flüssigkeit mit Stickstoff wurde der Reaktor wieder geöffnet und gegebenenfalls weiteres Enzymimmobilisat zugegeben, so daß der Reaktorinnenraum vollständig gefüllt war. Nach nochmaligem Durchleiten von Stickstoff wurde der Reaktor wieder verschlossen und in die HPLC eingebaut bzw. bei 4 °C gelagert.

Zur Überprüfung des Einflusses der Füllmethode auf die Peakverbreiterung in der HPLC wurde ein weiterer Reaktor nach der klassischen Suspensionstechnik gefüllt. Dazu wurde ein Füllrohr über ein entsprechendes Adapterstück mit Doppelgewinde mit dem zu füllenden Reaktor verbunden. Das Füllrohr wurde mit einer Suspension des Enzymimmobilisates gefüllt und verschlossen. Anschließend wurde mit einer Pumpe HEPES-Puffer (10 mmol/l; pH 7,8) durch Füllrohr und Reaktor geleitet. Dabei wurde die Flußrate schrittweise von 1 ml/min auf 35 ml/min (7 bar) erhöht. Der Reaktor wurde etwa eine Minute bei einem Druck von 7 bar gepackt, das Füllrohr wurde abgenommen und der Reaktor fest verschlossen. Der Einfluß der Füllmethode auf die Peakverbreiterung ist in Kapitel 4.5.8 erläutert.

4.5.7 Bestimmung der MP-11-Aktivität

In der Literatur existieren zur Bestimmung der Aktivität immobilisierter Enzyme eine Reihe mehr oder weniger aufwendiger und komplizierter Vorschriften, mit denen absolute Werte der Aktivität berechnet werden können. Man bedient sich dabei in der Regel photometrischer Methoden, bei denen die Umsetzung eines Substrates durch das immobilisierte Enzym zu einer Änderung der Färbung führt. Die Aktivität kann dann bei bekanntem Extinktionskoeffizienten ϵ aus der zeitlichen Änderung der Extinktion ΔE berechnet werden. Nach Gleichung 4 ist die zeitliche Änderung der Extinktion der Aktivität proportional.¹⁵⁷

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot \Delta t}$$

Gleichung 4

(Δc = Konzentrationsänderung in mol; Δt = Beobachtungszeitraum in min; ΔE = Extinktionsänderung; d = Schichtdicke in cm; V = Gesamtvolumen in l; v = Probevolumen in l; ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;))

Um eine Aussage über den Einfluß der in dieser Arbeit eingesetzten verschiedenen Beadsorten auf die Aktivität der immobilisierten Mikroperoxidase zu treffen, wurde das bei der Aktivitätsbestimmung von immobilisierter Glucoseoxidase verwendete HPLC-System (vgl. Kapitel 6.6.4) und auch die dort genutzte Reaktion zur Hydroperoxidbestimmung mit 4-Aminoantipyrin (vgl. Abbildung 41) erneut eingesetzt. Die Anwesenheit von Glucose und Meerrettichperoxidase war in diesem Falle jedoch nicht nötig. Es wurde deshalb nur mit der oben beschriebenen Lösung 1 (0,14 g Phenol und 0,25 g 4-Aminoantipyrin in 50 ml 10 mmol/l Phosphatpuffer pH 7) gearbeitet. Zur Messung wurde diese Lösung mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1:20 verdünnt. Die HPLC-Anlage wurde vor jeder Meßreihe gründlich mit verdünnter Reagenzlösung bei einer Flußrate von 1 ml/min gespült. Das Gesamtreaktionsvolumen in dem modifizierten HPLC-System betrug bei jeder Messung 100 ml. Nacheinander wurden mehrfach in kurzen Zeitabständen jeweils 100 µl einer Wasserstoffperoxid-Lösung (10 mmol/l) hinzugegeben und der Extinktionsanstieg bei 492 nm verfolgt. Dabei ergab sich eine Kurve mit mehreren Stufen. In Abbildung 43 ist als Beispiel eine solche Kurve für einen mit der Beadsorte 50/63,2 gefüllten Reaktor dargestellt. Der Anstieg der Extinktion pro Zeiteinheit in den einzelnen Stufen wurde analog Gleichung 4 der Aktivität der immobilisierten Mikroperoxidase gleichgesetzt. Auf diese Weise wurde die Enzymaktivität bei den vier mit verschiedenen Beadsorten gefüllten Reaktoren bestimmt.

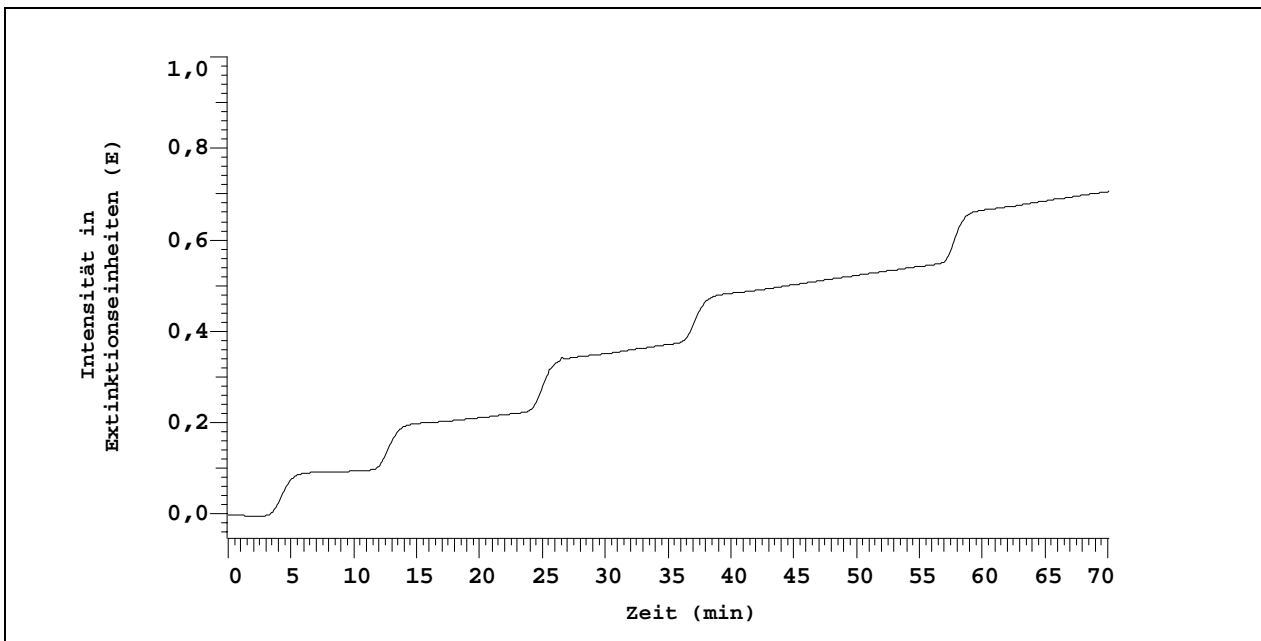


Abbildung 43 Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Mikroperoxidase (Beadsorte 50/63,2)

Eine absolute Aussage über die Aktivität gemäß Gleichung 4 konnte nicht getroffen werden, da der molare Absorptionskoeffizient des entstehenden roten Farbstoffes nicht bekannt war. Die Meßbedingungen waren jedoch bei allen vier Reaktoren gleich, so daß ein Vergleich der relativen Aktivitäten (Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit) untereinander sinnvoll erschien. In nachstehendem Diagramm sind die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Beadsorte vergleichend dargestellt.

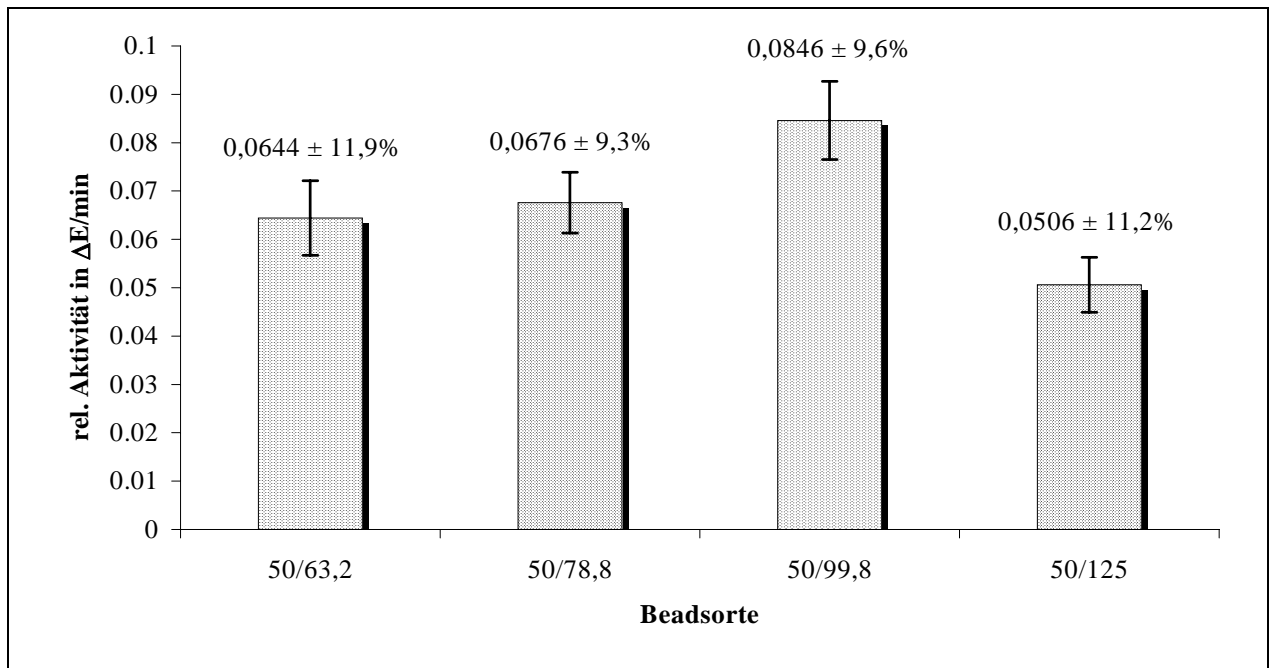


Abbildung 44 Aktivität der Enzymimmobilisate in Abhängigkeit von der verwendeten Beadsorte

Eine eindeutige Abnahme der Peroxidaseaktivität des Immobilisates in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche des Trägers, wie sie Weetall¹⁵⁸ beschrieb, konnte hier nicht festgestellt werden. Die hier ermittelten Werte spiegeln in etwa die bei der Bestimmung der Trägerbelegung erhaltenen Ergebnisse wieder (Tabelle 28).

4.5.8 Optimierung des MP-11-Fluoreszenz-HPLC-Systems

Für den Einsatz der Reaktoren bei der HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden wurde zunächst das von Heinmöller¹¹ entwickelte 2-Pumpen-System mit einer Eluenten- und einer Reagenzienpumpe eingesetzt. Der Einbau der Reaktoren erfolgte unmittelbar vor dem Fluoreszenz-Detektor (vgl. 6.6.5). Die Zusammensetzung der von Heinmöller verwendeten Reagenzlösung wurde nur insoweit geändert, als daß keine Mikroperoxidase zugegeben wurde. Die PES-Konzentration und die Pufferzusammensetzung wurden beibehalten. Da die Reaktion zwischen Hydroperoxid, Mikroperoxidase und 4-Hydroxyphenylessigsäure aufgrund der Immobilisierung des Enzyms nur im Reaktor selbst ablaufen konnte, wurde auf den Einsatz von Reaktionskapillaren verzichtet. Eine mögliche Erhöhung der Reaktivität konnte deshalb nur durch die Veränderung der Temperatur des Reaktors und der Flußrate der zudosierten

Reagenzienlösung erfolgen. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst ein Reaktor 50/63,2 in das HPLC-System eingebaut und mehrfach hintereinander jeweils 20 µl einer methanolischen Lösung von 13*S*-Hydroperoxy-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester (100 µmol/l) injiziert. Die Flußrate der Reagenzlösung betrug 0,5 ml/min. Die Temperatur des Enzymreaktors wurde im Bereich von 20-40 °C jeweils um 5 °C erhöht. Die sich daraus ergebende Temperaturabhängigkeit ist in nachstehender Abbildung dargestellt.

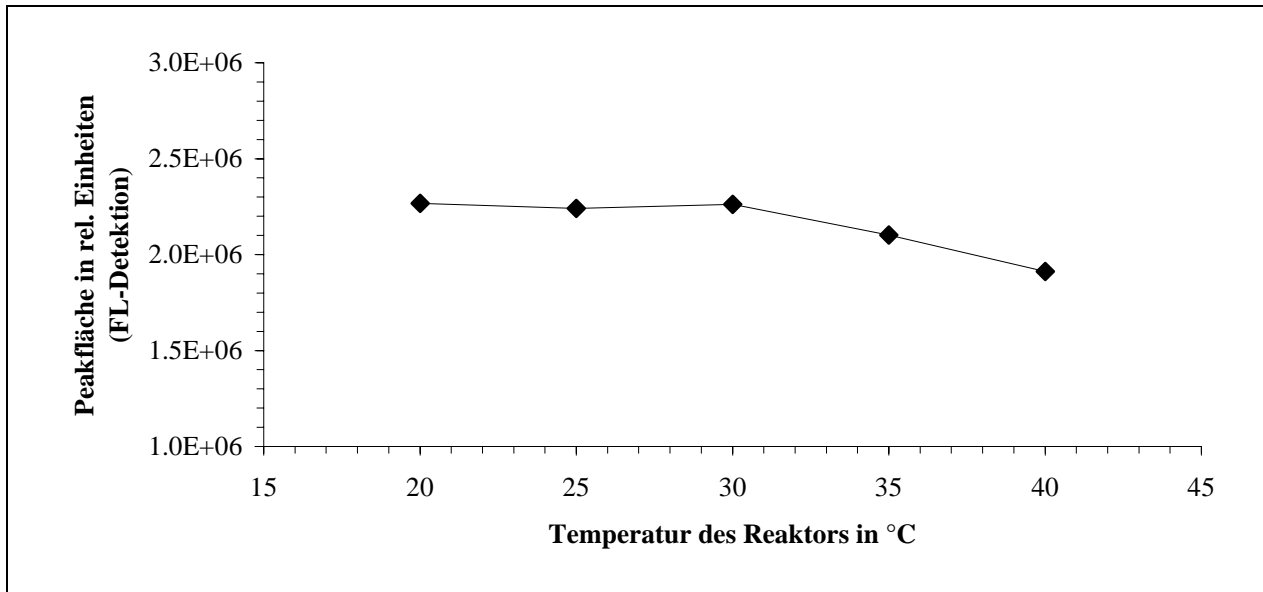


Abbildung 45 *Abhängigkeit des Response am Fluoreszenz-Detektor von der Temperatur des Enzymreaktors bei der RP-HPLC-Bestimmung von 13S-HPOD*

Ab einer Reaktortemperatur von etwa 30 °C war eine deutliche Abnahme des Response meßbar, während im Bereich von 20 - 30 °C die Signalintensität annähernd gleich blieb. Eine genaue Temperierung der Enzymreaktoren war deshalb bei einem Einsatz in der HPLC nicht erforderlich. Die Reaktoren wurden deshalb bei Raumtemperatur betrieben. Um den apparativen Aufwand möglichst gering zu halten, wurde eine Temperierung des Reaktors auf weniger als 20 °C nicht in Betracht gezogen.

In weiteren Versuchen wurde die Abhängigkeit der Signalintensität von der Flußrate der Reagenzlösung untersucht. Dazu wurde ebenfalls das in Kapitel 6.6.5 beschriebene 2-Pumpen-System eingesetzt. Die Temperatur des Enzymreaktors betrug etwa 22 °C (Raumtemperatur). Die Flußrate der PES-Lösung wurde von 0,1 ml/min bis 0,5 ml/min variiert. Bei Verwendung eines Enzymreaktors 50/63,2 ergaben sich für 13*S*-HPOD und 13*S*-HPOD-Me-Ester als Testsubstanzen die in Abbildung 46 dargestellten Kurven.

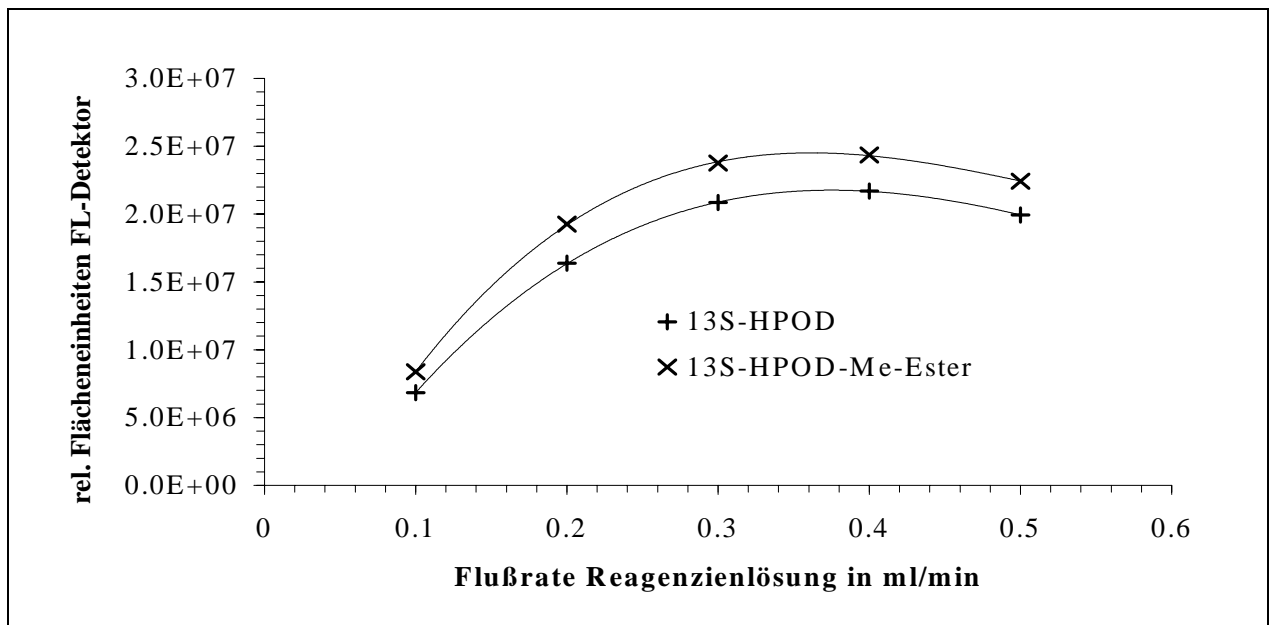


Abbildung 46 *Abhängigkeit des Response am Fluoreszenz-Detektor von der Flußrate der Reagenzienlösung bei der RP-HPLC-Bestimmung von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester mit dem 2-Pumpensystem*

Hier zeigte sich deutlich, daß bei Flußraten unter 0,38 - 0,40 ml/min zu wenig PES in den Reaktor gelangte, und es somit nicht zu einer vollständigen Umsetzung des Hydroperoxids kam. Bei höheren Flußraten war hingegen die Reaktionszeit zu kurz, was wiederum zu einer Abnahme der Signalintensität führte. In den weiteren Versuchen wurde deshalb die Flußrate der Reagenzlösung auf 0,4 ml/min eingestellt.

Die Abhängigkeit des Responseverhaltens von der Konzentration der PES-Lösung wurde ebenfalls untersucht. Analog zu den von Kurth beschriebenen Ergebnissen¹⁰⁹ wurde auch hier mit steigender PES-Konzentration eine Erhöhung des Response bei gleichzeitiger Zunahme des Grundrauschens (Baseline-noise) festgestellt. So führte eine Änderung der PES-Konzentration von 4 auf 6 mg/250 ml zu einer Vervierfachung des Grundrauschens. Die von Heinmöller vorgeschlagene Zusammensetzung der Reagenzienlösung wurde deshalb beibehalten.

Während der Versuche wurde bei allen eingesetzten Reaktoren unmittelbar nach dem Einbau in das 2-Pumpen-HPLC-System (vgl. 6.6.5) ein mehr oder weniger starkes "Ausbluten" beobachtet (jeweils während der ersten 100 ml durchgepumpter Flüssigkeit). Im weiteren Verlauf des HPLC-Einsatzes änderte sich die Farbe der Beads von einem tiefen Rot zu einem schwachen Braun-Rosa. Die Aktivität der Reaktoren schien durch das Ausbluten jedoch nicht beeinträchtigt zu werden, was auch durch spätere Messungen bestätigt wurde.¹⁵⁹ Das Aus-

bluten trat nur bei Reaktoren mit frischem Immobilisat auf, wenn diese in das 2-Pumpen-HPLC-System eingebaut und mit alkalischem Boratpuffer (pH 10) durchspült wurden. Beim Spülen der Reaktoren mit Methanol, Wasser oder Phosphatpuffer (pH 7) konnte ein Ausbluten nicht festgestellt werden. Die Ursache lag vermutlich in einem Auswaschen restlicher, nur adsorptiv gebundener Mikroperoxidase, die durch einfaches Waschen der Beads nach der Immobilisierung nicht entfernt werden konnte. Darüber hinaus ist auch eine teilweise Hydrolyse der bei der Immobilisierung entstehenden Amidbindung zwischen Carboxyl-Gruppen der Mikroperoxidase und Aminogruppen des Trägers möglich (Abbildung 47). Diese Reaktion läuft unter basischen Bedingungen ab, wie sie auch bei Verwendung des Boratpuffers (pH 10) als Reagenzienlösungsmittel vorliegen.

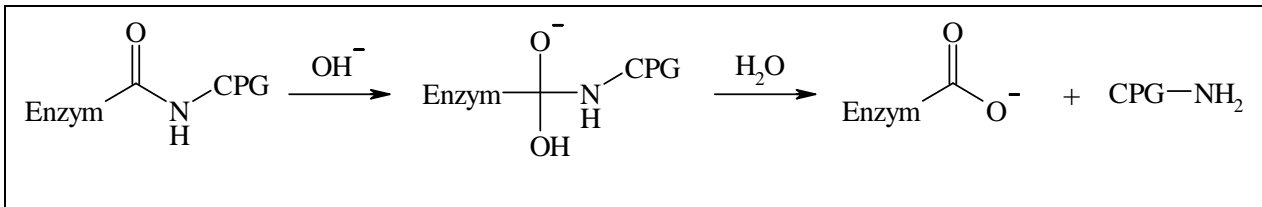


Abbildung 47 Basenkatalysierte Hydrolyse der zur Immobilisierung genutzten Säureamidbindung

Trotz des beobachteten Auswaschens war aber auch nach sehr langer, intensiver Nutzung der Reaktoren (ca. 300 Injektionen, entspr. ca. 6000 Minuten) immer noch eine hohe Peroxidaseaktivität feststellbar.

Um gegebenenfalls die Standzeit der Reaktoren weiter zu erhöhen, wurde versucht, eine Lösung von 4-Hydroxyphenylessigsäure in Phosphatpuffer pH 7 als Reagenz einzusetzen. Wie eigene und auch frühere Untersuchungen^{11,109} ergaben, war es unter diesen Bedingungen jedoch zwingend notwendig, im HPLC-System hinter dem Reaktor den pH-Wert des Eluates durch Zugabe von Natronlauge anzuheben. Nur unter diesen Bedingungen zeigte das aus 4-Hydroxyphenylessigsäure gebildete Dimer eine starke Fluoreszenz (siehe Abbildung 18). Es wurde deshalb auf das von Heinmöller¹¹ beschriebene 3-Pumpen-System zurückgegriffen, bei dem nach erfolgter Reaktion von Hydroperoxid, Peroxidase und PES zusätzlich Natronlauge zudosiert wird. Dieses System wurde für den Einsatz der Enzymreaktoren entsprechend modifiziert (Kapitel 6.6.6). Die Konzentration und die Flußrate der PES-Lösung wurden beibehalten.

Zur Untersuchung des Nachweisvermögens der beiden verwendeten HPLC-Systeme wurden jeweils Konzentrationsreihen von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester im Bereich von 0,5-25 $\mu\text{mol/l}$ mit allen vier Reaktortypen in beiden HPLC-Systemen vermessen. Im Zuge dieser Untersuchungen ergab sich, daß nur beim 2-Pumpen-System ein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration der injizierten Hydroperoxidlösung bestand. Die mit dem 3-Pumpen-System erhaltenen Korrelationen zeigten hingegen eine mehr oder weniger starke Krümmung. In den Abbildungen 48-51 sind exemplarisch die Kalibrierkurven von 13S-HPOD- und 13S-HPOD-Me-Ester bei Verwendung des Reaktortyps 50/63,2 im 2-Pumpen- und im 3-Pumpen-System dargestellt.

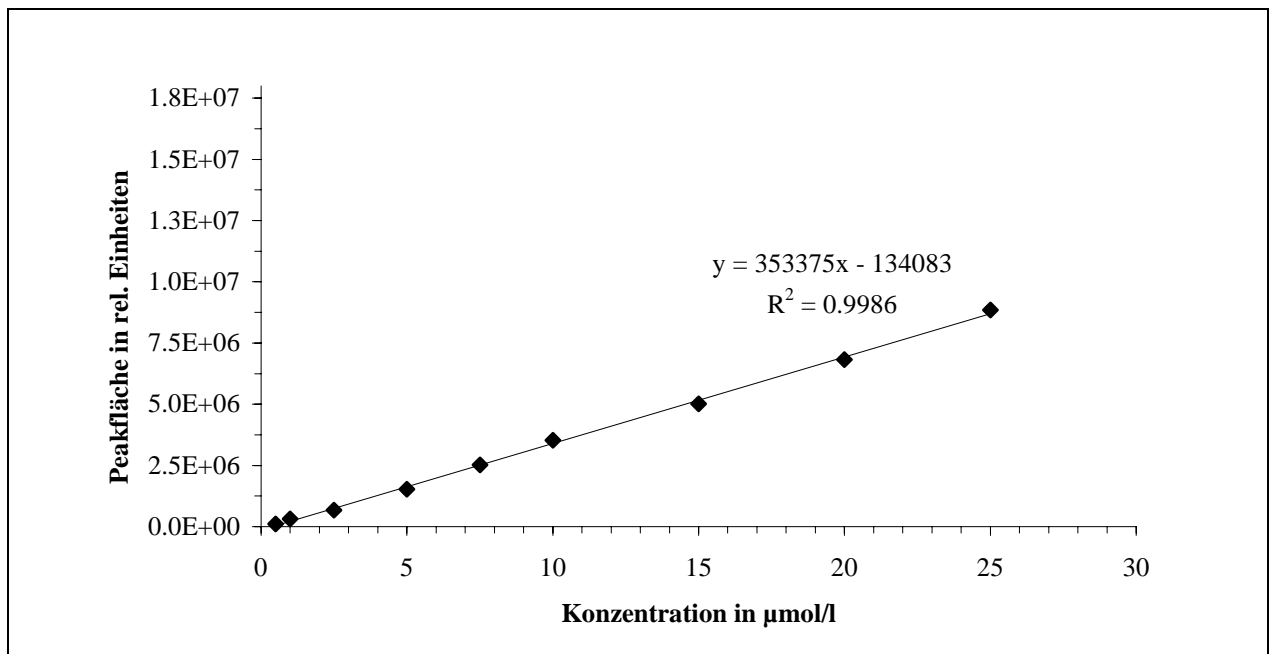


Abbildung 48 Kalibrierkurve für 13S-HPOD im 2-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion

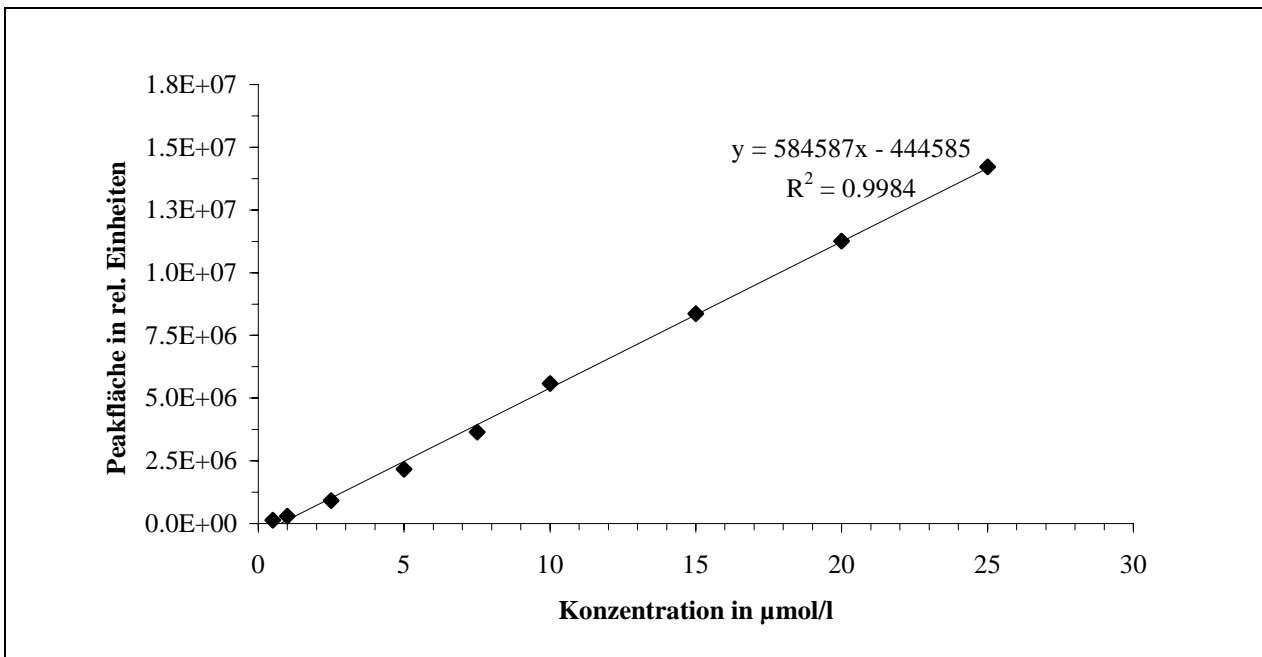


Abbildung 49 Kalibrierkurve für 13S-HPOD-Me-Ester im 2-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion

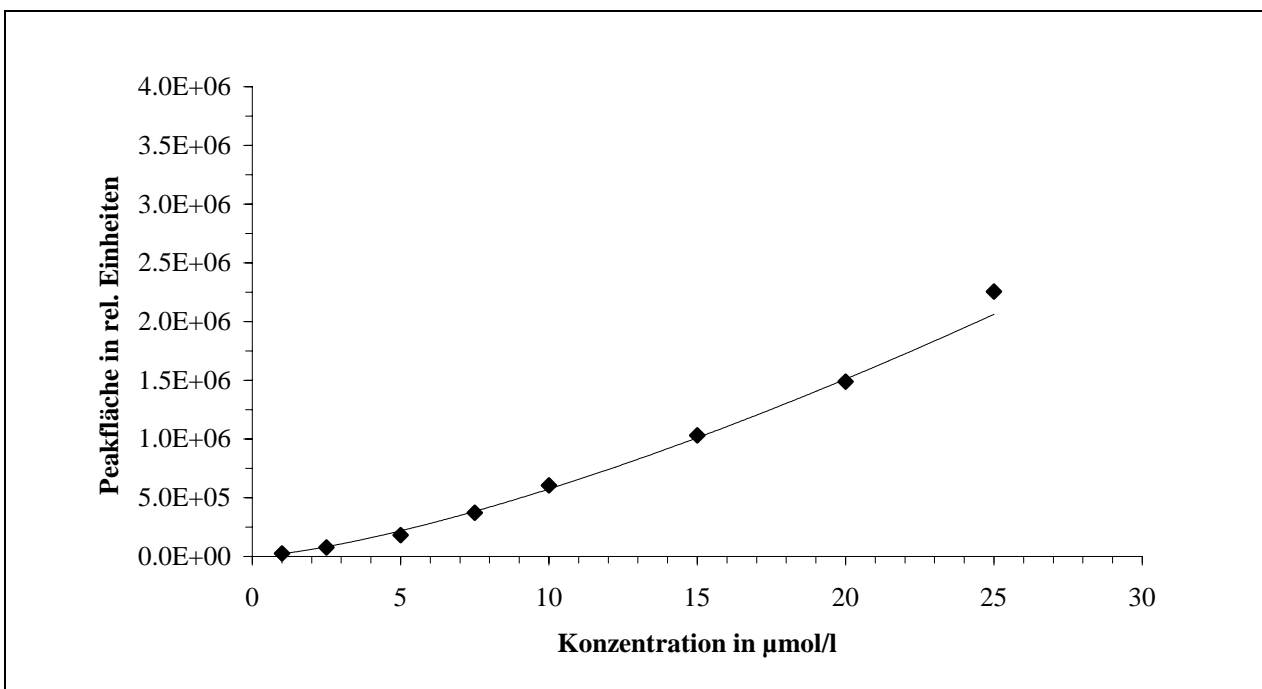


Abbildung 50 Kalibrierkurve für 13S-HPOD im 3-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion

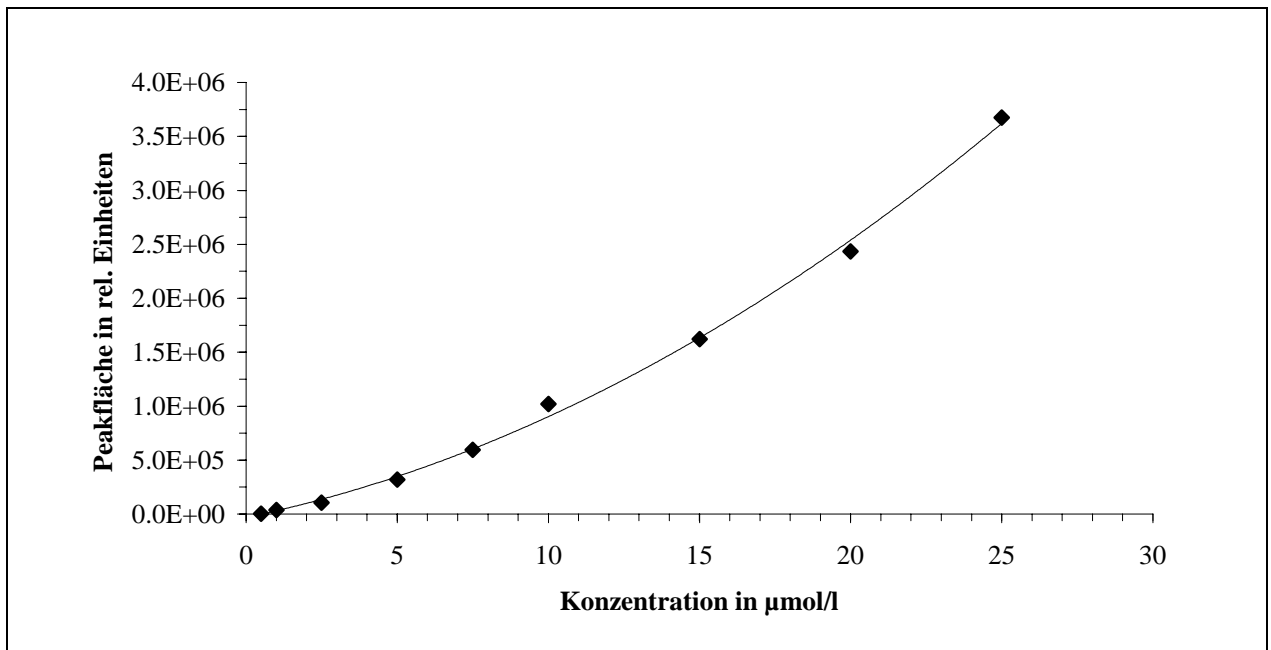


Abbildung 51 Kalibrierkurve für 13S-HPOD-Me-Ester im 3-Pumpen-System mit Enzymreaktor (Typ 50/63,2) und Fluoreszenzdetektion

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen in Anlehnung an DIN 32645¹³⁵ konnte aufgrund dieser Zusammenhänge nur für das 2-Pumpen-System erfolgen, da bei der entsprechenden Berechnung von einem linearen Zusammenhang ausgegangen wird. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 30 aufgeführt. Für das 3-Pumpen-System erfolgte die Abschätzung der Nachweisgrenze nach der von Kaiser und Specker vorgeschlagenen Methode. Danach ist der Meßwert an der Nachweisgrenze in guter Näherung durch die dreifache Standardabweichung des Grundrauschens (3σ) des analytischen Systems gegeben.¹⁶⁰ Als Nachweisgrenze ergab sich ein Wert von ca. 1-2 $\mu\text{mol/l}$

Reaktortyp		13S-HPOD	13S-HPOD-Me-Ester
50/63,2	Steigung in FE·l· μmol^{-1}	353375	584587
	Achsenabschnitt in FE	-134083	-444585
	Korrelationskoeffizient	0,999	0,999
	Nachweisgrenze in $\mu\text{mol/l}$	0,74	0,8
	Bestimmungsgrenze in $\mu\text{mol/l}$	2,16	2,34
	Nachweisgrenze absolut in pmol	14,8	16,0
50/79,8	Steigung in FE·l· μmol^{-1}	178776	286561
	Achsenabschnitt in FE	-116326	-408527
	Korrelationskoeffizient	0,997	0,992
	Nachweisgrenze in $\mu\text{mol/l}$	1,46	2,59
	Bestimmungsgrenze in $\mu\text{mol/l}$	4,20	7,31
	Nachweisgrenze absolut in pmol	29,2	51,8
50/99,8	Steigung in FE·l· μmol^{-1}	139046	239752
	Achsenabschnitt in FE	-90711	-280984
	Korrelationskoeffizient	0,998	0,994
	Nachweisgrenze in $\mu\text{mol/l}$	1,34	2,12
	Bestimmungsgrenze in $\mu\text{mol/l}$	3,87	6,01
	Nachweisgrenze absolut in pmol	26,8	42,4
50/125	Steigung in FE·l· μmol^{-1}	59951	121200
	Achsenabschnitt in FE	-76887	-225399
	Korrelationskoeffizient	0,994	0,985
	Nachweisgrenze in $\mu\text{mol/l}$	2,25	3,53
	Bestimmungsgrenze in $\mu\text{mol/l}$	6,37	9,94
	Nachweisgrenze absolut in pmol	45,0	70,6

Tabelle 30 Kalibrierdaten und Kenngrößen von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester bei Verwendung verschiedener Enzymreaktoren im 2-Pumpen-System

Wie aus Tabelle 30 hervorgeht, liegen die für das 2-Pumpen-System berechneten Nachweisgrenzen von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester und auch die für das 3-Pumpen-System abgeschätzten Nachweisgrenzen bei Verwendung verschiedener Reaktoren etwa im gleichen Bereich. Aufgrund des linearen Zusammenhanges zwischen Konzentration und Peakfläche ist das 2-Pumpen-System jedoch auf jeden Fall vorzuziehen, zumal auch der apparative Aufwand deutlich geringer ist. Im weiteren Verlauf wurde deshalb ausschließlich mit diesem System gearbeitet.

Vergleicht man die in Tabelle 30 aufgeführten Parameter der Kalibriergeraden, so erkennt man weiterhin, daß die Hydroperoxyfettsäuren und deren Methylester nicht den gleichen Response lieferten. Trotz gleicher Konzentration im Testgemisch wurden für die Säuren gegenüber den entsprechenden Methylestern bis zu 30 % kleinere Signale erhalten. Ursache könnte eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit der Mikroperoxidase mit den Fettsäuren sein.

In einem letzten Schritt wurde der Einfluß der Beadsorte und der Packverfahren (vgl. 4.5.6) auf die Peakbreite im HPLC-System bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 zusammengefaßt.

Detektionssystem	Packverfahren der Reaktoren	$t_R(13S\text{-HPOD})$ in min	$w_h(13S\text{-HPOD})$ in min	$t_R(13S\text{-HPOD-Me-Ester})$ in min	$w_h(13S\text{-HPOD-Me-Ester})$ in min
UV-Detektion	—	1,95	0,2	4,93	0,29
Fluoreszenz-Detektion nach Heinmöller ¹¹	—	2,24	—	3,64	ca. 0,36
Fluoreszenz-Detektion mit Reaktor 50/78,8	Suspensions-technik	2,20	0,38	5,68	0,44
Fluoreszenz-Detektion mit Reaktor 50/125	Kombinationsmethode	2,48	0,37	5,53	0,41
Fluoreszenz-Detektion mit Reaktor 50/99,8	Kombinationsmethode	2,46	0,37	5,21	0,41
Fluoreszenz-Detektion mit Reaktor 50/78,8	Kombinationsmethode	2,59	0,38	5,37	0,44
Fluoreszenz-Detektion mit Reaktor 50/63,2	Kombinationsmethode	2,56	0,37	5,43	0,43

Tabelle 31 Retentionszeiten t_R und Peakbreiten auf halber Höhe w_h von 13S-HPOD und 13S-HPOD-Me-Ester in Abhängigkeit von der Beadsorte und dem Packverfahren der Enzymreaktoren

Im Vergleich zum HPLC-System mit UV-Detektion ergab sich bei Verwendung der herkömmlichen Fluoreszenz-Detektion nach Heinmöller¹¹ aufgrund der Zudosierung des Reagenzes und des Einsatzes längerer Kapillaren eine deutliche Peakverbreiterung. Diese wurde

bei Verwendung der Enzymreaktoren durch die Querschnittsverbreiterung in den Reaktoren und das relativ grobkörnige Material noch leicht erhöht. Eine Abhängigkeit von der Art der verwendeten Beads konnte jedoch nicht festgestellt werden. Auch die zum Packen der Beads verwendete Methode (Suspensionstechnik bzw. Kombination von Trockenfüll- und Suspensionstechnik; vgl. Kapitel 4.5.6) hatte keinen Einfluß auf die Breite der Peaks.

4.5.9 Einsatz von MP-11-Reaktoren in der NP-HPLC

In der Literatur sind Beispiele bekannt, daß Enzyme auch in Gegenwart nichtwäßriger organischer Lösungsmittel eine katalytische Aktivität besitzen. So beschreiben Li und Ward die durch Lipasen katalysierte Veresterung von Glycerin mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in organischen Lösungsmitteln, wie Pentan oder Hexan.¹⁶¹ Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Wassergehalt des Lösungsmittels. In wäßriger Umgebung treten in Enzymen Regionen relativ hoher Polarität mit dem wäßrigen Lösungsmittel in Kontakt. Regionen mit vergleichsweise niedriger Polarität sind dagegen größtenteils vom wäßrigen Milieu abgeschirmt. Wird die Polarität des Lösungsmittels herabgesetzt, so breiten sich die Regionen niedriger Polarität aus, was in der Regel zu einer Umorganisation der Enzymstruktur und zu einer Destabilisierung führt.¹⁶² Dennoch läßt sich keine allgemeine Aussage darüber treffen, ob der Wechsel von einem wäßrigen polaren zu einem nichtwäßrigen apolaren Lösungsmittel mit einer Zu- oder Abnahme der katalytischen Aktivität des Enzyms einhergeht. Dies muß von Fall zu Fall neu überprüft werden.

Die in dieser Arbeit immobilisierte Mikroperoxidase hat mit ihren elf Aminosäuren im Vergleich zu vollständigen Enzymen, wie z.B. Meerrettichperoxidase, keine ausgeprägte übergeordnete Struktur (Tertiärstruktur). Das aktive Zentrum liegt mehr oder weniger frei. Eine Aktivitätsänderung der Mikroperoxidase aufgrund oben genannter Aspekte war deshalb nicht zu erwarten.

Um die Einsatzmöglichkeit der Reaktoren auch unter Normalphasenbedingungen zu prüfen, wurden zunächst in einem Vorversuch 20 mg mit Mikroperoxidase belegte CPG-Beads in einer Fluoreszenzküvette mit 2 ml einer 4-Hydroxyphenyllessigsäure-Lösung (4 mg PES in 100 ml einer Mischung aus Boratpuffer (10 mmol/l; pH 10) und Methanol 1/1 v/v) versetzt. Zu der Lösung wurden 100 µl einer 1 mmol/l 13S-HPOD-Me-Ester-Lösung in Methanol gegeben. Nach kurzem Durchmischen wurde die Lösung sofort im Fluoreszenzphotometer

vermessen ($\lambda_{em} = 234$ nm, $\lambda_{ex} = 415$ nm). Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz über mehrere Minuten beobachtet. Die Beads wurden daraufhin gründlich mit 2-Propanol gespült und mit je 1 ml Hexan und einer Lösung von 4 mg PES in 100 ml 2-Propanol versetzt. Nach Zugabe von 100 μ l einer 13S-HPOD-Me-Ester-Lösung (1 mmol/l in Hexan) und Durchmischen wurde die Lösung erneut in einem Fluoreszenzphotometer vermessen. Eine Peroxidaseaktivität konnte unter diesen Bedingungen auch nach längerer Zeit nicht beobachtet werden. Nach erneutem Umspülen mit 2-Propanol, Methanol und Wasser auf ein methanolisch-wäßriges System zeigten die Beads wieder eine Aktivität, die im Vergleich zu vorher jedoch deutlich geringer war.

Aufgrund dieser Ergebnisse war ein Einsatz der MP-11-Reaktoren unter NP-Bedingungen nicht möglich. Dies wurde auch durch HPLC-Versuche bestätigt, bei denen ein entsprechender Enzymreaktor in ein NP-HPLC-System eingebaut wurde. Selbst bei Injektion größerer Mengen an Hydroperoxid konnte kein Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Wie die Küvettentests zeigten, schien der Einsatz der MP-11-Reaktoren in einem apolaren, nicht wäßrigen Lösungsmittel nicht zu einer dauerhaften, irreversiblen Inaktivierung zu führen. Vermutlich spielt hier der Wasseranteil im Lösungsmittel eine entscheidende Rolle für die Aktivität des Enzyms, wie es Li und Ward¹⁶¹ für Lipase in organischen Lösungsmitteln beschrieben. Insgesamt decken sich die hier erhaltenen Ergebnisse mit den Beobachtungen von Siegel und Roberts⁸⁹ über das Verhalten von Meerrettichperoxidase (HRP) in organischen Lösungsmitteln. Danach zeigte HRP in protischen Lösungsmitteln mit einer hohen Dielektrizitätskonstanten eine katalytische Aktivität, während in aprotischen Lösungsmitteln, wie Hexan, Dioxan oder Benzol keine Aktivität nachweisbar war.

4.5.10 Diskussion der Ergebnisse

Die in diesem Kapitel beschriebene Methode zur direkten kovalenten Bindung von Mikroperoxidase-11 an Aminopropyl-CPG-Beads hat sich wegen ihrer Einfachheit und schnellen Durchführbarkeit gut bewährt. Aufgrund früherer Ergebnisse wurde auf den Einfluß von Spacer-Molekülen verzichtet. Dadurch ergab sich im Vergleich zu den Arbeiten von Jacob¹⁴⁸ eine höhere Trägerbelegung und letztendlich auch eine höhere Peroxidaseaktivität des Immobilisates. Die Bestimmung der Trägerbelegung erfolgte über die atomabsorptionsspektrometrische Messung des Eisengehaltes. Die aus der Differenzmessung (Messung des

Eisengehaltes vor und nach der Immobilisierung im Reaktionsansatz) und über den Aufschluß belegter Beads erhaltenen Werte stimmten zwar nicht völlig überein, zeigten aber im Vergleich zu früheren Versuchen¹⁴⁸ eine wesentlich größere Belegung der Beads. Ein Vergleich der erzielten Enzymaktivitäten erwies sich jedoch als schwierig, da in der Literatur kein einheitliches Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von immobilisierter Mikroperoxidase beschrieben wird und somit auch keine Referenzwerte vorlagen. Über den zeitlichen Anstieg der Extinktion bei der Reaktion von MP-11 mit H₂O₂ in Gegenwart von Phenol und 4-Aminoantipyrin konnten für die vier verschiedenen Beadsorten relative Aktivitäten bestimmt werden. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Beadsorte (d.h. Porengröße) und Aktivität war nicht feststellbar.

Die hergestellten Enzymreaktoren ließen sich ohne größere Probleme in den von Heinmöller¹¹ beschriebenen RP-HPLC-Systemen (2- und 3-Pumpen-Systeme) zur Bestimmung von Lipidhydroperoxiden einsetzen. Dabei wurde die Zusammensetzung der Reagenzienlösungen nicht geändert, lediglich die Flußraten wurden angepaßt.

Im Zuge der Untersuchungen erwies sich das 2-Pumpen-System, bei dem die 4-Hydroxyphenylessigsäure im basischen Boratpuffer zudosiert wird, im Vergleich zu dem 3-Pumpen-System als vorteilhafter, da einerseits der apparative Aufwand geringer war, andererseits auch die entsprechende Kalibrierfunktion einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche zeigte. Das nur beim 2-Pumpen-System beobachtete Ausbluten der Reaktoren hatte keine Aktivitätsminderung zur Folge. Die erreichten Nachweisgrenzen lagen unabhängig von der verwendeten Beadsorte in etwa in dem Bereich, wie den Heinmöller für das HPLC-System mit zudosierter MP-11 angab. Eine Abhängigkeit der Peakbreite von der Art der eingesetzten Beads konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Auch die zum Packen der Reaktoren verwendete Methode hatte keinen Einfluß auf die Peakbreite.

4.6 Untersuchung oxidierter Speiseöle mittels photometrischer Methoden und HPLC-Methoden

4.6.1 Einleitung

Die relative Geschwindigkeit v_{rel} der Lipidoxidation in Lebensmitteln ist nach Labuza abhängig von der sogenannten Wasseraktivität (a_w -Wert).¹⁶³ In Abbildung 52 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt. Der a_w -Wert ist gegeben durch:

$$a_w = \frac{p}{p_0} = \frac{RGF}{100}$$

Gleichung 5

wobei p der Wasserdampfpartialdruck im Lebensmittel bei der Temperatur T , p_0 der Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers bei der Temperatur T und RGF die relative Gleichgewichtsfeuchte in Prozent bei gegebener Temperatur ist.

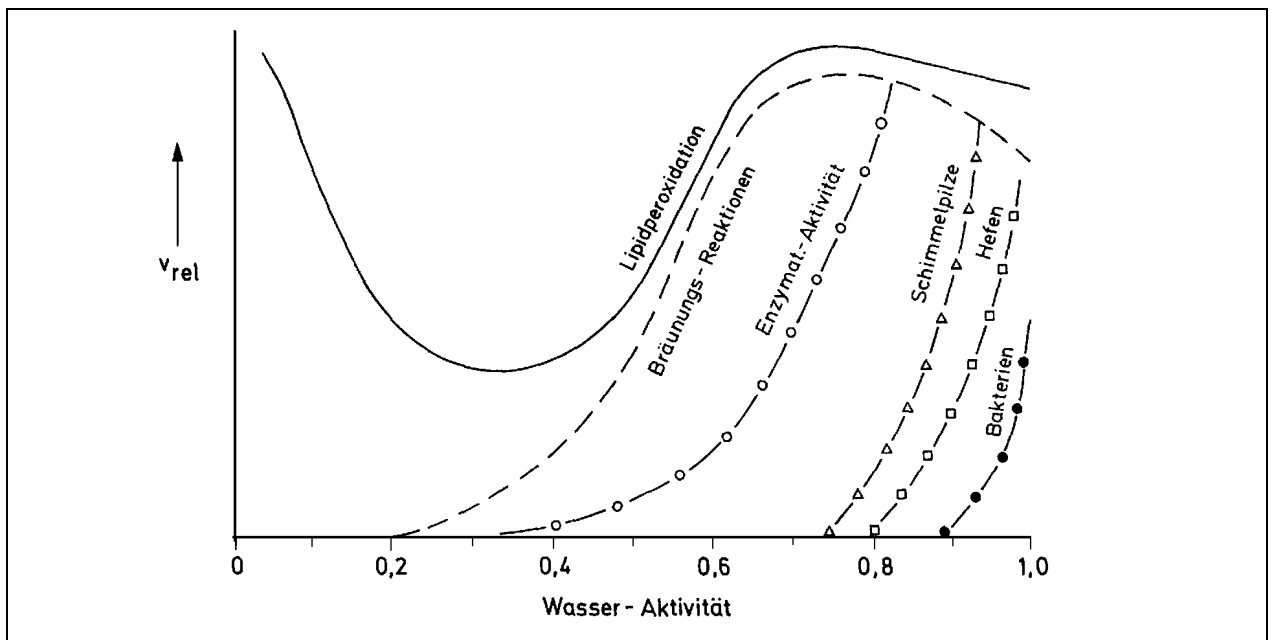


Abbildung 52 Lagerstabilität von Lebensmitteln in Abhängigkeit von der Wasseraktivität nach Labuza^{3,163}

Der dargestellte Kurvenverlauf der Lipidperoxidation wird damit erklärt, daß bei niedrigen Wassergehalten der Probe die darin enthaltenen Prooxidantien, wie z.B. Metallionen, nicht mehr von einer großen Hydrathülle umgeben sind. Sie können dadurch leichter mit den Fetten der Probe reagieren, was zu einem erhöhten Hydroperoxidgehalt führt. Die bei höheren Wassergehalten ebenfalls beobachtete erhöhte Peroxidationsrate beruht dagegen auf einer höheren Beweglichkeit der Prooxidantien in der Probe. Diese können dann pro Zeiteinheit mit einer größeren Zahl von Fettsäuremolekülen reagieren.

Obwohl die in Abbildung 52 beschriebene Abhängigkeit der Lipidoxidation in der Literatur sehr verbreitet ist, schien es dennoch sinnvoll, diese Abhängigkeit zu überprüfen, zumal die genauen Meßbedingungen und Parameter, die der Kurve zugrunde liegen, nicht genau bekannt sind.

Aus diesem Grunde wurde versucht, die Lipidoxidation eines Modell-Lebensmittels in Abhängigkeit vom a_w -Wert zu verfolgen. Dazu wurde ein Gemisch aus Distelöl (Safloröl) und Maisstärke hergestellt, welches bei verschiedenen a_w -Werten über längere Zeit bei einer Temperatur von 40 °C gelagert wurde. Die Maisstärke diente dabei als Matrix zur Einstellung der Wasseraktivität. Distelöl wurde aufgrund seines hohen Anteils an Linolsäure ausgewählt (Tabelle 32), um eine möglichst hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen und die spätere HPLC-Analytik zu vereinfachen.

Fettsäure	mittlere Zusammensetzung (Gew. %)
16:0 (Palmitinsäure)	6
18:0 (Stearinsäure)	2,5
20:0 (Arachinsäure)	0,5
18:1 (9) (Ölsäure)	12
18:2 (9, 12) (Linolsäure)	78
18:3 (9, 12, 15) (Linolensäure)	0,5
20:1 und 20:3	0,5

Tabelle 32 *Mittlere Fettsäurezusammensetzung von Distelöl (Saflor; Carthamus tinctorius)*³

Während der Untersuchungen wurde der Fortgang der Lipidperoxidation mittels photometrischer Verfahren und mit Hilfe der RP-HPLC unter Einsatz verschiedener Nachsäulen-derivatisierungsmethoden verfolgt. Die aus den Messungen erhaltenen Ergebnisse für den Hydroperoxidgehalt wurden anschließend auf die Trockenmasse bezogen. Abweichend von

früheren Projektarbeiten zu diesem Thema¹⁶⁴ wurden die Proben bei 40 °C gelagert, da bei niedrigeren Temperaturen die Reaktionszeit zu lang war, während bei höheren Temperaturen (60 °C) eine rasche Trennung von Öl und Stärke beobachtet wurde. Die Homogenität der Proben war dadurch nicht mehr gewährleistet.

4.6.2 Zusammensetzung und Lagerung der Proben, Probenahme

Zur Herstellung des Modell-Lebensmittels wurden drei Teile Maisstärke und ein Teil Distelöl gemischt. Die Maisstärke wurde schon zuvor durch längere Lagerung über gesättigten Salzlösungen auf den gewünschten a_w -Wert eingestellt (Tabelle 33). Teile des Gemisches wurden in Exsikkatoren über den Salzlösungen bei 40 °C gelagert.

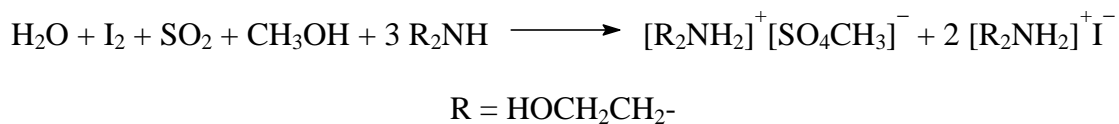
In regelmäßigen Abständen wurden Proben (jeweils ca. 1 g) entnommen. Nach jeder Probenahme wurden die Exsikkatoren mit einer Membranpumpe evakuiert und über die entsprechende gesättigte Salzlösung belüftet.

Salzlösung (gesättigt)	Sättigungskonzentration in g/l	a_w -Wert
Lithiumchlorid	83	0,11
Kaliumacetat	228	0,23
Magnesiumchlorid	54	0,31
Kaliumcarbonat	112	0,40
Magnesiumnitrat	71	0,51
Natriumchlorid	36	0,75

Tabelle 33 Relative Feuchte über gesättigten Salzlösungen bei 40°C (nach Rockland¹⁶⁵ und DIN 50008¹⁶⁶)

4.6.3 Bestimmung des Wassergehaltes

Da der Gehalt an Hydroperoxiden später auf die Trockenmasse bezogen werden sollte, wurde der Wassergehalt der Probe nach der Karl-Fischer-Methode bestimmt. Diese Methode ist besonders für Lebensmittel mit niedrigen Wassergehalten, wie z.B. Öle und Fette, geeignet. Die Bestimmung beruht auf der Umsetzung von Schwefeldioxid mit Iod in Gegenwart von Wasser. Durch Zusatz einer Base (Diethanolamin) und eines Alkohols (Methanol) wird das Reaktionsgleichgewicht zur Produktseite hin verschoben.



Die eingewogene Probe wurde zu einer zuvor wasserfrei titrierten Lösung von Diethanolamin, schwefeliger Säure und Methanol gegeben und diese Lösung dann mit einer methanolischen Iodlösung titriert. Die Endpunktsbestimmung erfolgte elektrochemisch nach der sogenannten Dead-stop-Methode. Als Elektroden dienten zwei polarisierbare Platinelektroden, die nach Beendigung der Reaktion durch das vorliegende freie Iod depolarisiert wurden und damit den Endpunkt anzeigten.

4.6.4 Aufarbeitung der Proben

Zur Bestimmung der Hydroperoxide im Testgemisch mußte aus diesem die Maisstärke wieder entfernt werden. Nach verschiedenen Vorversuchen erwies sich die Extraktion des Gemisches mit Diethylether und anschließendes Zentrifugieren zur Abtrennung der Lipidbestandteile aus dem Testgemisch als am besten geeignet. Die erreichte Wiederfindung betrug ca. 99 %. Der gewonnene Lipidextrakt konnte direkt zur Bestimmung des Hydroperoxidgehaltes mit photometrischen Methoden eingesetzt werden.

Da eine Störung der späteren HPLC-Bestimmung durch die noch in der Probe vorhandenen, nicht oxidierten Triglyceride nicht ausgeschlossen werden konnte,³⁶ wurde zunächst versucht, diese durch Festphasenextraktion abzutrennen. Aufgrund der nur begrenzten Probenmenge wurde Distelöl bzw. synthetisches Triglyceridhydroperoxid (vgl. Kapitel 4.1.4) für die entsprechenden Vorversuche benutzt. Das Distelöl wurde zuvor mehrere Tage bei 60 °C gelagert. Wie die jeweilige dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, gelang eine vollständige Abtrennung der nichtoxidierten Triglyceride von den oxidierten Triglyceriden trotz Einsatz verschiedener Festphasenkartuschen (1 und 3 cm³ Kieselgel, verschiedene Hersteller) nicht.

Sowohl die nichtoxidierten als auch die oxidierten Triglyceride sind nur sehr schlecht in Methanol-Wasser-Gemischen löslich. Es bestand deshalb die Gefahr, daß die Verbindungen im HPLC-System ausfielen, insbesondere beim Zudosieren wäßriger Reagenzienlösung zwischen Trennsäule und Detektor. Die Triglyceridproben wurden deshalb zu den entsprechen-

den Methylestern umgeestert. Als Reagenz hat sich dabei eine 10 %-ige Lösung von Natriummethylat in Methanol bewährt.¹¹

Zur Umesterung wurden zu den mit 1 ml Methanol versetzten Ölproben jeweils 75 µl Natriummethylatlösung gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben zwölf Stunden bei 4 °C bis zur vollständigen Umesterung gelagert. Der Reaktionsverlauf zeigte sich in einer fortschreitenden Homogenisierung der Probe, d.h. die anfangs vorhandenen Öltröpfchen lösten sich mit fortschreitender Reaktion auf. Während bei Zugabe der Natriummethylatlösung das Öl in kleinen Tröpfchen in dem Ansatz vorlag, erhielt man nach der Umsetzung jeweils eine klare Lösung.

Zur weiteren Bestimmung wurden die umgeesterten Proben im Verhältnis 1:10 mit Methanol verdünnt. In der Lösung lagen nach der Umesterung Fettsäuremethylester und Hydroperoxyfettsäuremethylester nebeneinander vor. Wie die späteren Untersuchungen zeigten, traten keine Störungen der eingesetzten analytischen Verfahren aufgrund des hohen Gehaltes an nichtoxidierten Fettsäuremethylestern auf. Bei Einsatz selektiver Detektionsmethoden, wie der in Kapitel 4.5 beschriebenen enzymatischen Nachsäulenderivatisierung mit anschließender Fluoreszenzmessung, war eine Störung auch nicht zu erwarten, da die Fettsäuremethylester dabei nicht detektiert werden.

Aufgrund des relativ großen Überschusses an Natriummethylat konnte eine basenkatalysierte Zersetzung der in der Probe enthaltenen Lipidhydroperoxide nicht ausgeschlossen werden. Um dies zu überprüfen, wurden jeweils 100 µl eines 13S-HPOD-Me-Ester-Standards (100 µmol/l) mit verschiedenen Mengen Natriummethylatlösung (10 %-ig in Methanol) versetzt und mit Methanol auf 350 µl aufgefüllt. Die Lösungen wurden dann mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion (vgl. Kapitel 4.6.6.1) analysiert.

Aus diesen Untersuchungen ergab sich, daß die Peakfläche des detektierten Hydroperoxids mit zunehmender Menge an Natriummethylatlösung auf 90 % des Wertes ohne Zugabe von Methylat absank (Abbildung 53). Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß zur Umesterung der Proben nur jeweils 75 µl Natriummethylatlösung zugesetzt wurden. Bei einer Einwaage von maximal 20 mg des Lipidextraktes wurden davon ca. 45 µl verbraucht, so daß der Verlust an Hydroperoxid höchstens 4 % betrug. Die auf dem Zusatz von Natriummethylat beruhenden Veränderungen der Probe wurden deshalb in den weiteren Berechnungen und Bestimmungen vernachlässigt.

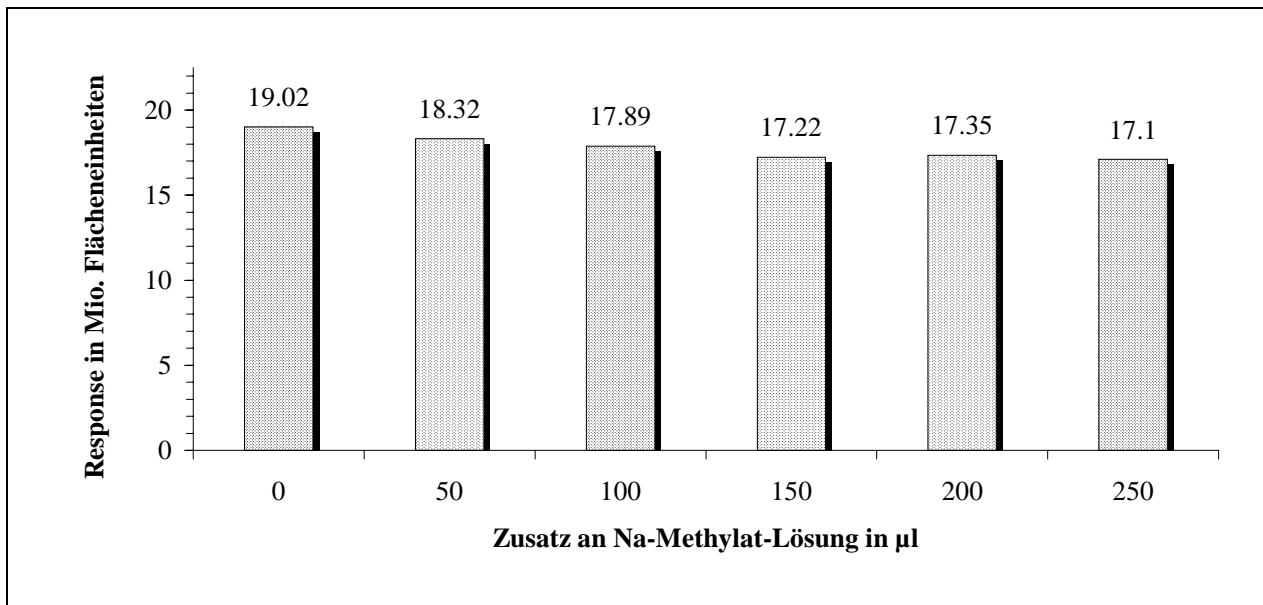


Abbildung 53 *Response des 13S-HPOD-Me-Esters in Abhängigkeit von der Menge zugesetzter Natriummethylatlösung (HPLC-Untersuchung mit Fluoreszenzdetektion)*

4.6.5 Photometrische Bestimmung der Lipidhydroperoxide in den Ölproben

Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte mit Hilfe des FOX2-Testes nach der in Kapitel 4.2.2.4 beschriebenen Methode. Abweichend von der Originalliteratur^{68,69} wurde jeweils mit 1-Propanol anstelle von Methanol gearbeitet, da sich die im Öl enthaltenen Triglyceride nicht oder nur sehr schwer in Methanol lösen.

Um den Einfluß des verwendeten Lösungsmittels zu bestimmen, wurden bei 60 °C gelagerte Ölproben jeweils in Methanol und 1-Propanol gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Die Verwendung von 2-Propanol, wie sie Heinmöller und Stöckmann^{11,36} beschrieben, erwies sich als nicht geeignet, da sich die Reagenzienlösung bereits ohne Zusatz von Peroxiden beim Verdünnen mit 2-Propanol tief blau färbte. Beide Verdünnungsreihen wurden mit dem FOX2-Test in dem jeweils benutzten Lösungsmittel vermessen (Abbildung 54).

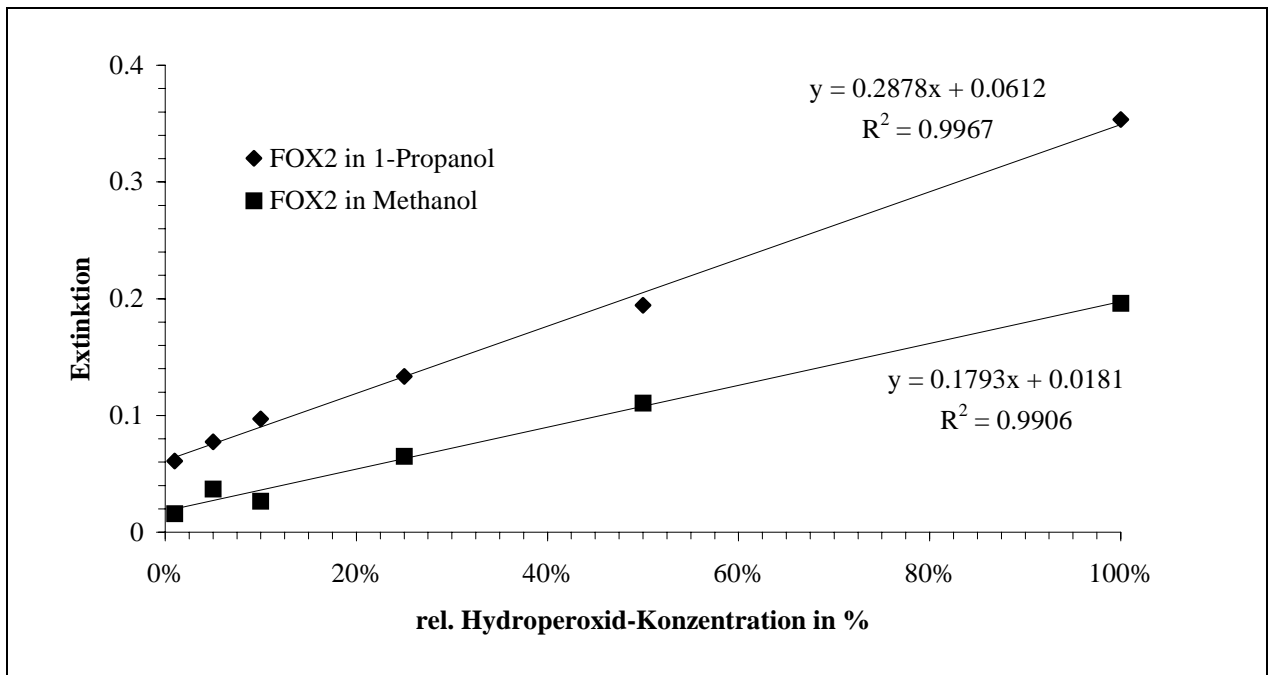


Abbildung 54 Abhängigkeit des FOX2-Testes vom verwendeten Lösungsmittel

Analog zu früheren Versuchen ergab sich für beide Lösungsmittel jeweils ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Extinktion und der eingesetzten Hydroperoxidmenge. Eine leichte Steigerung der Empfindlichkeit bei der Verwendung von 1-Propanol anstelle von Methanol konnte ebenfalls beobachtet werden. Die Durchführung des FOX2-Testes in 1-Propanol war deshalb ohne Probleme möglich.

Zur Hydroperoxidbestimmung in den aus dem Testgemisch extrahierten Ölproben wurden jeweils ca. 200 mg des Öls eingewogen und in 1-Propanol gelöst. Aufgrund der ansteigenden Hydroperoxidkonzentrationen wurde die Menge des zum Lösen eingesetzten 1-Propanol mit steigender Lagerungsdauer der Proben von 0,5 ml auf 10 ml erhöht. Die Quantifizierung erfolgte über eine für Wasserstoffperoxid in 1-Propanol erstellte Kalibrierkurve. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Aus den erhaltenen Werten konnte durch Umrechnen die Peroxidzahl (POZ) der jeweiligen Probe bestimmt werden. Mit den Werten für die Einwaage und den zuvor bestimmten Wassergehalten der einzelnen Lebensmittelgemische wurde dann die berechnete Peroxidzahl auf die Trockenmasse bezogen.

In nachstehenden Diagrammen sind die erhaltenen POZ-Werte in Abhängigkeit von den entsprechenden a_w -Werten aufgetragen. Die zugrunde liegenden Daten sind im Anhang in Kapitel 6.9.1 dargestellt.

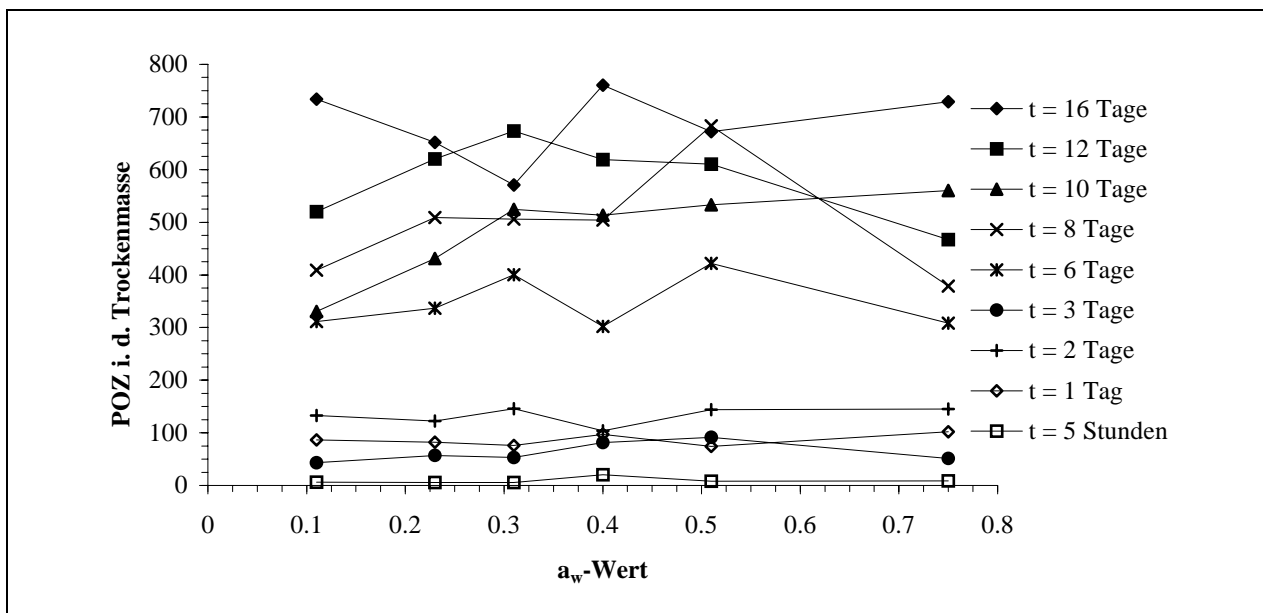


Abbildung 55 Abhängigkeit der Peroxidzahl vom a_w -Wert mit Hilfe des FOX2-Testes (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen)

Ein Zusammenhang zwischen dem a_w -Wert und dem Ausmaß der Lipidoxidation, wie er in Abbildung 52 dargestellt ist, konnte mit dem FOX2-Test nicht festgestellt werden. Trägt man die erhaltenen Werte für die einzelnen Proben in Abhängigkeit von der Reaktionszeit auf, so erkennt man deutlich den mit der Zeit zunehmenden Oxidationsgrad der Proben (Abbildung 56). Das leichte Abflachen der Kurven am Ende des Beobachtungszeitraumes kann mit einem Zerfall der gebildeten Hydroperoxide erklärt werden.

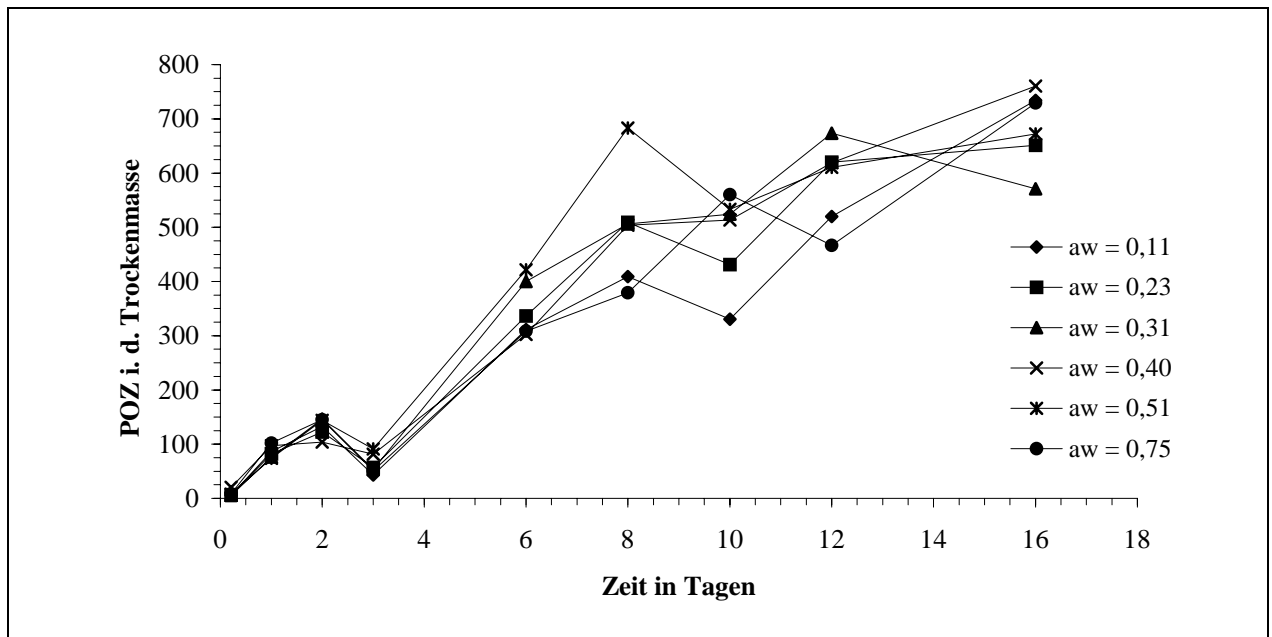


Abbildung 56 Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Oxidation von Lebensmittelgemischen verschiedener a_w -Werte mit dem FOX2-Test (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen)

4.6.6 Bestimmung des Hydroperoxidgehaltes der Ölproben mittels HPLC

Zur HPLC-Untersuchung der extrahierten Ölproben bot es sich an, das in Kapitel 4.5 entwickelte Nachsäulenderivatisierungssystem mit Fluoreszenzdetektion auf der Basis von immobilisierter Mikroperoxidase einzusetzen. Darüber hinaus wurde auch ein von Boddenberg¹⁰⁴ entwickeltes Verfahren mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion auf der Basis von N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin zur Untersuchung der Ölproben genutzt. Für die einzelnen Bestimmungen wurden die Proben jeweils mit Natrium-methylat zu den entsprechenden Methylestern umgeestert, um Störungen durch die schlechte Löslichkeit der Triglyceride in den verwendeten Lösungsmitteln auszuschließen.

4.6.6.1 HPLC-Untersuchung mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion

Der schematische Aufbau des verwendeten HPLC-Systems ist im Anhang in Kapitel 6.6.5 dargestellt. Die Geräteparameter sind in nachstehender Tabelle aufgeführt:

Trennsäule	Merck RP-Select B; 5 μ m; 125-4
Enzymreaktor	20-4, effektive Länge 17 mm gefüllt mit MP-11 immobilisiert auf Aminopropyl-CPG-Beads (Beadsorte 50/63,2)
Eluent	Methanol/Wasser, 90/10 v/v; 0,5 ml/min
Reagenz	4 mg 4-Hydroxyphenylelessigsäure in 250 ml Boratpuffer 10 mmol/l; pH 10; 0,4 ml/min
Detektionswellenlänge UV/VIS-Detektor	0-7,5 min: $\lambda = 234$ nm 7,5-20 min: $\lambda = 200$ nm
Detektionswellenlängen Fluoreszenz-Detektor	$\lambda_{\text{ex}} = 234$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 415$ nm

Tabelle 34 Geräteparameter zur HPLC-Bestimmung von Ölproben mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung

Neben der hohen Selektivität der enzymatischen Nachsäulenderivatisierung bot dieses System den weiteren Vorteil, daß parallel zur Messung der Hydroperoxide auch eine Bestimmung der zugehörigen Fettsäuren möglich war. Dazu wurde die Detektionswellenlänge des verwendeten UV/VIS-Detektors in den ersten 7,5 Minuten eines Laufes auf 234 nm eingestellt. Dadurch konnten die bei der Autoxidation und der anschließenden Umesterung des Öls entstandenen Linolsäurehydroperoxide mit konjugiertem Doppelbindungssystem detektiert werden. Nach 7,5 Minuten wurde die Detektionswellenlänge auf 200 nm umgestellt. Auf diese Weise gelang es zusätzlich, auch die aus der Umesterung hervorgegangenen nicht oxidierten Fettsäuremethylester mit isolierter Doppelbindung zu detektieren.

In Abbildung 57 sind zwei typische Chromatogramme einer umgeesterten Distelölprobe dargestellt.

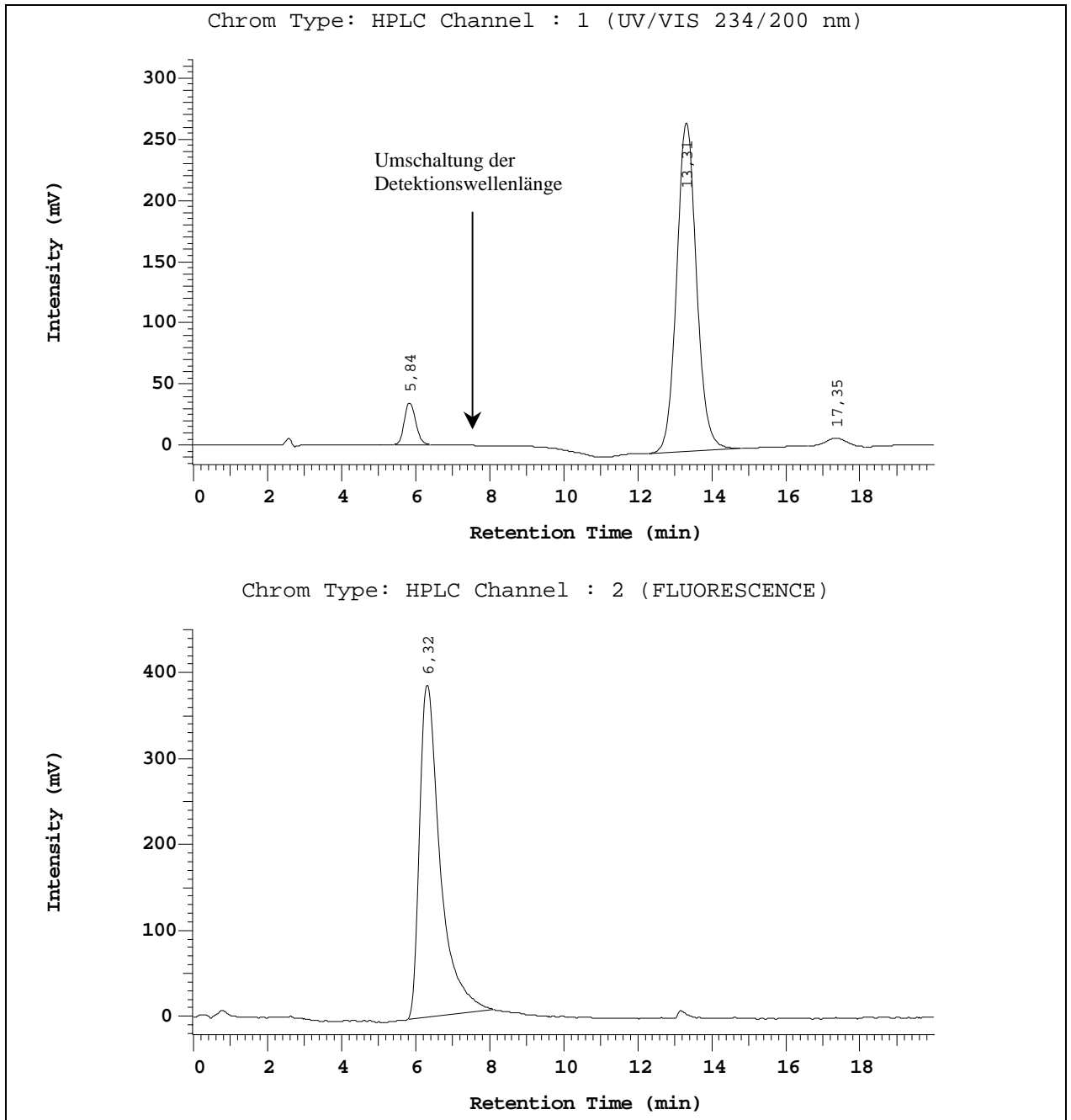


Abbildung 57 Chromatogramme einer mit Natriummethylat umgeesterten Distelölprobe (Lagerungszeit 23 Tage, a_w -Wert 0,40)
 oberes Chromatogramm: UV/VIS-Detektion mit Wellenlängenumschaltung von 234 nm auf 200 nm bei 7,5 min;
 unteres Chromatogramm: Fluoreszenzdetektion mit immobilisierter Mikroperoxidase/PES;
 $t_R = 5,84$ bzw. 6,32 min: Hydroperoxide des Linolsäuremethylester;
 $t_R = 13,31$ min: Linolsäuremethylester

Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Konzentrationsreihe von 13*S*-Hydroperoxy-octadeca-9(*Z*),11(*E*)-diensäuremethylester (5-100 $\mu\text{mol/l}$) mit der HPLC vermessen. Die erhaltene Kalibriergerade ist im Anhang in Kapitel 6.9.2 dargestellt. Eine eindeutige Abnahme der Konzentration des nichtoxidierten Fettsäuremethylesters mit fortschreitender Lagerungszeit konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr blieb der Gehalt bezogen auf die Trockenmasse bei allen Proben über den gesamten Beobachtungszeitraum annähernd gleich. Ursache dafür war die langsame Bildung der Hydroperoxide, die in bezug auf die Menge der Ausgangsverbindungen nur zu geringen Änderungen der Probenzusammensetzung führte. Da die Lipidhydroperoxide mit konjugierten Doppelbindungen im Vergleich zu den nichtoxidierten Fettsäuremethylestern wesentlich größere molare Extinktionskoeffizienten haben, konnte schon die Entstehung kleiner Hydroperoxidmengen gut beobachtet werden, während der entsprechende Konzentrationsabfall bei den Fettsäuremethylestern kaum sichtbar wurde.

Die bei der Vermessung der Proben mittels UV- und Fluoreszenzdetektion erhaltenen Hydroperoxidkonzentrationen wurden auf den Gehalt in g HP/kg Trockenmasse umgerechnet und gegen die einzelnen a_w -Werte der Proben bzw. gegen die Lagerungszeit aufgetragen (Abbildungen 58 - 61).

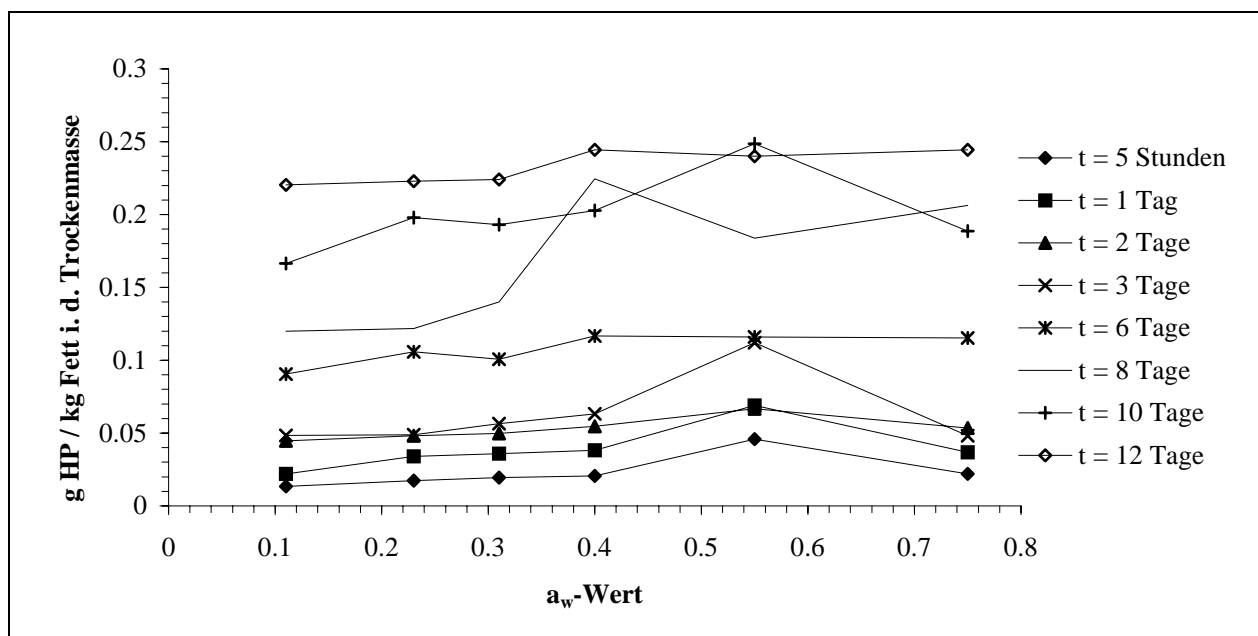


Abbildung 58 Oxidation von Distelöl in Abhängigkeit vom a_w -Wert (HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

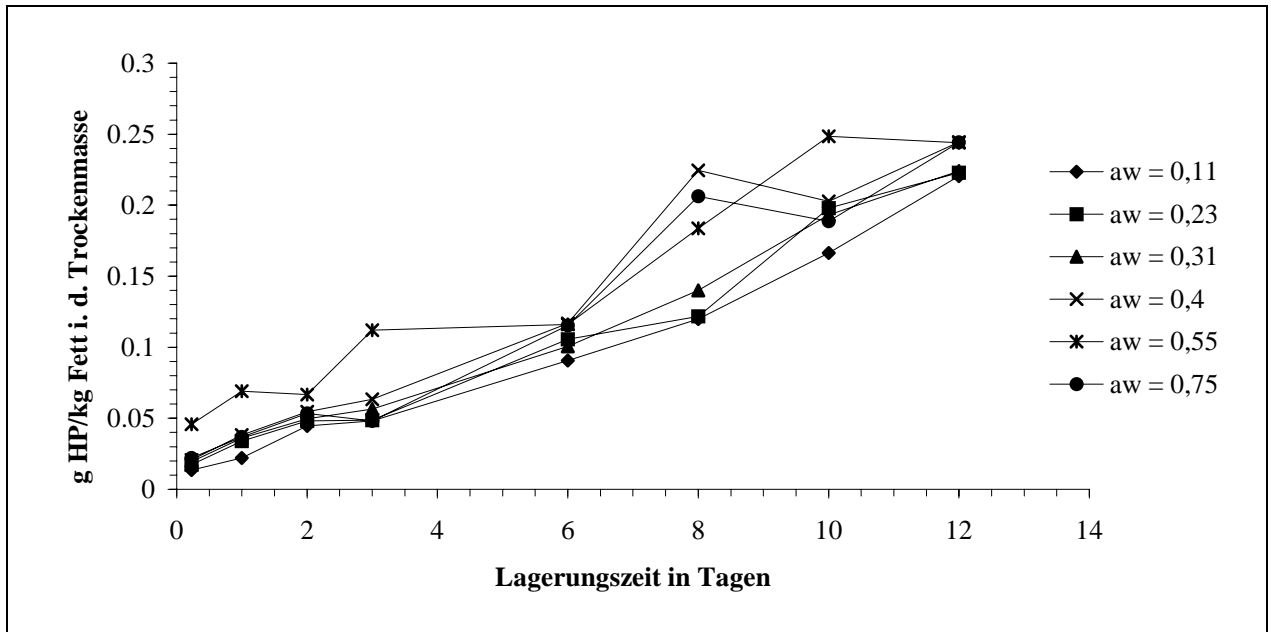


Abbildung 59 Zeitliche Änderung der Hydroperoxidkonzentration während der Oxidation von Distelöl bei verschiedenen a_w -Werten (HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

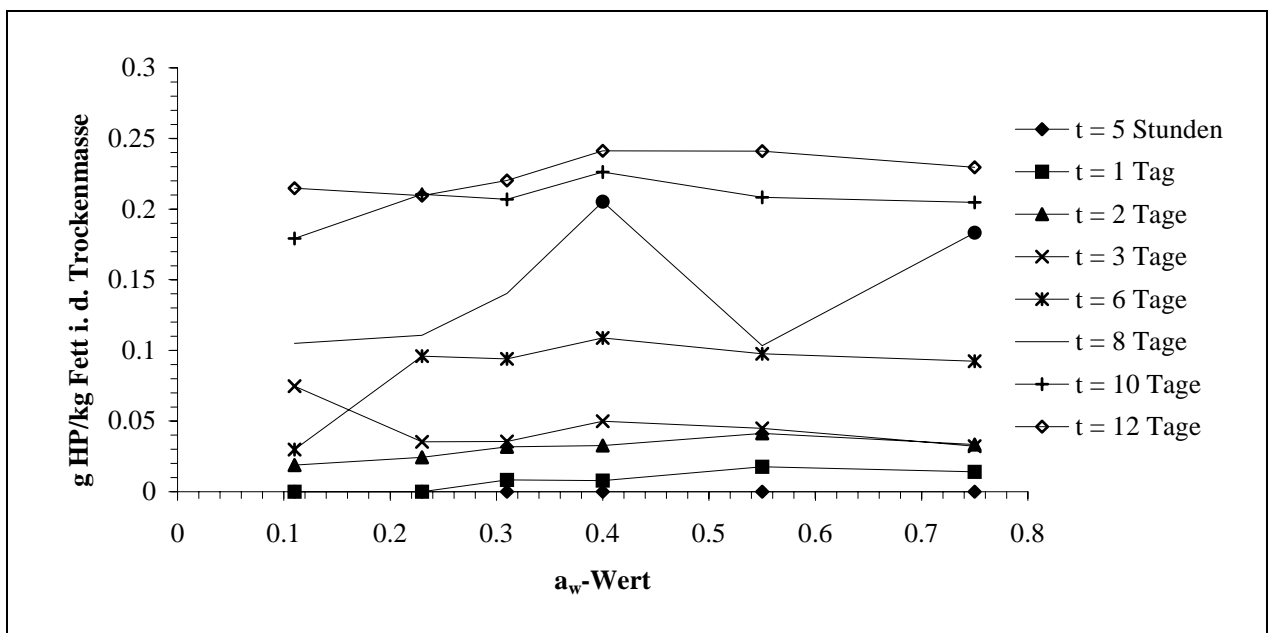


Abbildung 60 Oxidation von Distelöl in Abhängigkeit der vom a_w -Wert (HPLC-Bestimmung mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenz-Detektion; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

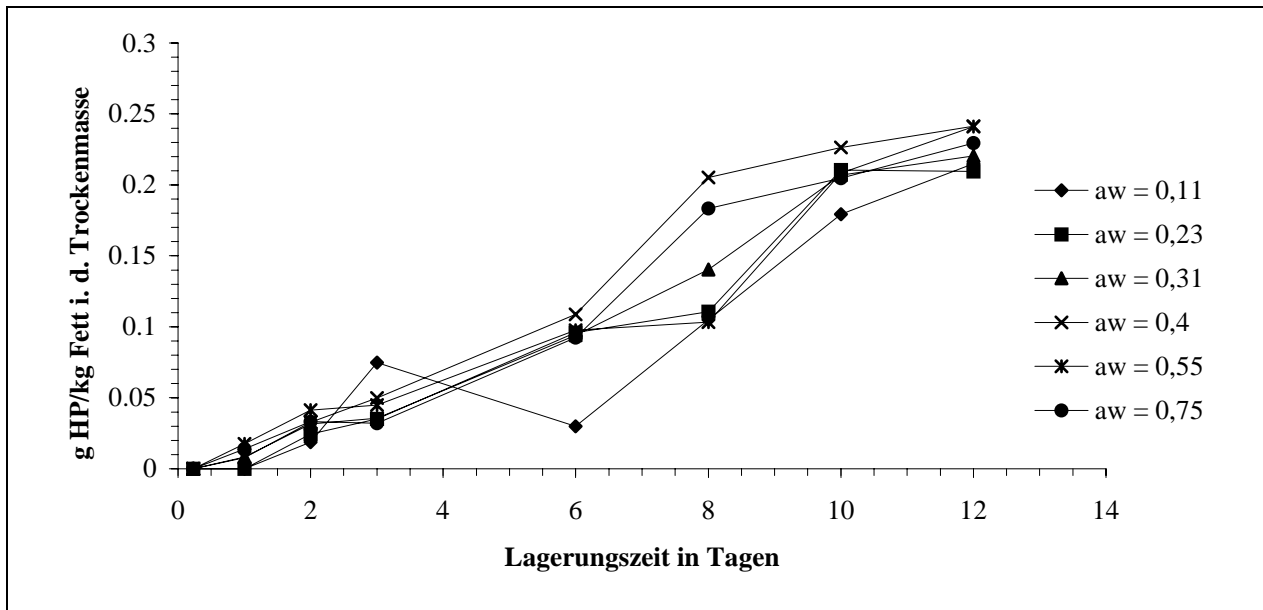


Abbildung 61 Zeitliche Änderung der Hydroperoxidkonzentration während der Oxidation von Distelöl bei verschiedenen a_w -Werten (HPLC-Bestimmung mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenz-Detektion; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

Wie die Diagramme zeigen, konnte auch bei diesen Untersuchungen die in Abbildung 52 dargestellte Abhängigkeit zwischen Lipidoxidation und a_w -Wert nicht festgestellt werden. Die mit UV- und Fluoreszenzdetektion erhaltenen Werte ergaben bei entsprechender Auftragung gegen den a_w -Wert bzw. gegen die Lagerungszeit jeweils ähnliche Kurvenverläufe. Analog zum FOX2-Test war auch hier der zeitliche Verlauf der Oxidation bei den einzelnen Proben gut zu erkennen.

4.6.6.2 HPLC-Untersuchung mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion

Zur HPLC-Untersuchung der Ölproben mit einem nichtenzymatischen Nachsäulenderivatisierungssystem und UV/VIS-Detektion wurde ein von Boddenberg¹⁰⁴ entwickeltes Verfahren auf der Basis von N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD) eingesetzt. Die dort angegebenen Konzentrationen der Reagenzien wurden beibehalten. Zur Optimierung des Response wurde jedoch die Flußrate des Reagenzes von ursprünglich 0,5 ml/min auf 0,25 ml/min gesenkt (vgl. Abbildung 62).

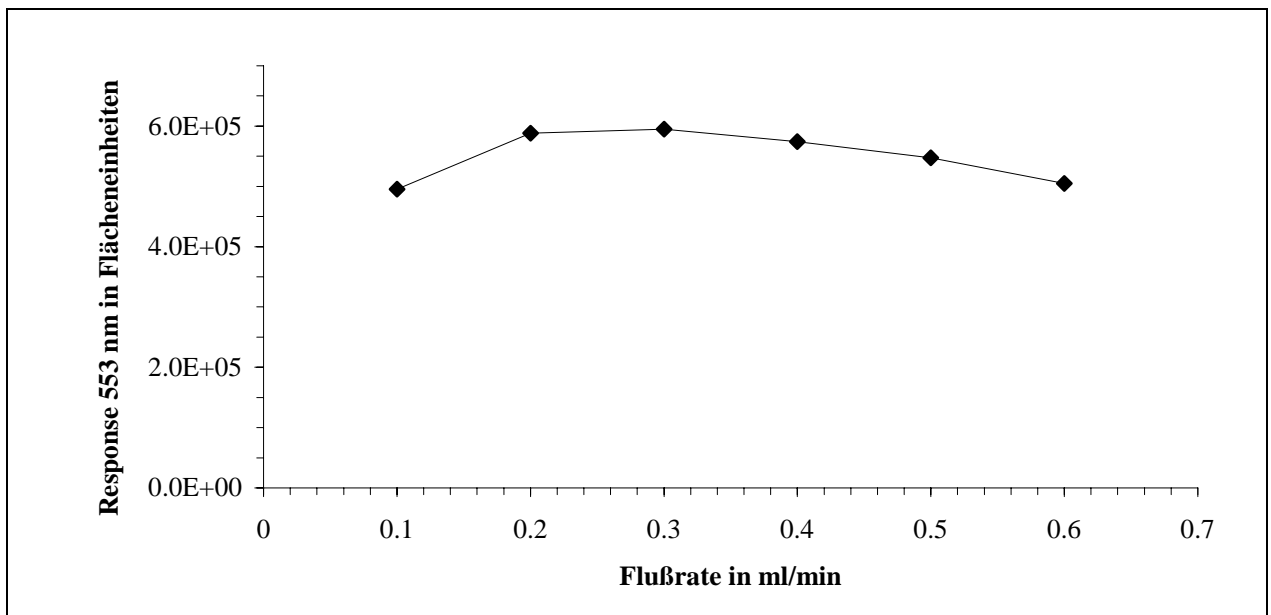


Abbildung 62 Abhängigkeit des Response von der Flußrate der Reagenzienlösung bei der DMPD-Nachsäulenderivatisierung (Detektionswellenlänge 553 nm; als Standard 13S-HPOD-Me-Ester in Methanol 10 $\mu\text{mol/l}$)

Der schematische Aufbau des verwendeten HPLC-Systems ist im Anhang in Kapitel 6.6.5 abgebildet. Die zugehörigen Geräteparameter sind in nachstehender Tabelle aufgeführt:

Trennsäule	Merck RP-Select B; 5 μm ; 125-4
Reaktionskapillare	Flex-Kapillare 0,12 mm ID, Länge 1 m
Eluent	Methanol/Wasser, 90/10 v/v; 0,5 ml/min
Reagenz	2 ml H_2SO_4 (175 g/l), 700 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$; 1000 mg N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid mit tridest. H_2O auf 500 ml aufgefüllt Flußrate: 0,25 ml/min
Detektionswellenlänge UV/VIS-Detektor	553 nm

Tabelle 35 Geräteparameter zur HPLC-Bestimmung von Ölproben bei nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung mit DMPD

Die gleichzeitige Detektion oxidierter und nichtoxidierter Fettsäuremethylester, wie sie in Abbildung 57 dargestellt ist, gelang mit dieser Methode nicht. Eine Umschaltung der Detektionswellenlänge auf 200 nm wäre grundsätzlich möglich gewesen. Da das Reagenz (DMPD), das aufgrund seiner aromatischen Struktur eine sehr starke Absorption im UV-Bereich

aufweist, jedoch schon vor dem UV/VIS-Detektor zugesetzt wurde, wären die aus den Fettsäuremethylestern resultierenden, schwachen Signale verdeckt worden. Bei der Nachsäulenderivatisierung mit DMPD handelt es sich ebenfalls um ein für Hydroperoxide selektives Verfahren. Die Abhängigkeit des Hydroperoxidgehaltes vom a_w -Wert bzw. von der Lagerungsdauer konnte deshalb auch hier gut beobachtet werden (vgl. Abbildungen 63 und 64).

Analog zu der zuvor erwähnten HPLC-Bestimmung mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion wurde ebenfalls zunächst eine Konzentrationsreihe von 13S-Hydroperoxy-octadeca-9(Z),11(E)-diensäuremethylester im Bereich von 5-100 $\mu\text{mol/l}$ vermessen. Die Meßwerte der Proben wurden daraufhin mittels der Kalibriergeraden umgerechnet und unter Berücksichtigung des Wassergehaltes auf die Trockenmasse bezogen. Die erhaltene Kalibriergerade sowie die entsprechenden Meßwerte finden sich im Anhang (Kapitel 6.9.3). In Abbildung 65 auf Seite 125 sind drei typische Chromatogramme dargestellt, die mit der DMPD-UV/VIS-HPLC erhalten wurden.

Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen zeigte die Auftragung der aus der HPLC-Bestimmung berechneten Werte für den Hydroperoxidgehalt in der Trockenmasse gegen die entsprechenden a_w -Werte nicht den erwarteten Zusammenhang (Abbildung 63).

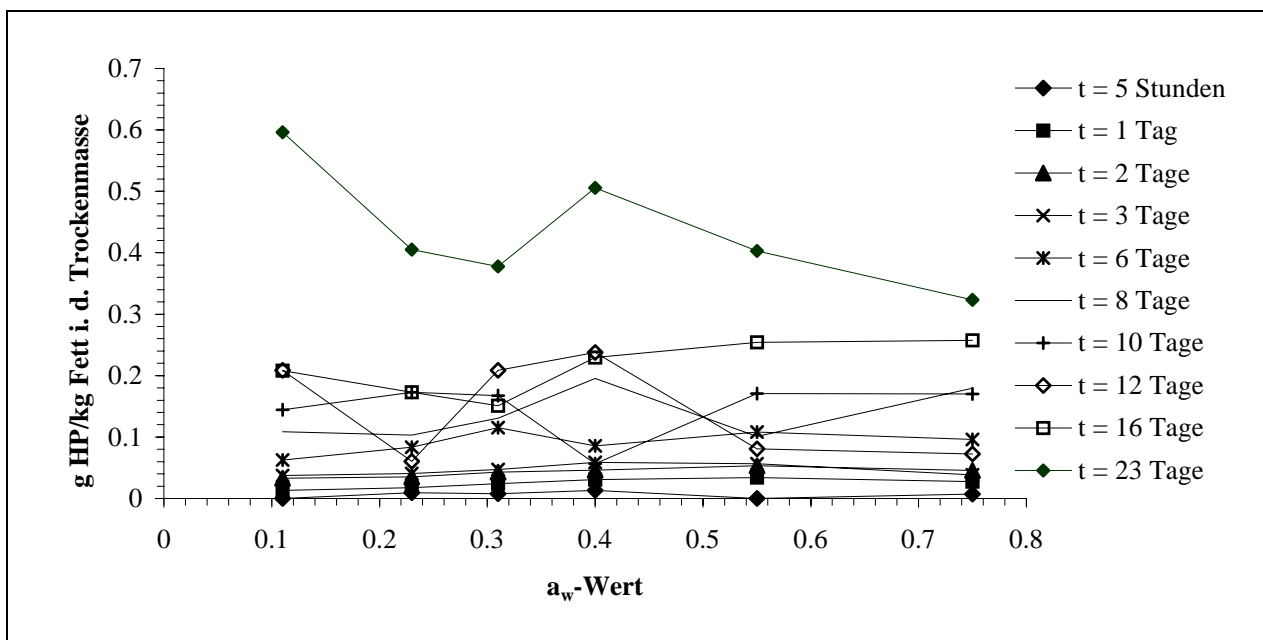


Abbildung 63 Oxidation von Distelöl in Abhängigkeit der a_w -Wert (HPLC-Bestimmung mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung (DMPD-System); Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

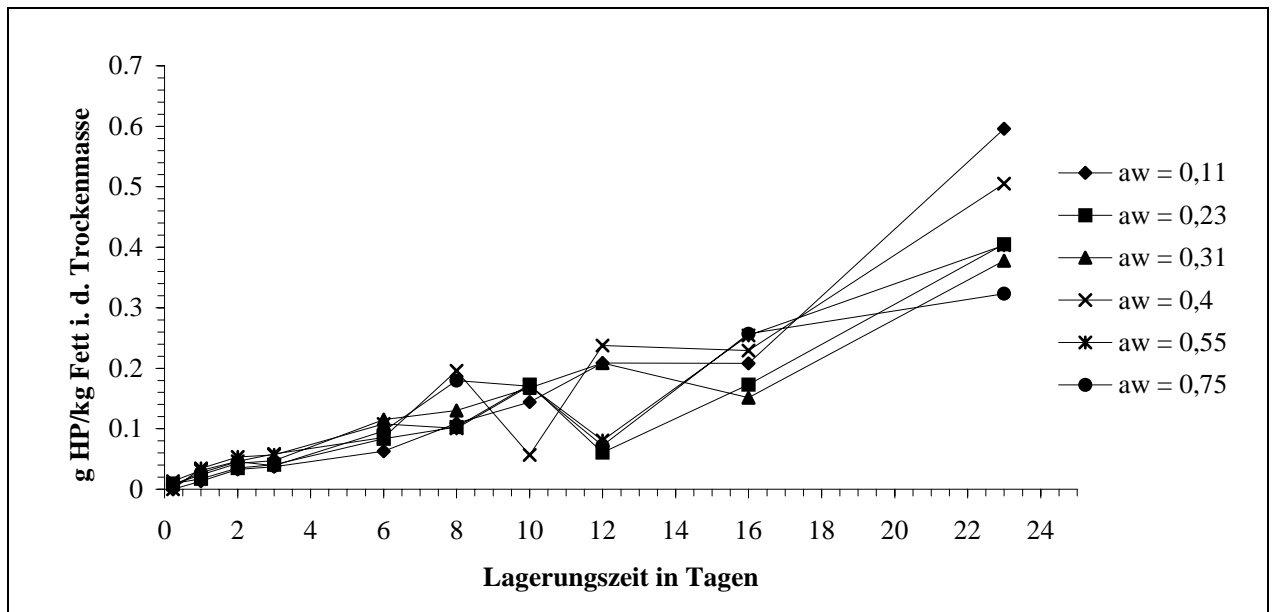


Abbildung 64 Zeitliche Änderung der Hydroperoxidkonzentration während der Oxidation von Distelöl bei verschiedenen a_w -Werten (HPLC-Bestimmung mit nicht-enzymatischer Nachsäulenderivatisierung (DMPD-System); Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

4.6.7 Diskussion der Ergebnisse

Sowohl die Bestimmung oxidierteter Distelölproben mit photometrischen Methoden (FOX2- und TMPD-Test) als auch mit HPLC-Methoden konnte die in Abbildung 52 dargestellte Abhängigkeit der Lipidoxidation vom a_w -Wert nicht bestätigen. Vielmehr deuteten die Ergebnisse darauf hin, daß die Proben unabhängig vom jeweiligen Wassergehalt in etwa gleiche, im Verlauf der Lagerung ansteigende Hydroperoxidgehalte aufwiesen. Da die genauen Versuchsbedingungen, die dem von Labuza¹⁶³ skizzierten Verlauf der Lipidoxidation zugrunde lagen (insbesondere Art und Beschaffenheit des untersuchten Probenmaterials), nicht aus der Literatur hervorgingen, ist eine Deutung der hier erhaltenen Ergebnisse schwierig.

Die Erklärung der oben beschriebenen Zusammenhänge geht davon aus, daß im Lebensmittel Prooxidantien, wie z.B. Metallionen, vorhanden sind. Das bedeutet, daß ein entsprechender Verlauf der Lipidoxidation beim Fehlen solcher Prooxidantien nicht zu erwarten ist. In diesem Fall muß die Reaktionskette der Autoxidation durch Fettsäureradikale weitergeführt werden, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften nicht über Hydrathüllen weitergeleitet werden können (vgl. Abbildung 2). Die Reaktionskette bleibt somit nur lokal begrenzt und findet fast nur in den äußeren Probenschichten statt. Auch die Startreaktion der Autoxidation erfolgt

beim Fehlen von Prooxidantien nur an der Oberfläche der Probe, da nur hier die Probe mit Sauerstoff in Kontakt steht.

Auf der anderen Seite ist es jedoch auch möglich, daß neben den Prooxidantien weitere Verbindungen in der Probe vorhanden sind, die den Verlauf der Lipidoxidation entsprechend beeinflussen, wie z.B. Antioxidantien. Allerdings sollte deren Konzentration im Verlauf der Lagerungszeit abnehmen, was letztendlich nur zu einem verzögerten Beginn der Autoxidation führt. Inwieweit diese Begründungen für das hier untersuchte System von Distelöl/Maisstärke zutreffen, steht allerdings nicht fest. Es bedarf deshalb noch weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet, bei denen zunächst der Gehalt an Pro- und Antioxidantien bestimmt werden sollte. Gegebenenfalls müßte auch auf ein anderes Modell-Lebensmittel zurückgegriffen werden. Unabhängig davon wäre es auf jeden Fall wichtig, die genauen Parameter, die dem in Abbildung 52 dargestellten Kurvenverlauf der Lipidperoxidation zugrunde liegen, zu kennen. Bei der HPLC-Analyse der umgeesterten Proben hat sich die in Kapitel 4.4 beschriebene Nachsäulenderivatisierung mit immobilisierter Mikroperoxidase und anschließender Fluoreszenzdetektion gut bewährt. Der eingesetzte Enzymreaktor konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum verwendet werden. Die gemessenen Konzentrationen lagen in der Regel im Bereich der Werte, die auch mit Hilfe anderer HPLC-Detektionsmethoden erhalten wurden. Lediglich bei sehr niedrigen Gehalten, d.h. bei Proben mit kurzer Lagerungsdauer, wurden mit dem Enzymreaktor etwas geringere Werte gefunden. Wie sich später herausstellte, war die Ursache hierfür ein Tailing der erhaltenen Signale aufgrund einer schlechten Packung des Reaktors. Die genaue Integration der Peaks wurde dadurch erschwert. Unabhängig von der eingesetzten Detektionsmethode ergaben sich jeweils die gleichen Abhängigkeiten der Lipidoxidation vom a_w -Wert bzw. von der Lagerungszeit.

Ebenfalls positiv kann die hier durchgeführte Art der Probenaufbereitung bewertet werden. Diese wurde durch den Verzicht der Festphasenextraktion zur Abtrennung nichtoxidierter Triglyceride wesentlich vereinfacht. Fehlerquellen aufgrund geringer bzw. unterschiedlicher Wiederfindungsraten beim Einsatz von Festphasenkartuschen wurden dadurch vermieden. Der aufgrund hohe Anteil nichtoxidierter Fettsäuremethylester in den Proben nach der Umesterung mit Natriummethylat störte die HPLC-Analyse der Hydroperoxyverbindungen nicht. Der Einfluß überschüssigen Natriummethylats als Umesterungsreagenz auf in der Probe vorhandene Hydroperoxide war sehr gering (vgl. Kapitel 4.6.4). Ebenso schien das nach der Umesterung noch vorhandene Natriummethylat keinen Einfluß auf das jeweilige Nachsäulenderivatisierungsverfahren zu haben.

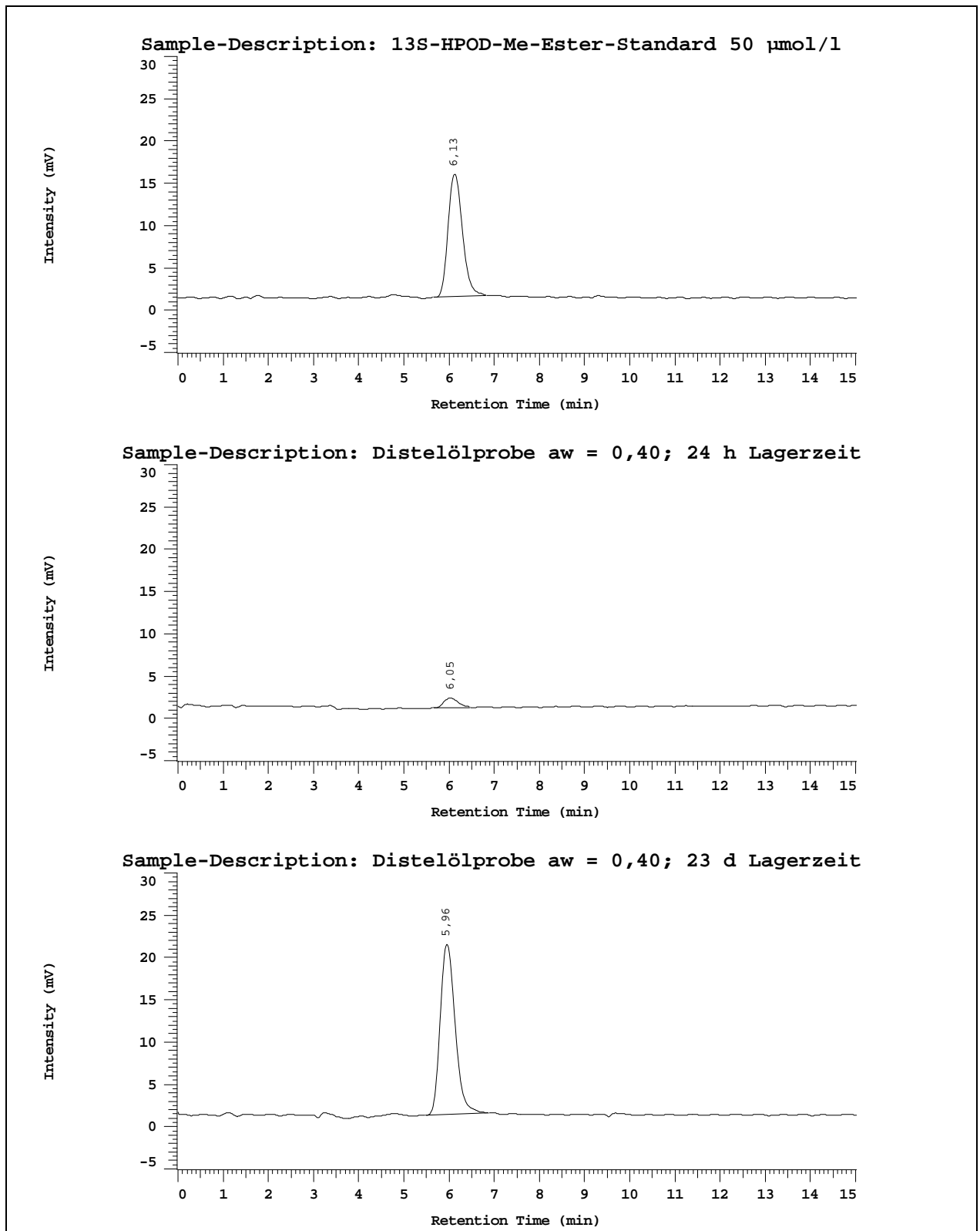


Abbildung 65 Chromatogramme von ungeesterten Distelölproben (DMPD-UV/VIS-HPLC)
oberes Chromatogramm: 13S-HPOD-Me-Ester-Standard 50 µmol/l
mittleres Chromatogramm: Distelölprobe; a_w -Wert 0,40; Lagerungszeit 24 h
unteres Chromatogramm: Distelölprobe; Lagerungszeit 23 d; a_w -Wert 0,40

5 Zusammenfassung und Ausblick

Zur Entwicklung von Detektionssystemen für die HPLC-Bestimmung der biologisch relevanten Lipidhydroperoxide ist es nötig, entsprechende Referenzsubstanzen einzusetzen. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit zunächst verschiedene isomerenreine Hydroperoxyfettsäuren und Hydroperoxyfettsäureester, aber auch Gemische isomerer Hydroperoxyfettsäuremethylester synthetisiert. Dabei konnte in der Regel auf frühere Arbeiten zurückgegriffen werden. Einzelne Syntheseschritte wurden jedoch wesentlich verbessert. So wurde die Verseifung geschützter Fettsäureester enzymkatalysiert durchgeführt und bei der photosensibilisierten Oxidation statt einer Hg-Hochdrucklampe eine Halogenlampe eingesetzt. Dadurch konnte der Anteil an Nebenprodukten, die sich in früheren Arbeiten als störend erwiesen, stark gesenkt werden. Die Identifizierung der synthetisierten Verbindungen erfolgte hauptsächlich durch die ^1H - und die ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Die massenspektrometrische Analyse der gewonnenen Referenzsubstanzen erwies sich hingegen als wenig aussagekräftig. Die synthetisierten Verbindungen dienten als Standards für die Entwicklung einer photometrischen Testmethode für Lipidhydroperoxide auf der Basis von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin. Die mit diesem Test erreichten Nachweisgrenzen entsprachen denen bekannter photometrischer Verfahren (FOX2-Test; Messung der I_3^- -Absorption). In diesem Zusammenhang wurde erneut und im Einklang mit der entsprechenden Literatur festgestellt, daß der oft benutzte TBA-Test (Umsetzung von Aldehyden aus dem Zerfall von Lipidhydroperoxiden mit Thiobarbitursäure zu gefärbten Produkten) eine quantitative Aussage über den Oxidationsgrad von Öl- bzw. Fettproben nicht zuläßt.

Die synthesebegleitende Analytik erfolgte bei der photosensibilisierten Oxidation von Fettsäuremethylestern mit $^1\text{O}_2$ zu den entsprechenden Hydroperoxiden durch die HPLC-Trennung der Reaktionsprodukte an Normalphasen. Sie stellte sich dabei als eine leistungsfähige Methode zur Trennung isomerer Hydroperoxyfettsäuremethylester dar. Allerdings sind auf diesem Gebiet noch weitere Untersuchungen nötig, insbesondere zum Einfluß anderer Eluentensysteme auf die Trennung, um gegebenenfalls die Trennleistung weiter zu verbessern. Ein großer Nachteil der HPLC-Trennung an Normalphasen ist das Fehlen einfacher, für Lipidhydroperoxide selektiver Nachweismethoden. Aus diesem Grunde wurde ein Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung von Hydroperoxiden und anschließender UV/VIS-Detektion in der NP-HPLC auf Grundlage der Oxidation des farblosen 1,5-Diphenylcarbohydrazid zum roten 1,5-Diphenylcarbazon entwickelt. Zur Optimierung des Nachsäulenderivatisierungssystems wurde in dieser Arbeit das Verfahren der sogenannten "linearen statistischen Optimierung"

eingesetzt. Mit Hilfe dieses mathematischen Ansatzes war es möglich, mehrere Parameter gleichzeitig zu variieren. Besonders bei komplexen Optimierungsproblemen bzw. bei längeren Analysenzeiten scheint dieses Verfahren zu einer deutlichen Minimierung des Zeitaufwandes zu führen. Die mit dem so optimierten System erreichte Nachweisgrenze lag mit ca. 17 $\mu\text{mol/l}$ etwas oberhalb der Nachweisgrenze anderer, insbesondere in der RP-HPLC eingesetzter Reaktionsdetektoren.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war weiterhin die Immobilisierung von Mikroperoxidase-11 an mikroporöse Glaspartikel, sogenannte CPG-Beads. Entgegen früheren Arbeiten erfolgte die Bindung des Enzyms an die entsprechend funktionalisierten Beads ohne den Einsatz von Spacer-Molekülen, wodurch eine wesentlich höhere Trägerbelegung und Peroxidaseaktivität erreicht wurde. Die Porengröße und damit auch das Porenvolumen der eingesetzten Beadsorten hatte auf die Peroxidaseaktivität keinen Einfluß. Mit der so immobilisierten Mikroperoxidase wurden Festbettreaktoren hergestellt und diese in ein bereits bestehendes HPLC-System eingebaut. Damit gelang erstmals der Einsatz von immobilisierter MP-11 zur selektiven Fluoreszenzdetektion von Lipidhydroperoxiden in der RP-HPLC. Die bei Einsatz der Enzymreaktoren erreichten Nachweisgrenzen entsprachen mit 1-3 $\mu\text{mol/l}$ denen des ursprünglichen Systems mit in der Reagenzienlösung gelöster Mikroperoxidase.

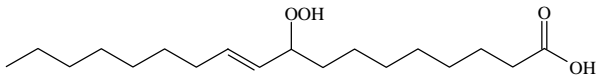
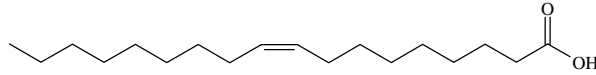
Die Leistungsfähigkeit der entwickelten Enzymreaktoren konnte bei der Untersuchung von oxidierten Ölproben unter Beweis gestellt werden. Bei diesen Untersuchungen wurde versucht, eine in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Fettoxidation eines Modell-Lebensmittels von dessen Wassergehalt nachzuweisen. Als analytische Methoden standen dazu sowohl photometrische Testmethoden als auch UV/VIS- und Fluoreszenz-HPLC-Methoden mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung und mit enzymatischer Nachsäulenderivatisierung auf Grundlage der entwickelten Enzymreaktoren zur Verfügung. Zwar konnte die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit zwischen Lipidoxidation und Wassergehalt nicht nachgewiesen werden, doch lieferten die eingesetzten Methoden übereinstimmende Ergebnisse, so daß mit den entwickelten Enzymreaktoren nun ein empfindliches und kostengünstiges Verfahren zur selektiven Detektion von Lipidhydroperoxiden in Realproben zur Verfügung steht.

Im Rahmen der Untersuchung oxidierten Ölproben konnte weiterhin die Probenvorbereitung durch direkte Umesterung der Proben mit Natriummethylat wesentlich vereinfacht werden. Auf die aufwendige und fehleranfällige Abtrennung nichtoxidierten Probenbestandteile durch Festphasenextraktion konnte verzichtet werden. Der hohe Anteil nichtoxidierten Fettsäureester zeigte keine nachteiligen Auswirkungen in der HPLC-Analytik der Proben.

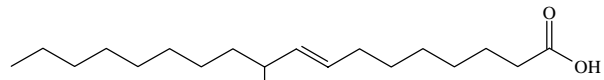
6 Anhang

6.1 Öl-, Linol- und Linolensäure und ihre isomeren Hydroperoxide

Ölsäure

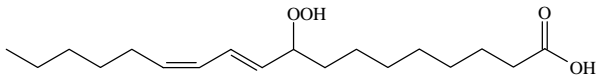
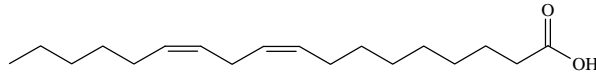


9-HPO

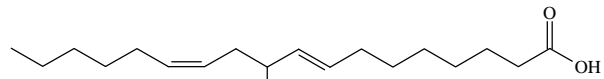


10-HPO

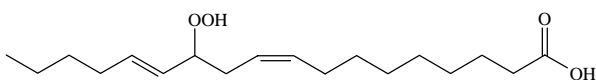
Linolsäure



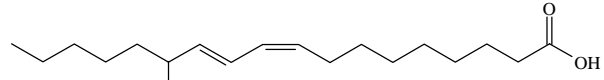
9-HPOD



10-HPOD

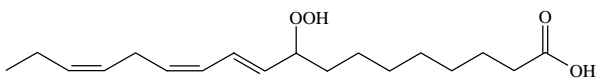
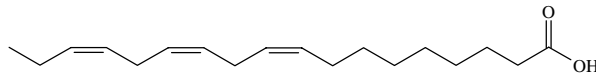


12-HPOD

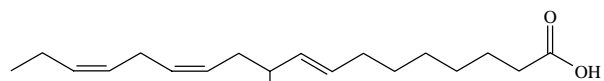


13-HPOD

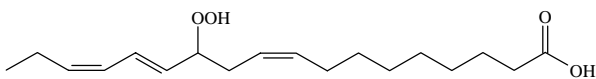
Linolensäure



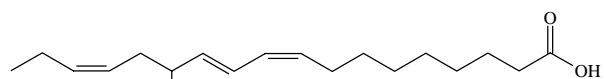
9-HPOT



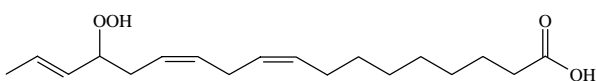
10-HPOT



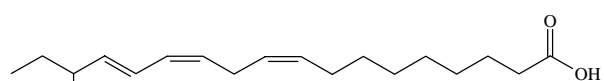
12-HPOT



13-HPOT



15-HPOT



16-HPOT

6.2 Verzeichnis der Abkürzungen

BHT	2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol
br m	breites Multiplett
d	Duplett (bei NMR)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dd	Duplett von Dupletts (bei NMR)
DMPD	N,N-Dimethylphenylen-1,4-diamin
DPC	1,5-Diphenylcarbohydrazid
DPTBA	1,3-Diphenyl-2-thiobarbitursäure
E bzw. ΔE	Extinktion bzw. Änderung der Extinktion
EDAC	1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	electron impact ionization; Elektronenstoßionisation
FOX	ferrous oxidation in xylenol orange
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
9-HPO	9-Hydroperoxyoctadeca-10(<i>E</i>)-ensäure
9-HPOD	9-Hydroperoxyoctadeca-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-diensäure
9-HPOT	9-Hydroperoxyoctadeca-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-triensäure
10-HPO	10-Hydroperoxyoctadeca-8(<i>E</i>)-säure
10-HPOD	10-Hydroperoxyoctadeca-8e,12(<i>Z</i>)-diensäure
10-HPOT	10-Hydroperoxyoctadeca-8e,12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-triensäure
12-HPOD	12-Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),13(<i>E</i>)-diensäure
12-HPOT	12-Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),13(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-triensäure
13-HPOD	13-Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure
13-HPOT	13-Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-triensäure
13 <i>S</i> -HPOD	13 <i>S</i> -Hydroperoxy-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-diensäure
13 <i>S</i> -HPOT	13 <i>S</i> -Hydroperoxy-octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-triensäure
15-HPOT	15-Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>),16(<i>E</i>)-triensäure
16-HPOT	16-Hydroperoxyoctadeca-9(<i>Z</i>),12(<i>Z</i>),14(<i>E</i>)-triensäure
ID	Innendurchmesser
J_{x-y}	Kopplungskonstante zwischen Protonen an C-X und C-Y

LDL	low density lipoproteine
LOOH	Lipidhydroperoxid
m	Multiplett (bei NMR)
MDA	Malondialdehyd
MP-11	Mikroperoxidase-11
MS	Massenspektrometrie
NMR	nuclear magnetic resonance
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC
PES	4-Hydroxyphenyllessigsäure
ppm	parts per million
q	Quartett (bei NMR)
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
s	Singulett (bei NMR)
t	Triplett (bei NMR)
TBA	thiobarbituric acid (Thiobarbitursäure)
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TBA-Test	Thiobarbitursäure-Test
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethylphenylen-1,4-diamin

6.3 Chemikalienliste

4-Aminoantipyrin	Aldrich, Steinheim
Aminopropyl-CPG-Beads	Schuller GmbH, Wertheim
Ammoniak	Merck, Darmstadt
Ammoniumeisen(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Chloroform für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
DC-Folien Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Dicyclohexylcarbodiimid	Merck, Darmstadt
Diethylether, p. a.	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylphenylendiamin	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylphenylendiaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt
1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, 100 % p. a.	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucoseoxidase	Merck, Darmstadt
Hexan für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
	J.T. Baker, Phillipsburg NJ, USA
	SDS, Peypin, Frankreich
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
4-Hydroxyphenylelessigsäure	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid	Merck, Darmstadt
Kieselgel Si60	Merck, Darmstadt
Leuko-Benzoylmethylenblau	DOJINDO Labs, Kumamoto, Japan
Linolensäure	Sigma, Deisenhofen
Linolensäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
Linolsäure	Sigma, Deisenhofen
Linolsäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
Lithiumhydroxid	Riedel de Haën, Seelze

Meerrettichperoxidase	Merck, Darmstadt
Methanol gradient grade für HPLC	Merck, Darmstadt
	J.T. Baker, Phillipsburg NJ, USA
1-Methoxypropen	Aldrich, Steinheim
Mikroperoxidase MP-11	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumtetraborat	Merck, Darmstadt
N-Methyl-N-nitroso-4-toluolsäuresulfonamid (Diazald)	Aldrich, Steinheim
Ölsäure	Sigma, Deisenhofen
Ölsäuremethylester	Sigma, Deisenhofen
Palatase L20000	NovoNordisk, Mainz
Phenol	Merck, Darmstadt
1-Propanol, p. a.	Merck, Darmstadt
2-Propanol, gradient grade für HPLC	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Serva Blau G	Serva, Heidelberg
SPE-Kartuschen (Si60, 1 und 3 ccm)	Varian, Darmstadt
	Merck, Darmstadt
Tetrahydrofuran	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylphenylendiamin	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

6.4 Verzeichnis der verwendeten Geräte

Photometer 100-60 UV/VIS Hitachi, München

HPLC-Anlage Merck-Hitachi:

Eluentenpumpe	Intelligent Pump L-6200 A	Merck, Darmstadt
Reagenzienpumpen	L-6000 A	Merck, Darmstadt
Fluoreszenz-Detektor	F-1080	Merck, Darmstadt
UV/VIS-Detektor	L-4250	Merck, Darmstadt
Autosampler	AS-2000 A	Merck, Darmstadt
Auswertesoftware	HPLC System Manager	Merck, Darmstadt
T-Stück	Mischungs-T-Stück	Alltech, Unterhaching
	Rückdruckregler	Merck, Darmstadt

NMR-Spektroskopie:

Bruker AC 250 Bruker, Karlsruhe

Bruker ARX 400 Bruker, Karlsruhe

Massenspektrometrie:

Sektorfeldgerät MAT 311 A Varian, Darmstadt

Atom-Absorptions-Spektroskopie:

AAS 1100 B Perkin Elmer, Überlingen

Hitachi-Zeeman-Atomabsorptionsspektrometer Z-8000 Hitachi, München

Fluorimetrie:

Kontron SFM25 Kontron, Neufahrn

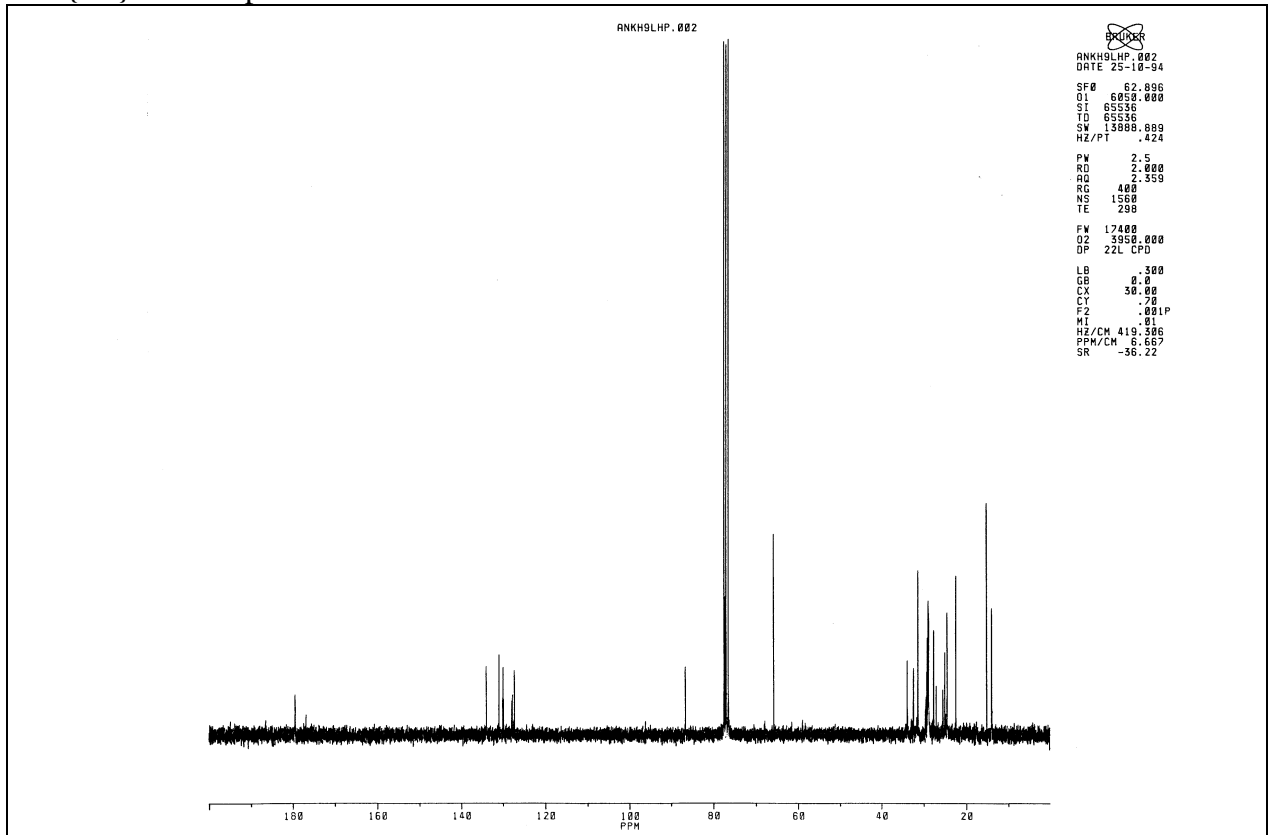
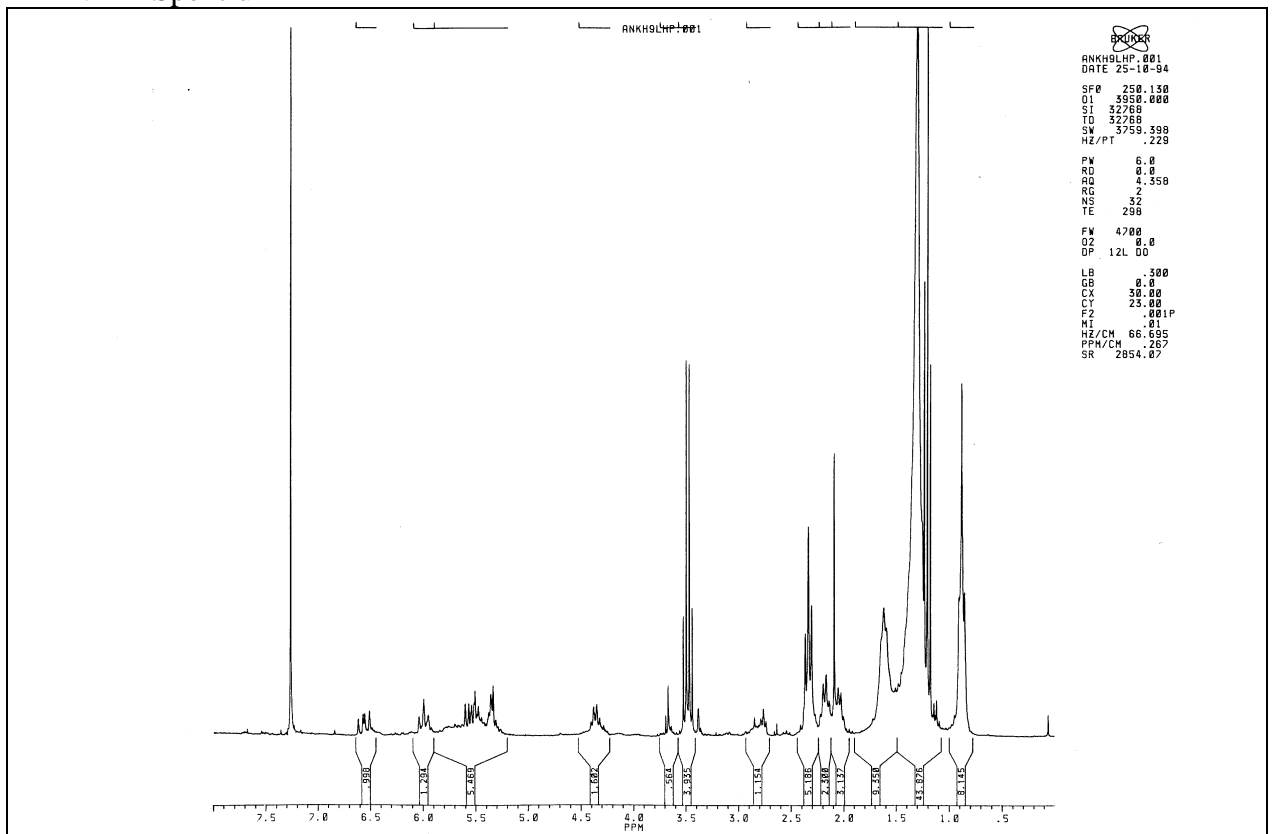
6.5 NMR- und Massenspektren

Nachstehend sind die in dieser Arbeit diskutierten Massen- und NMR-Spektren abgebildet. Da die synthetisierten Substanzen alle von öliger Konsistenz waren, ließ sich das verwendete Lösungsmittel nicht immer vollständig abtrennen. Die sich daraus ergebenden zusätzlichen Signale (vgl. Tabelle 36) konnten jedoch einwandfrei identifiziert werden.

	δ (^1H) in ppm (Multiplizität)	δ (^{13}C) in ppm
Diethylether	1,16 (t)	14,6
	3,36 (t)	65,2
Chloroform	7,24 (s)	77,5
Methanol	3,39 (s)	50,2
Tetrahydrofuran	1,85 (dd)	26,5
	3,75 (t)	68,4

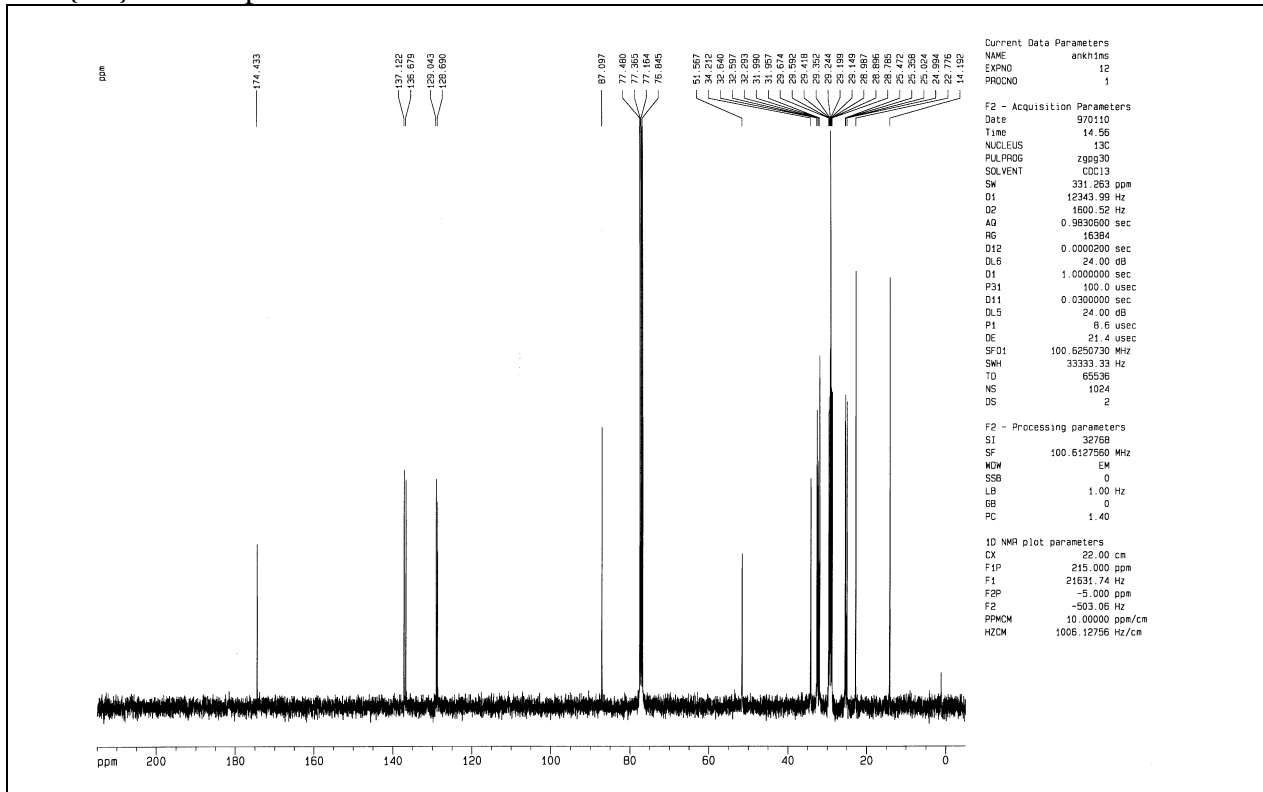
Tabelle 36 NMR-Daten verschiedener Lösungsmittel¹⁶⁷

6.5.1 9S-Hydroperoxyoctadeca-10(E),12(Z)-diensäure (I)

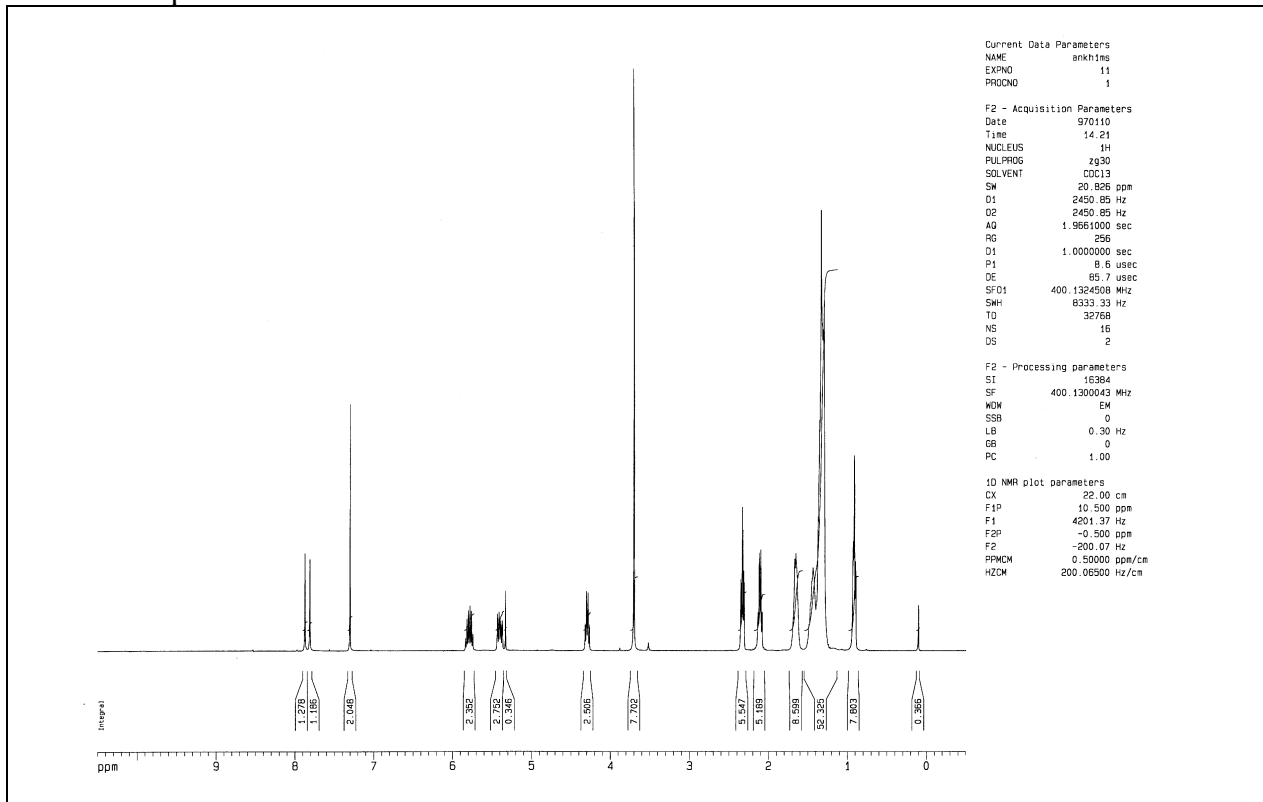
 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum ^1H -NMR-Spektrum

6.5.2 Hydroperoxide des Ölsäuremethylesters aus der photosensibilisierten Oxidation

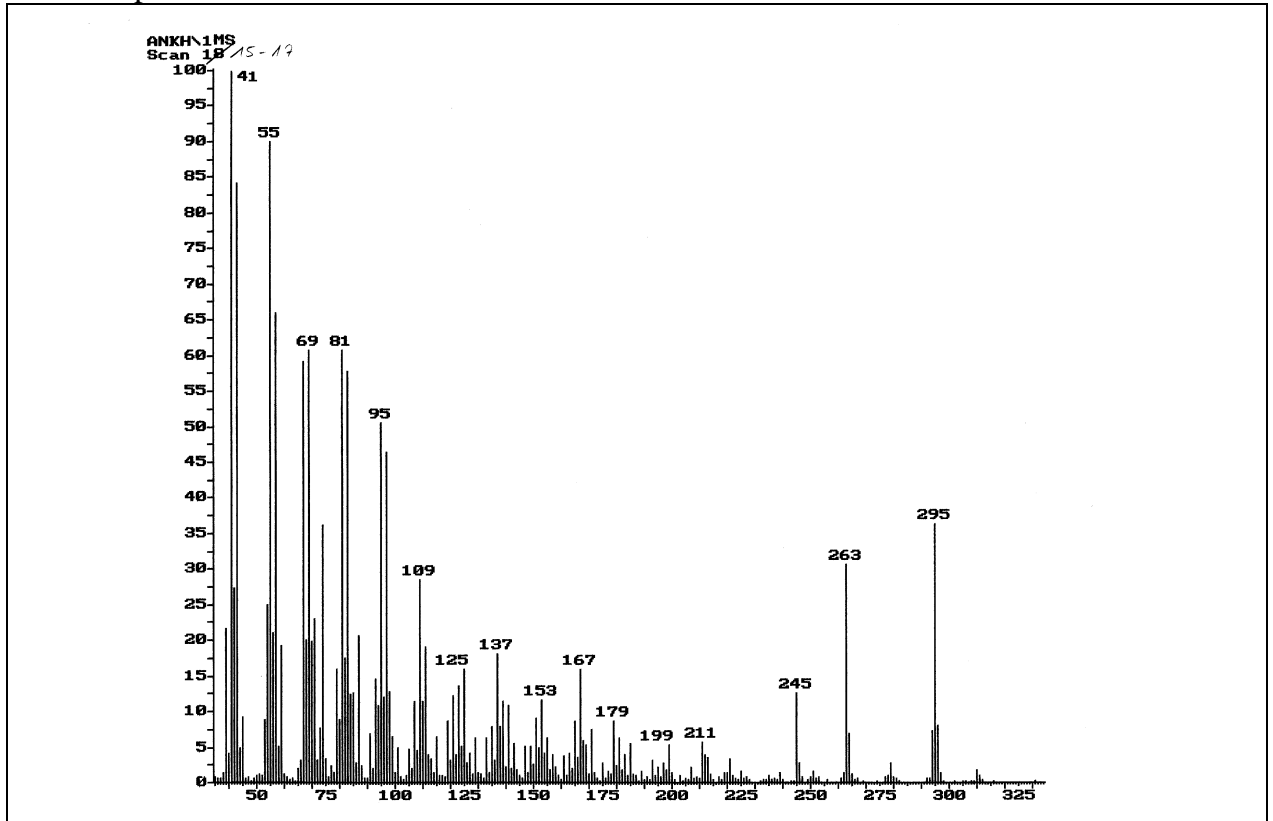
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum



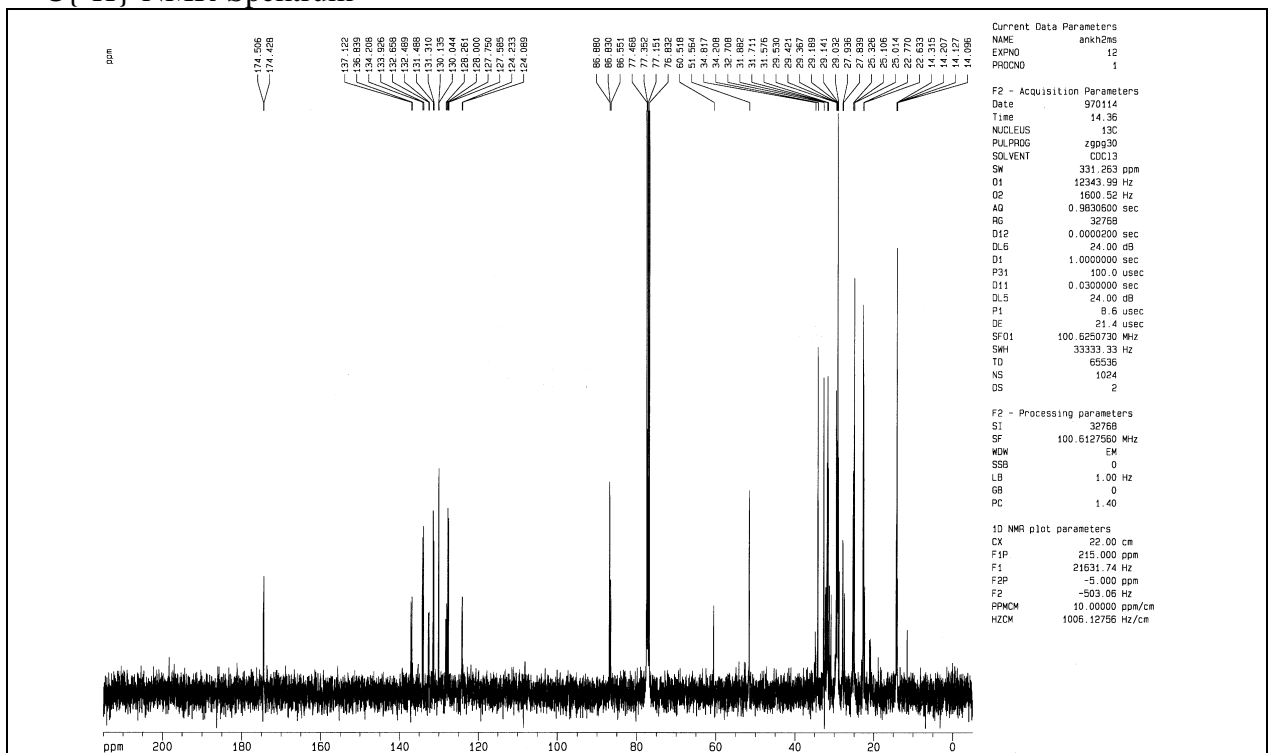
^1H -NMR-Spektrum



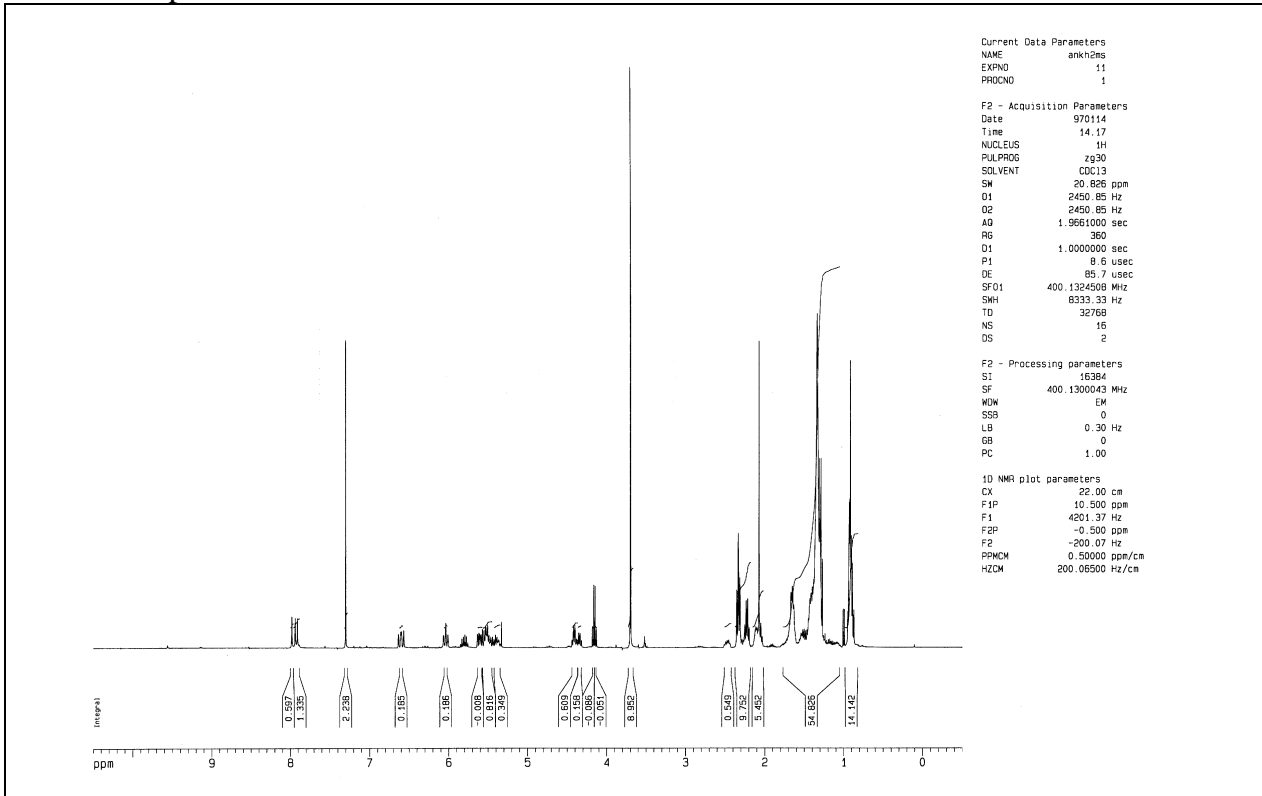
Massenspektrum



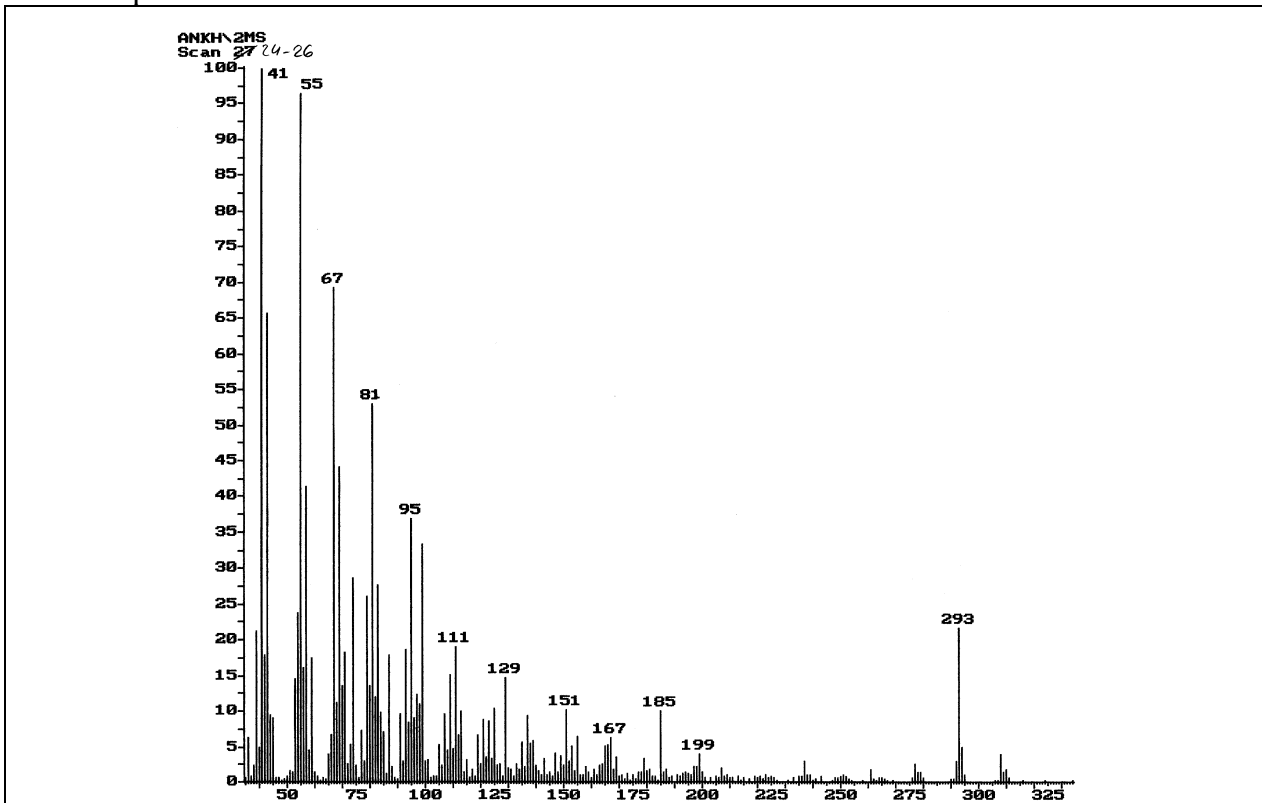
6.5.3 Hydroperoxide des Linolsäuremethylesters aus der photosensibilisierten Oxidation

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

¹H-NMR-Spektrum

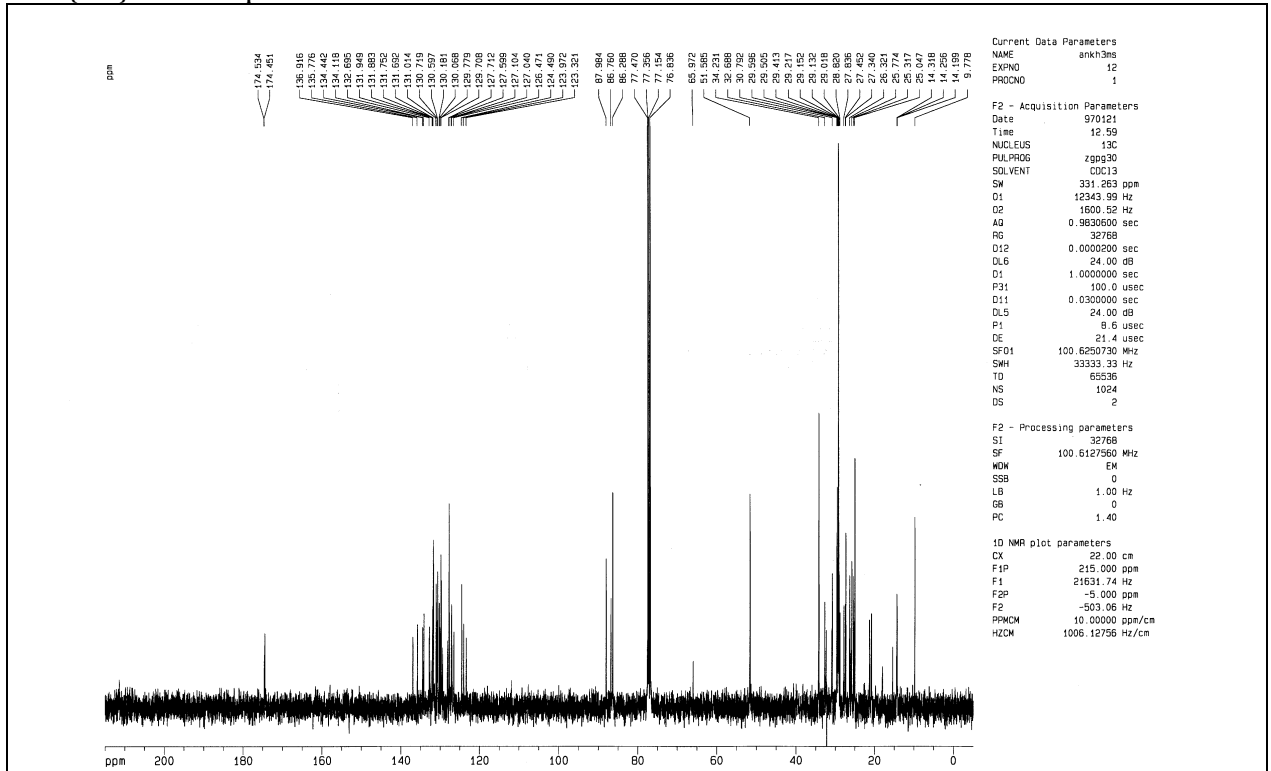


Massenspektrum

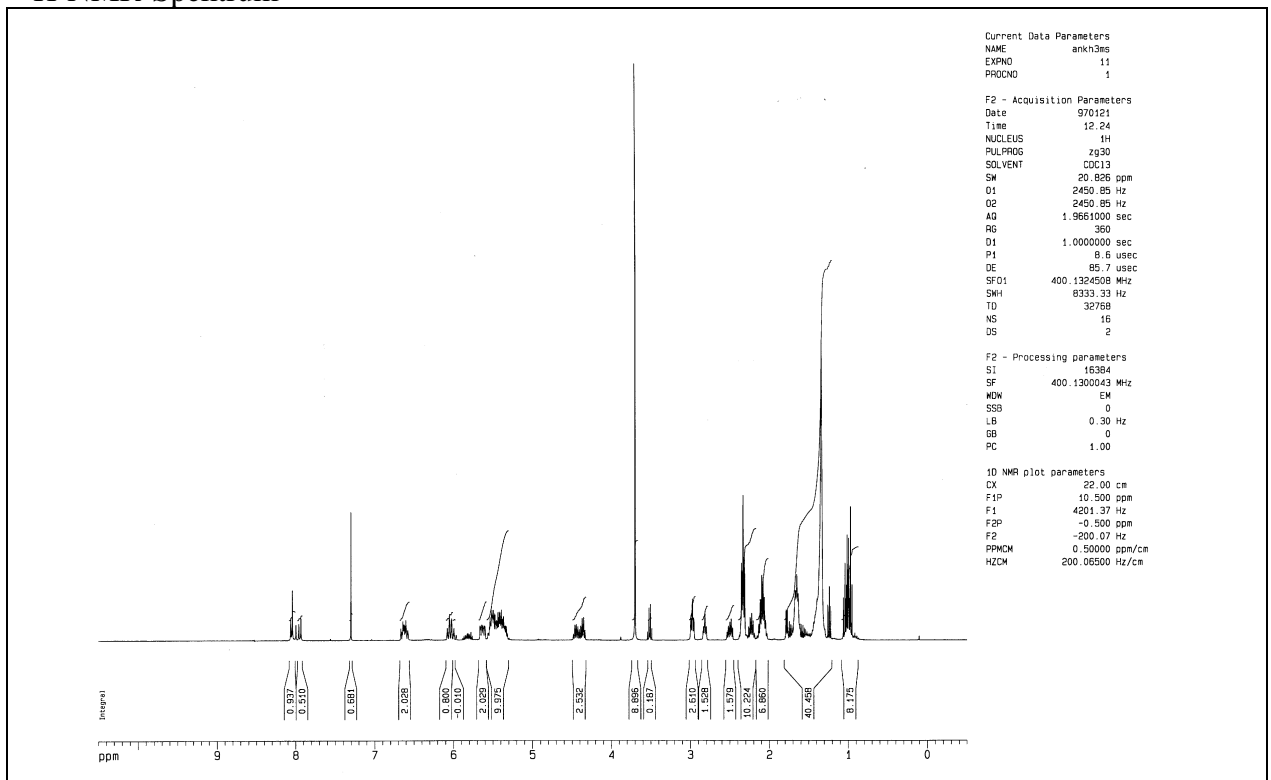


6.5.4 Hydroperoxide des Linolensäuremethylesters aus der photosensibilisierten Oxidation

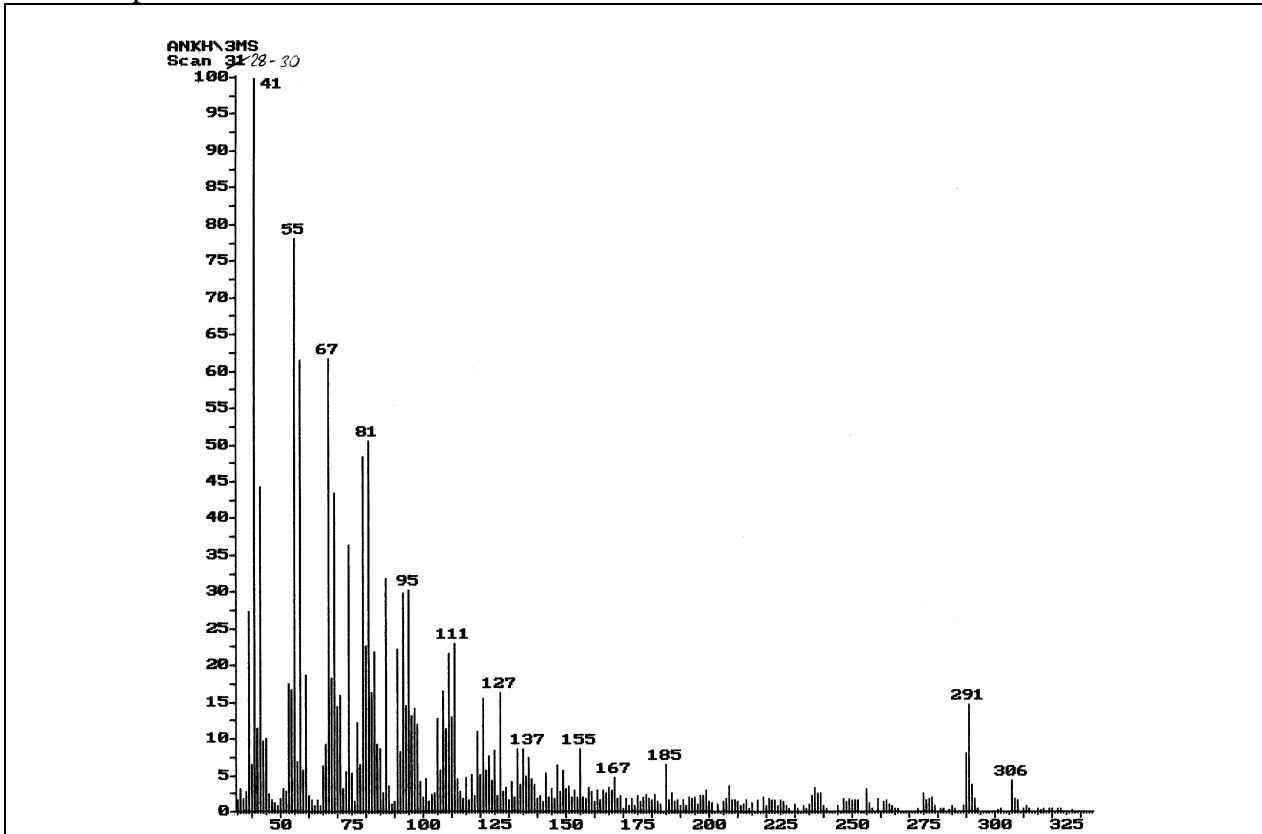
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum



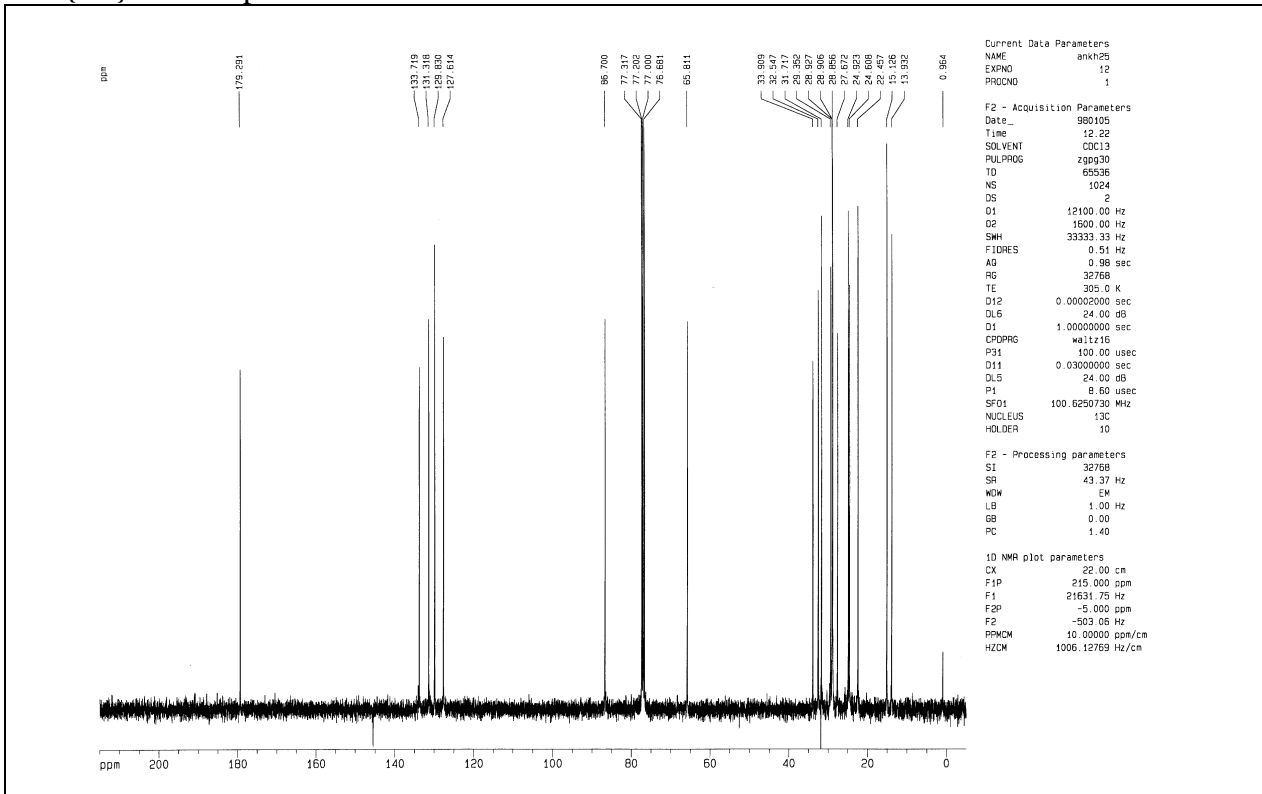
^1H -NMR-Spektrum

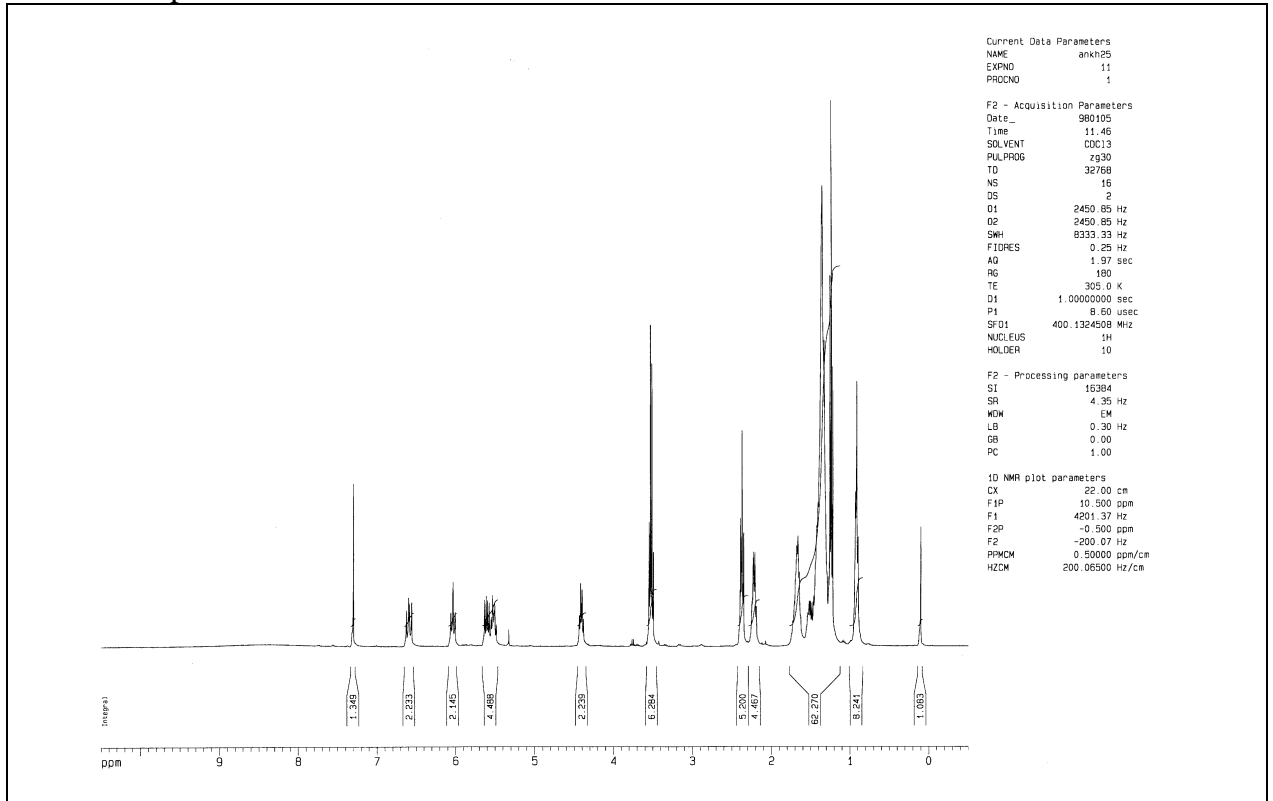


Massenspektrum

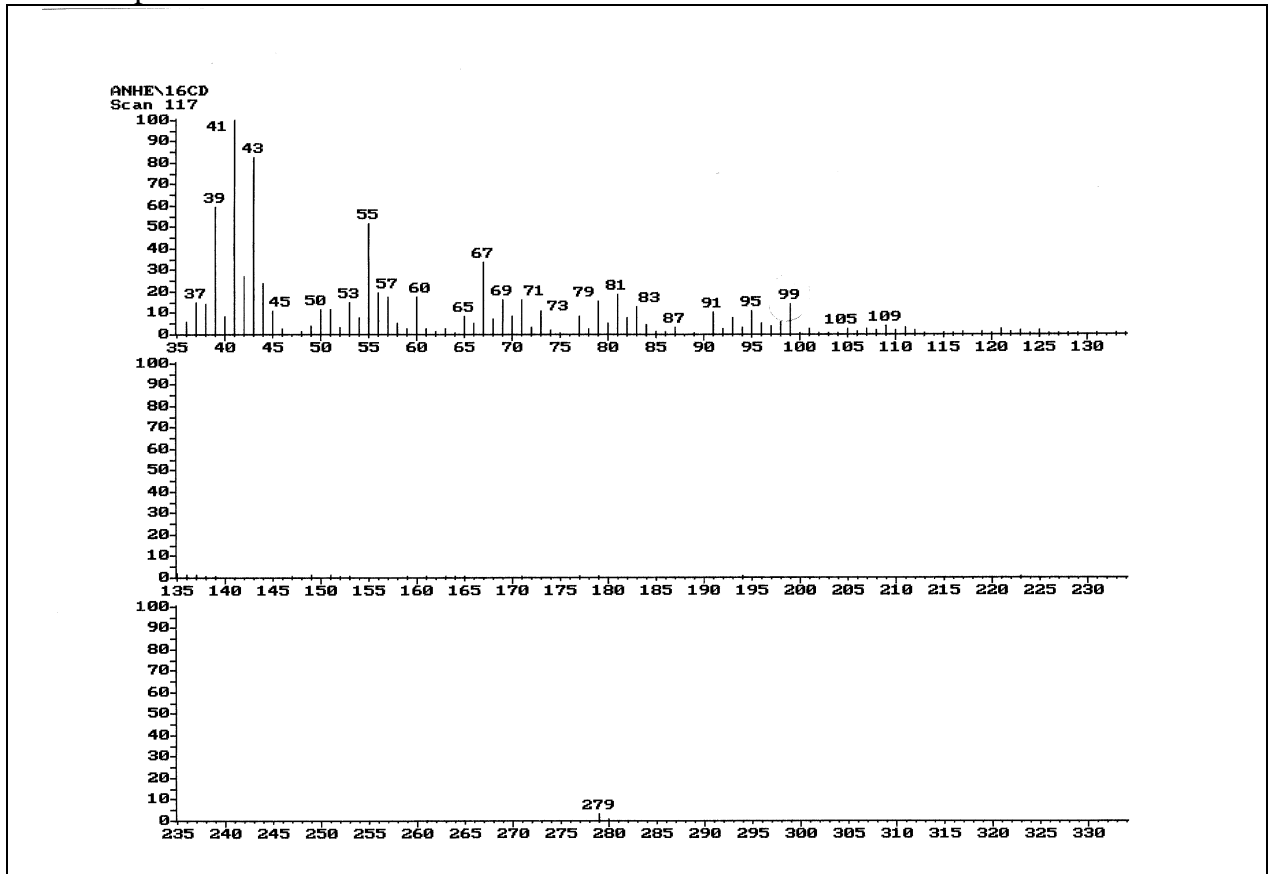


6.5.5 13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E)-diensäure (II)

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

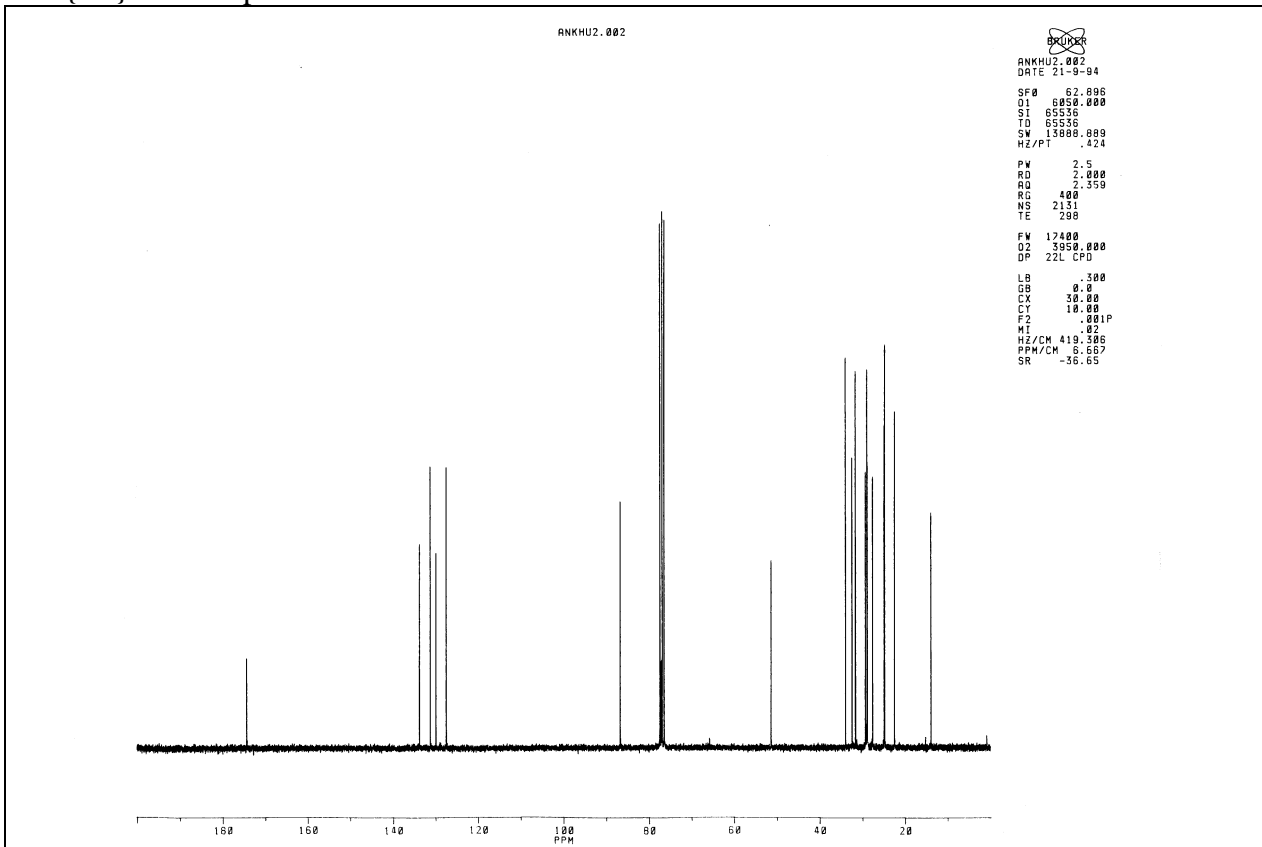
¹H-NMR-Spektrum

Massenspektrum

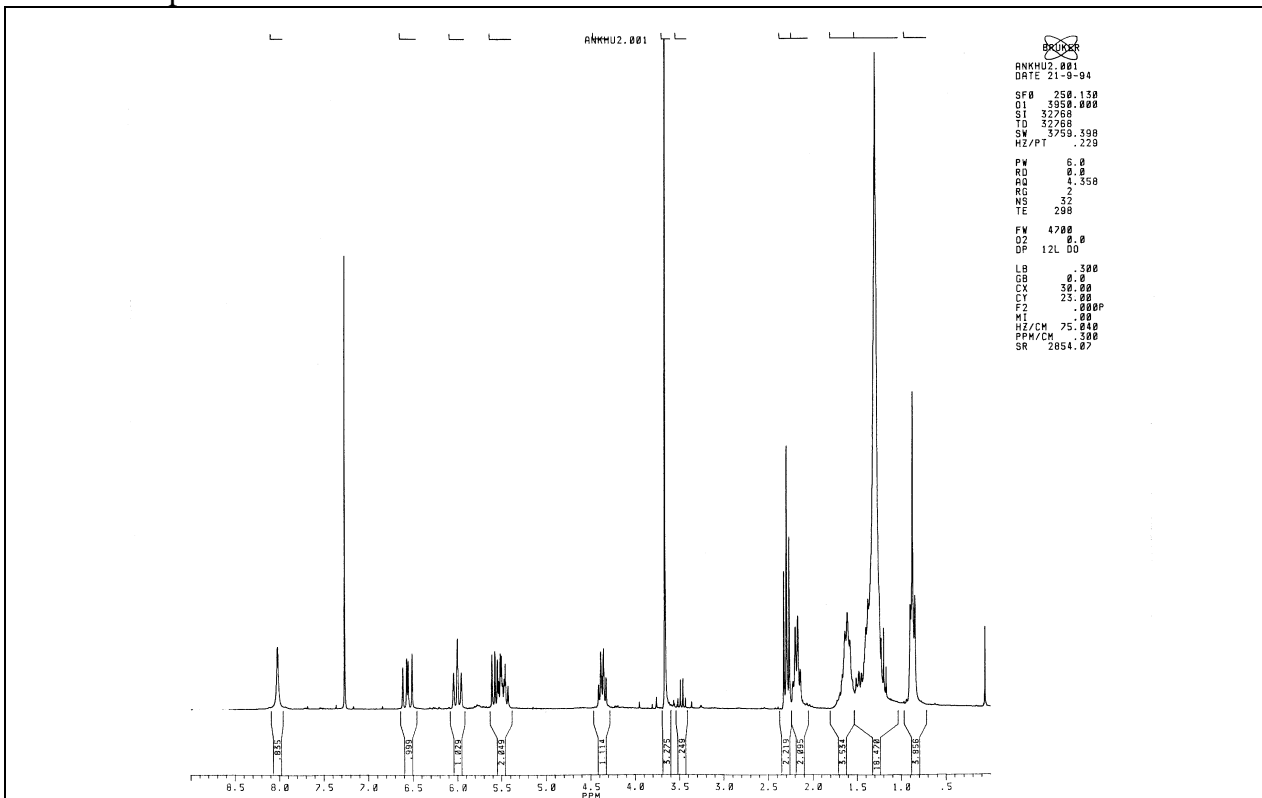


6.5.6 13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E)-diensäuremethylester (IV)

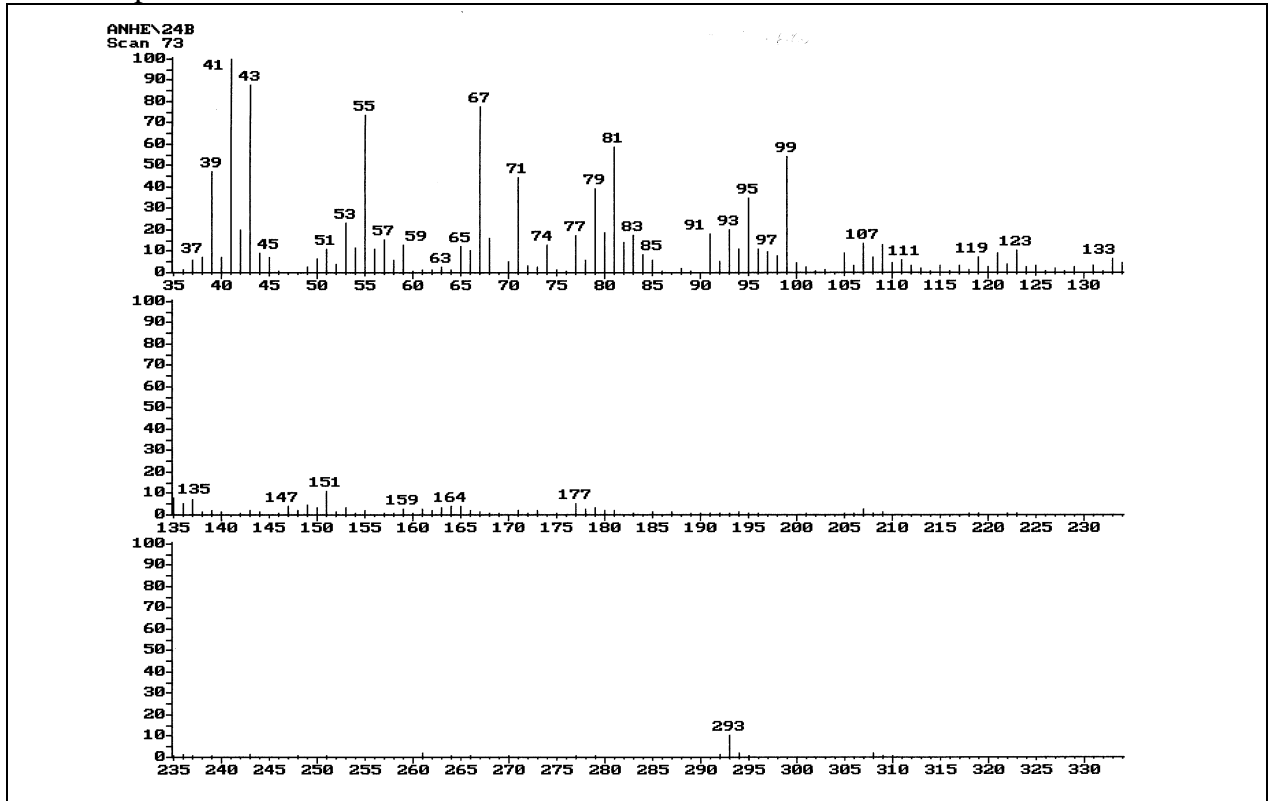
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum



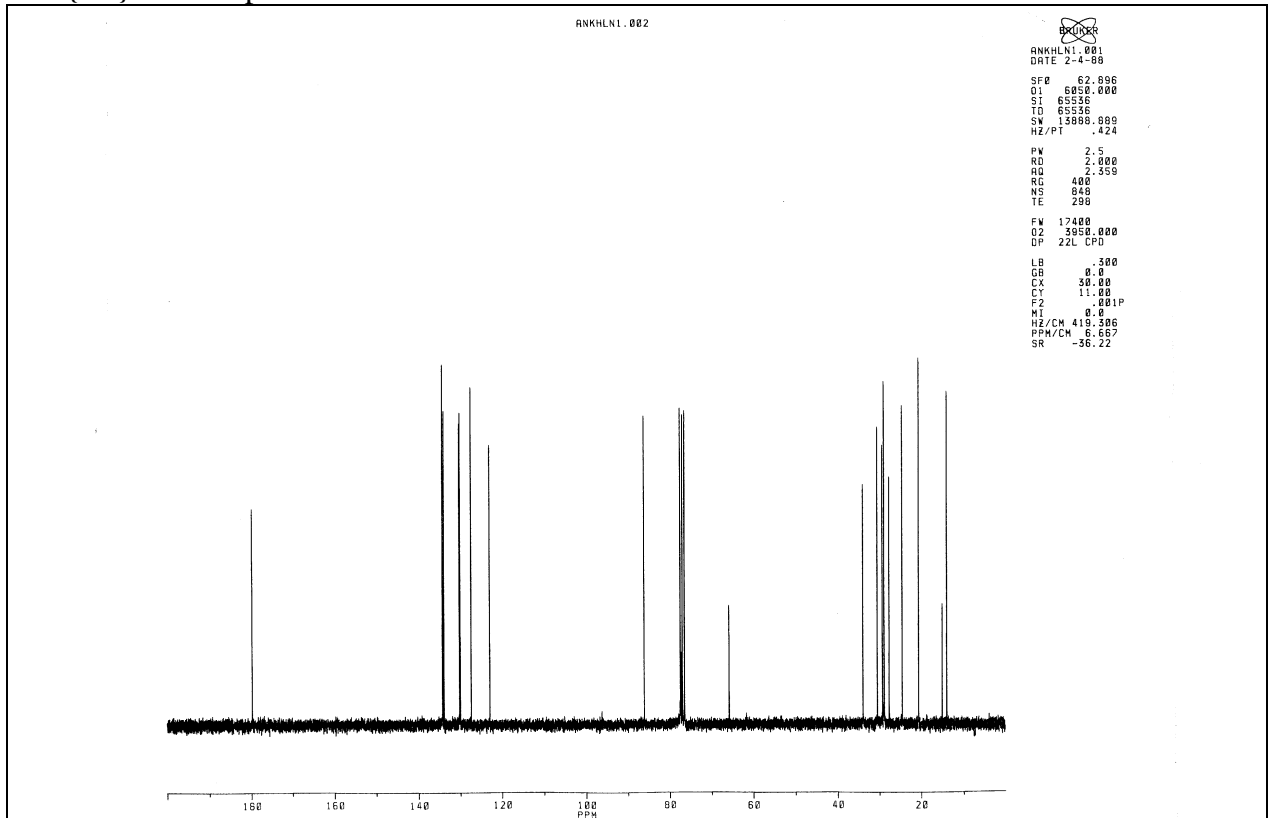
^1H -NMR-Spektrum

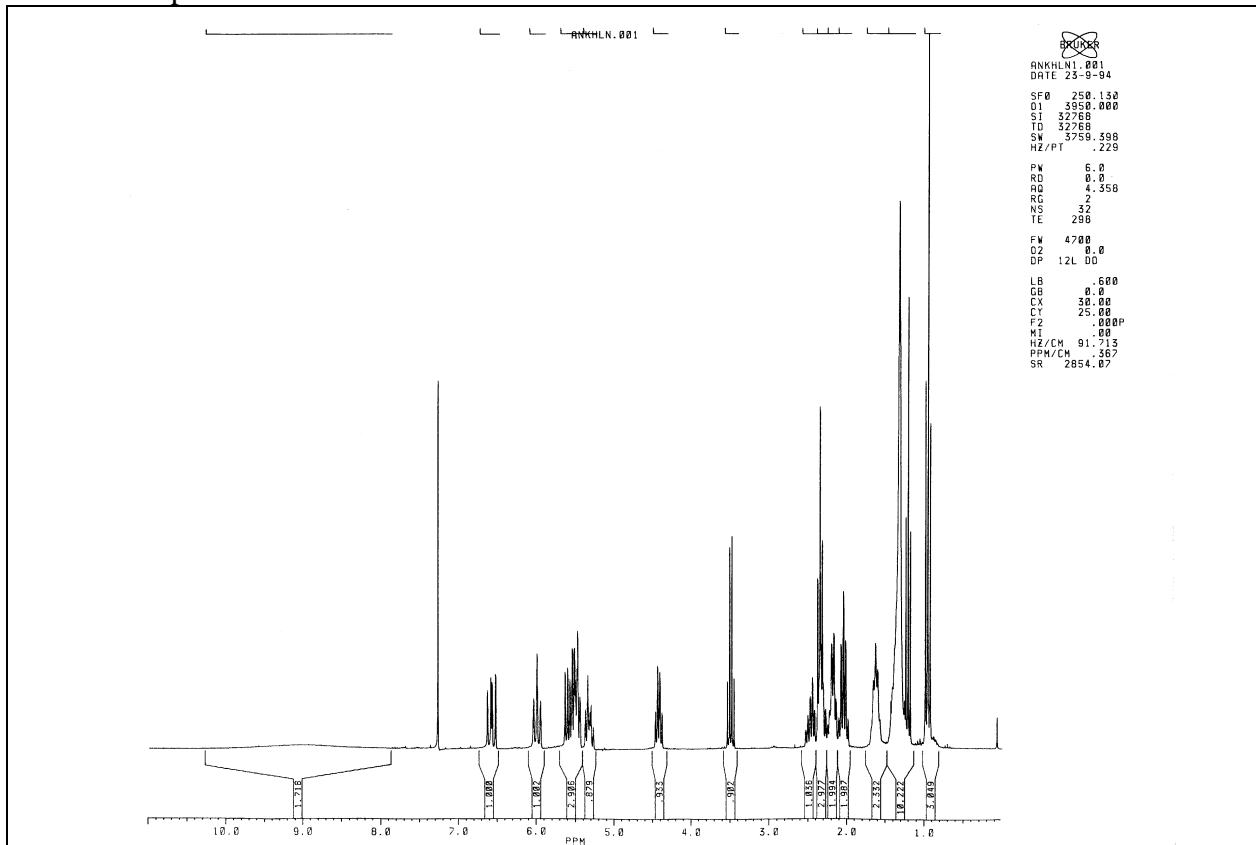


Massenspektrum

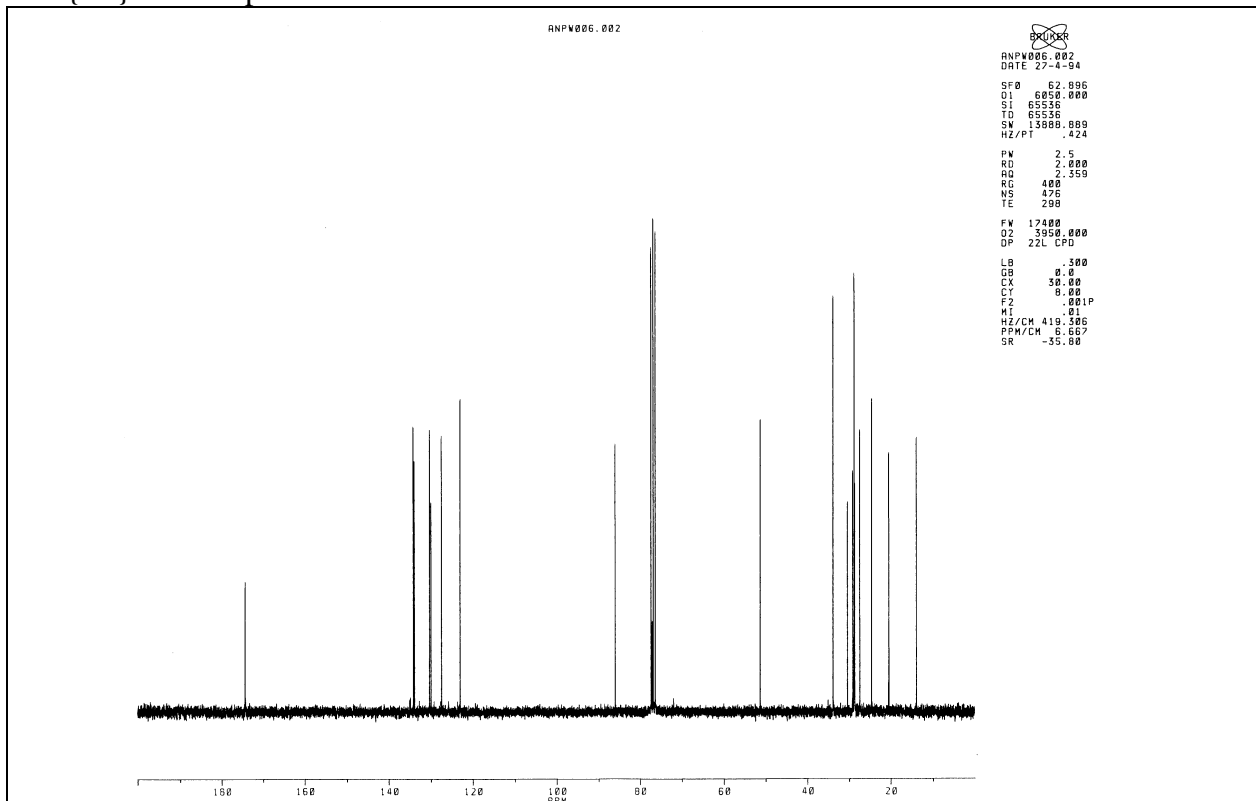


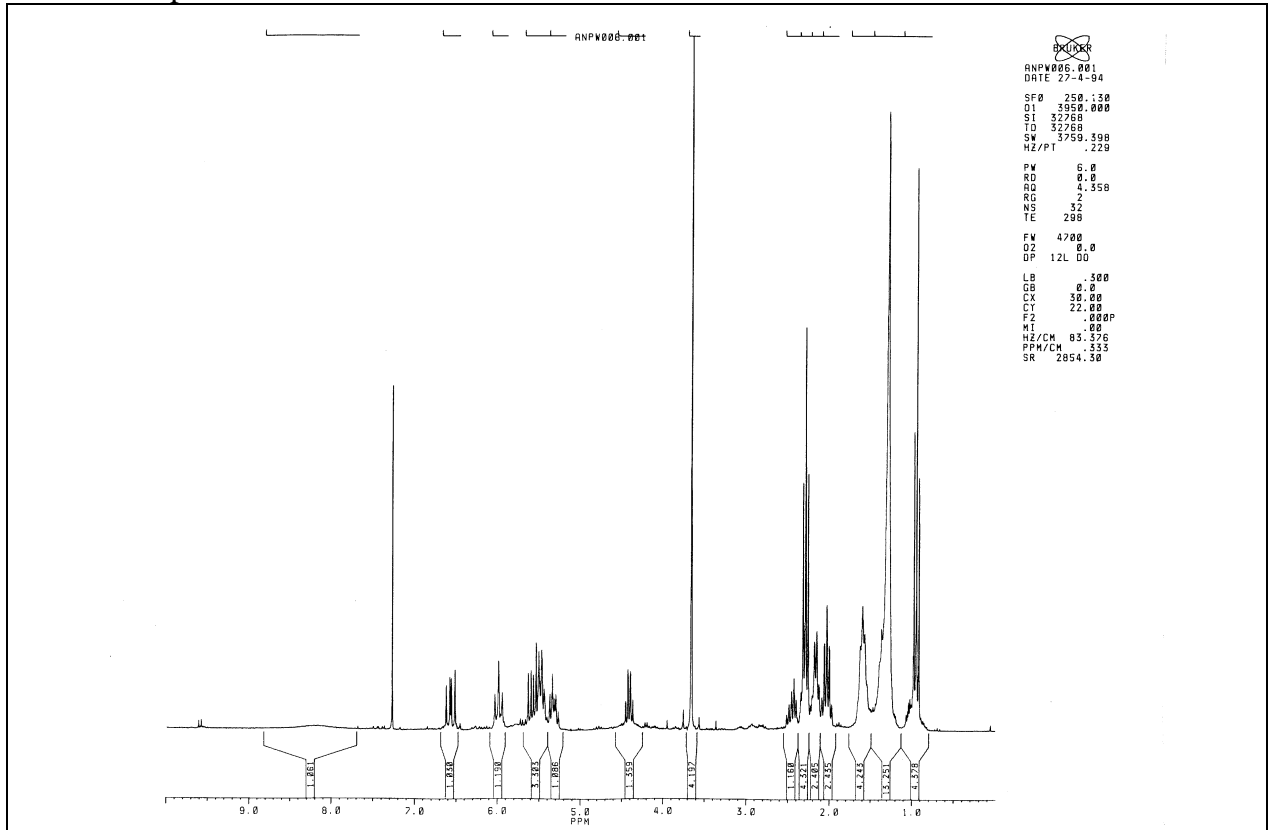
6.5.7 13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E)-triensäure (III)

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

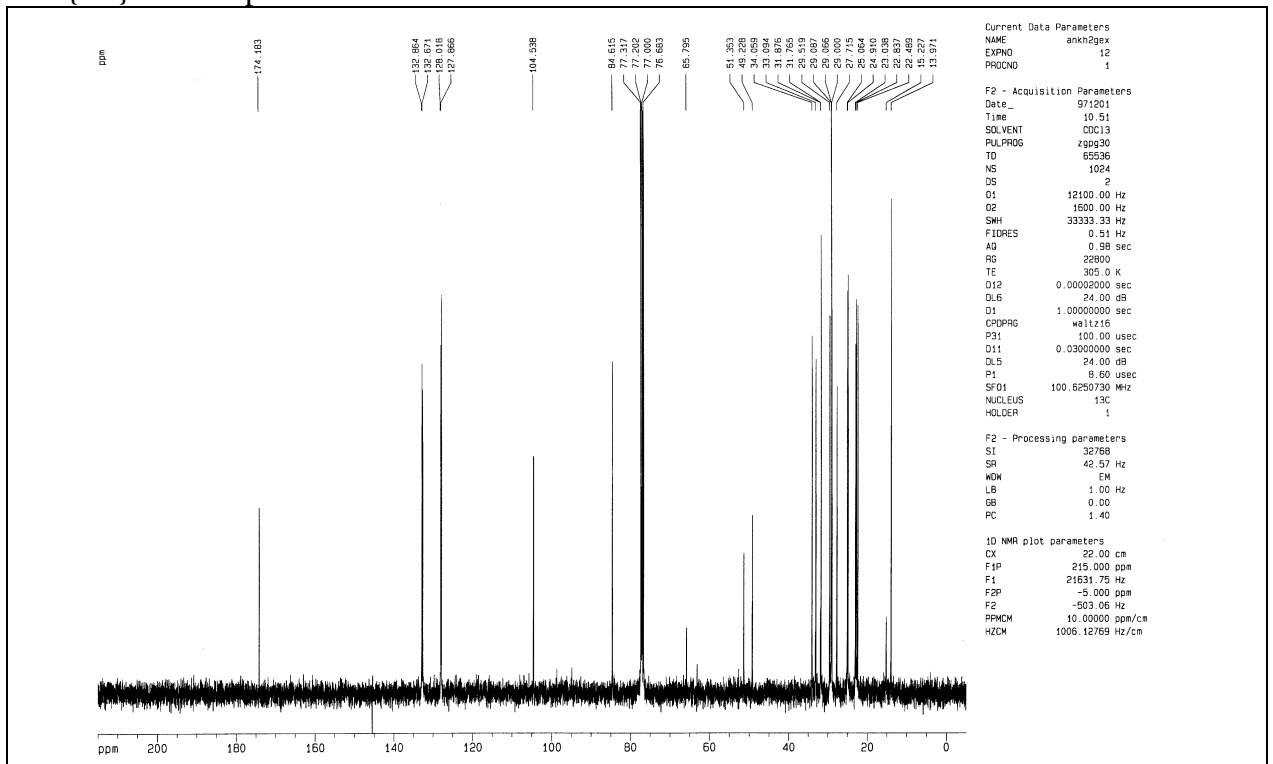
¹H-NMR-Spektrum

6.5.8 13S-Hydroperoxyoctadeca-9(Z),11(E),15(Z)-triensäuremethylester (V)

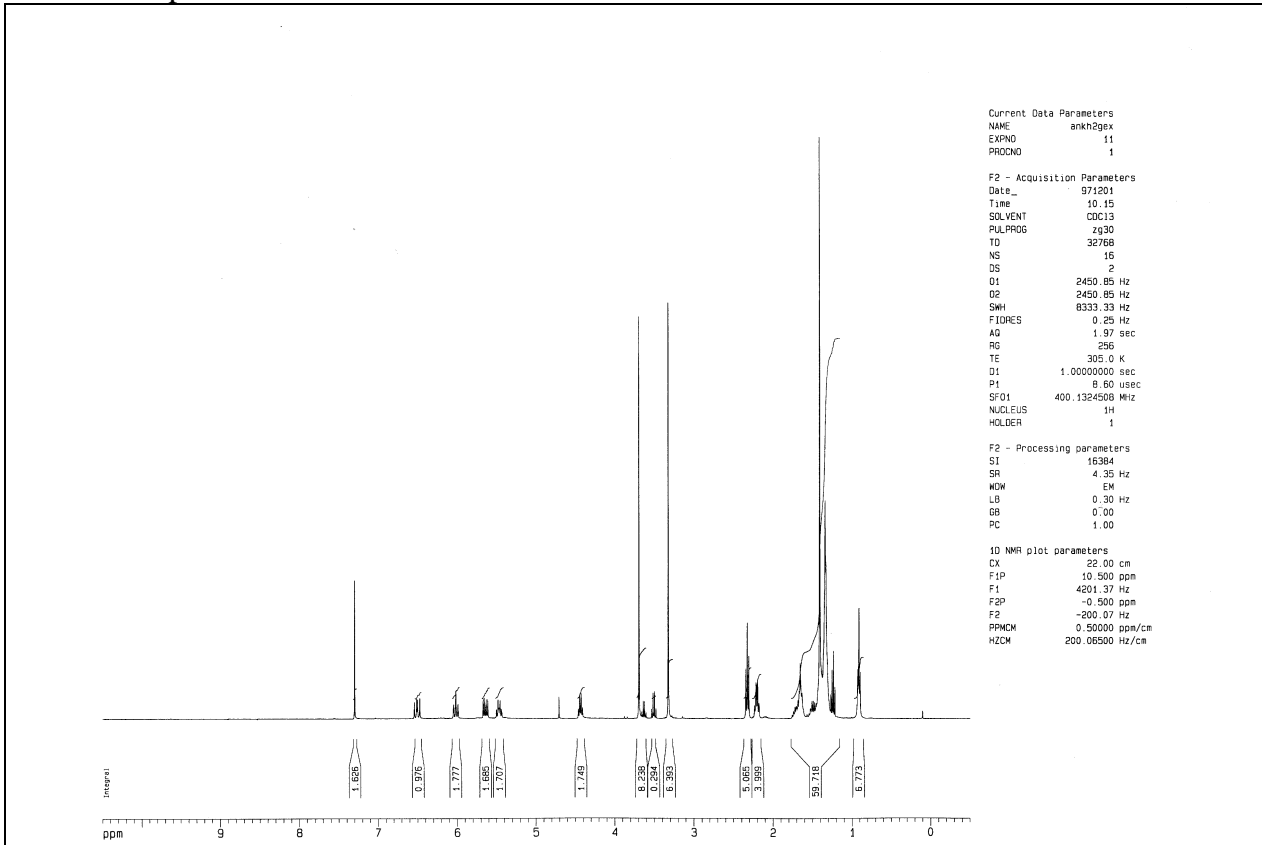
¹³C{¹H}-NMR-Spektrum

^1H -NMR-Spektrum

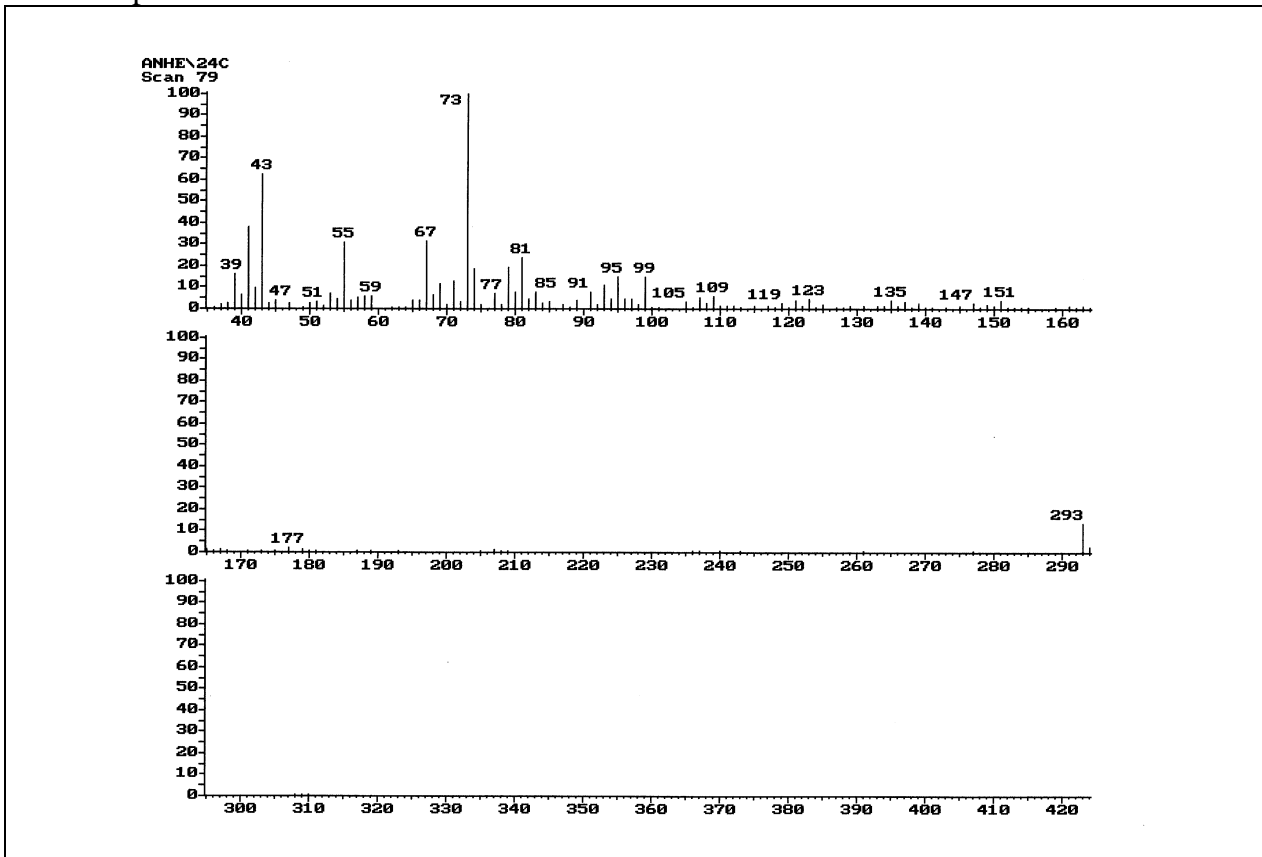
6.5.9 13S-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(Z),11(E)-diensäure-methylester (VI)

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

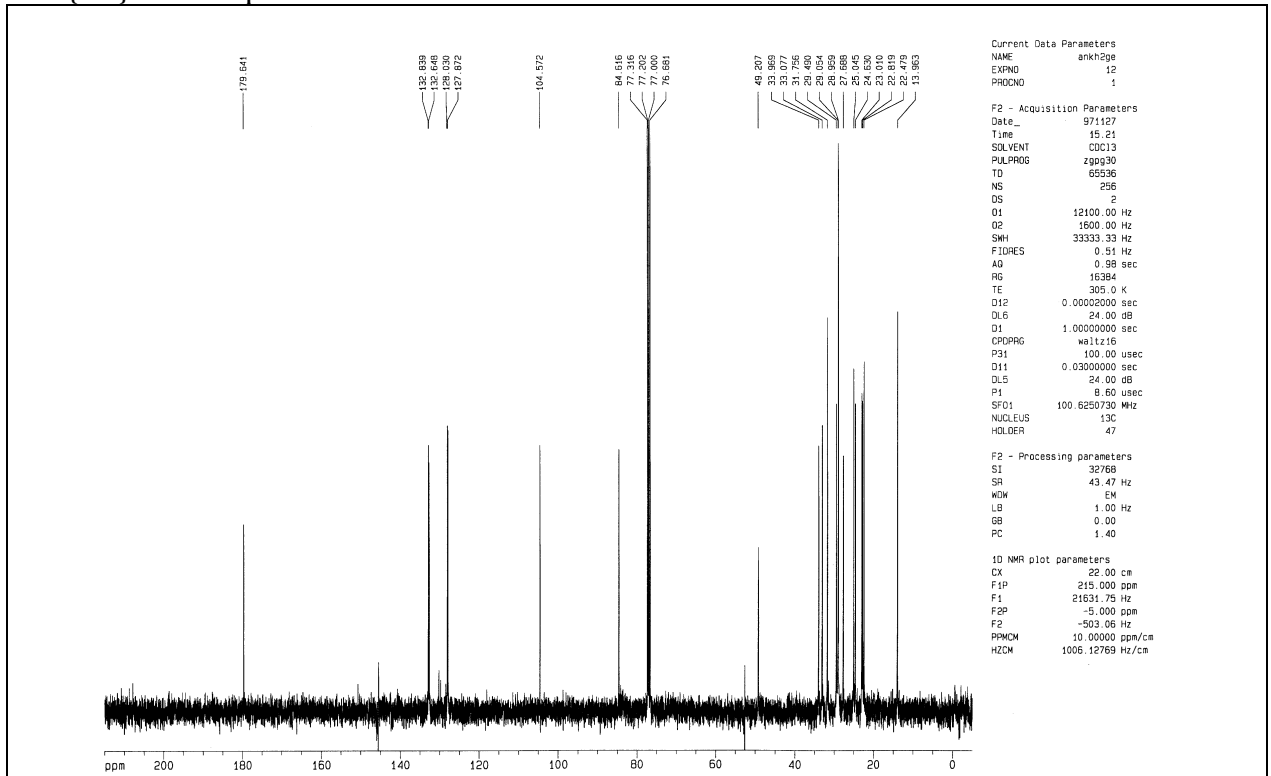
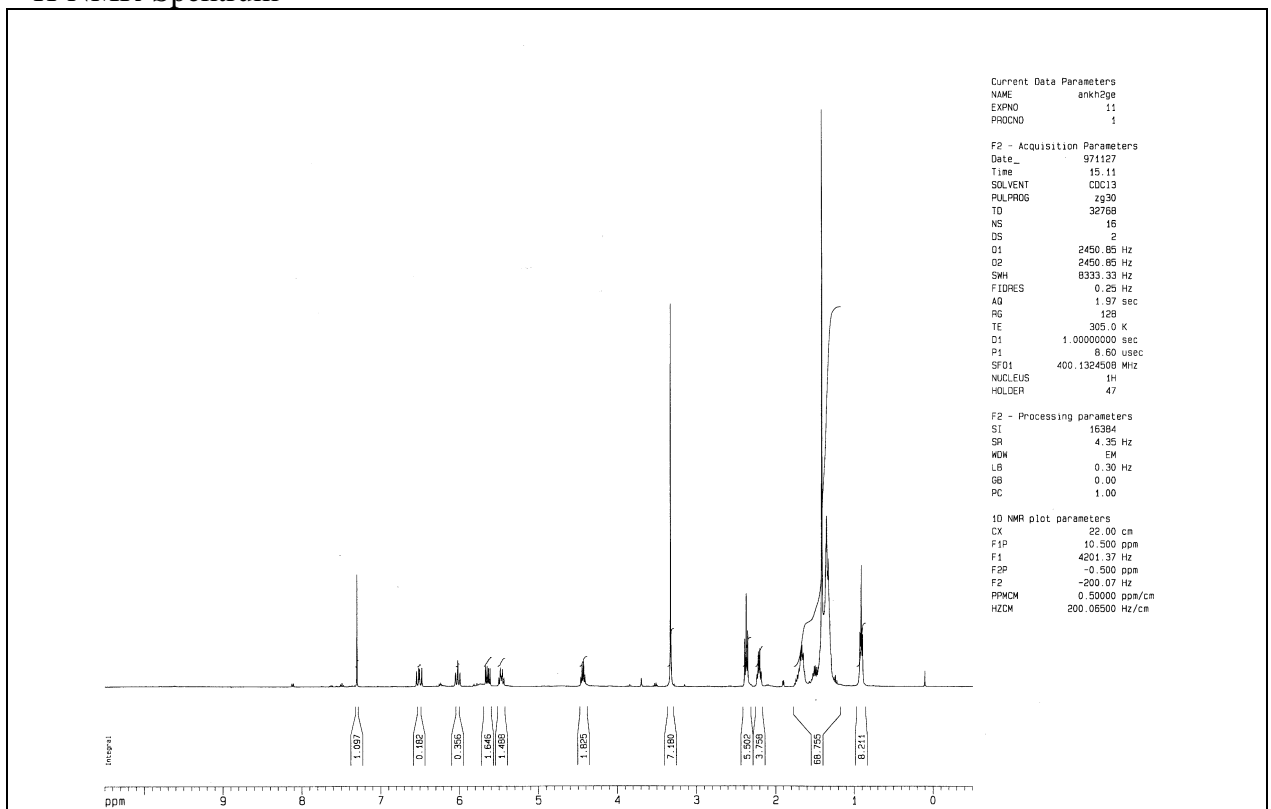
¹H-NMR-Spektrum



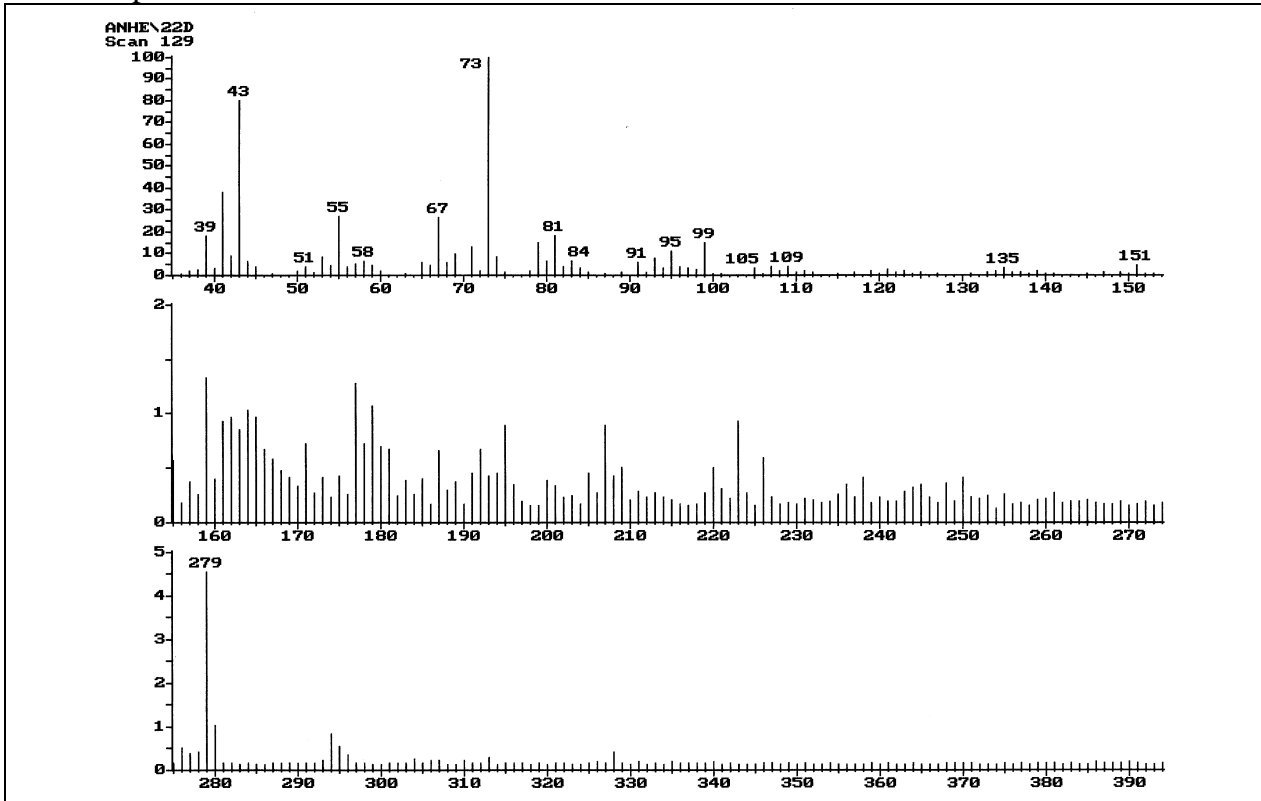
Massenspektrum



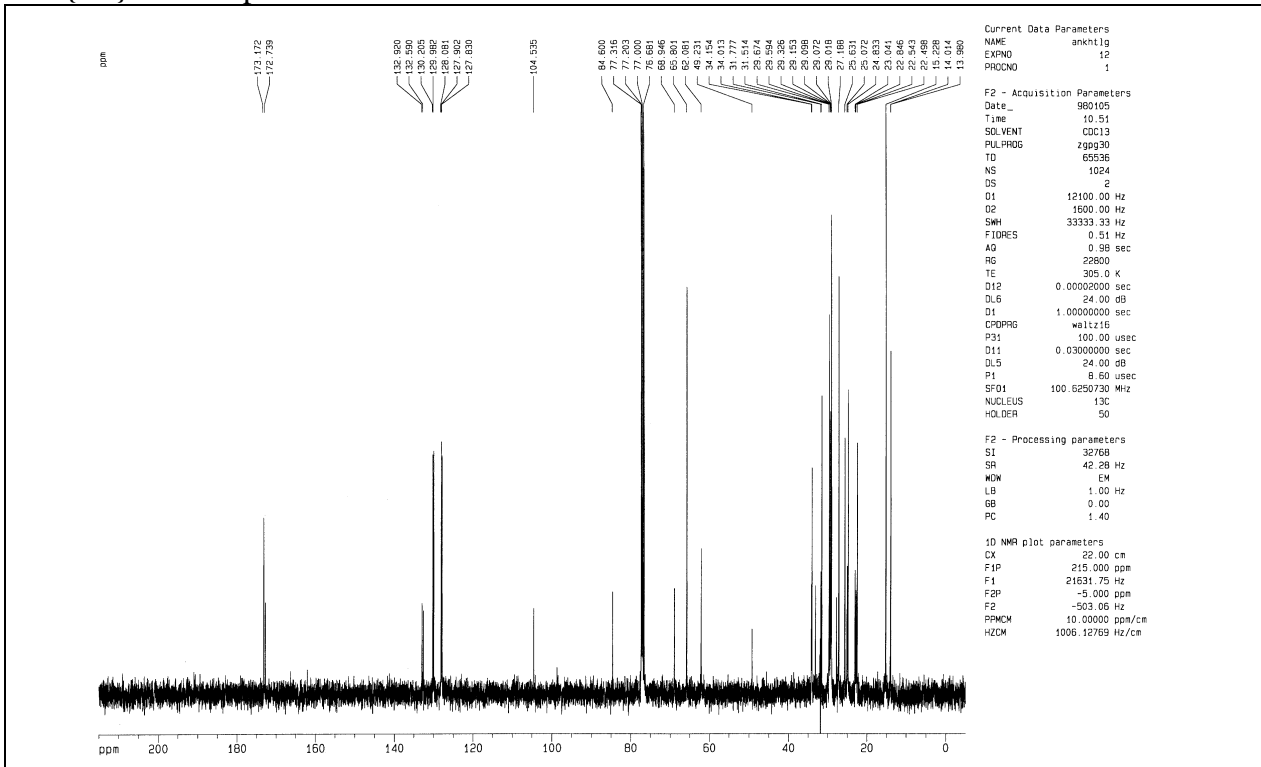
6.5.10 13S-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(Z),11(E)-diensäure (VII)

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

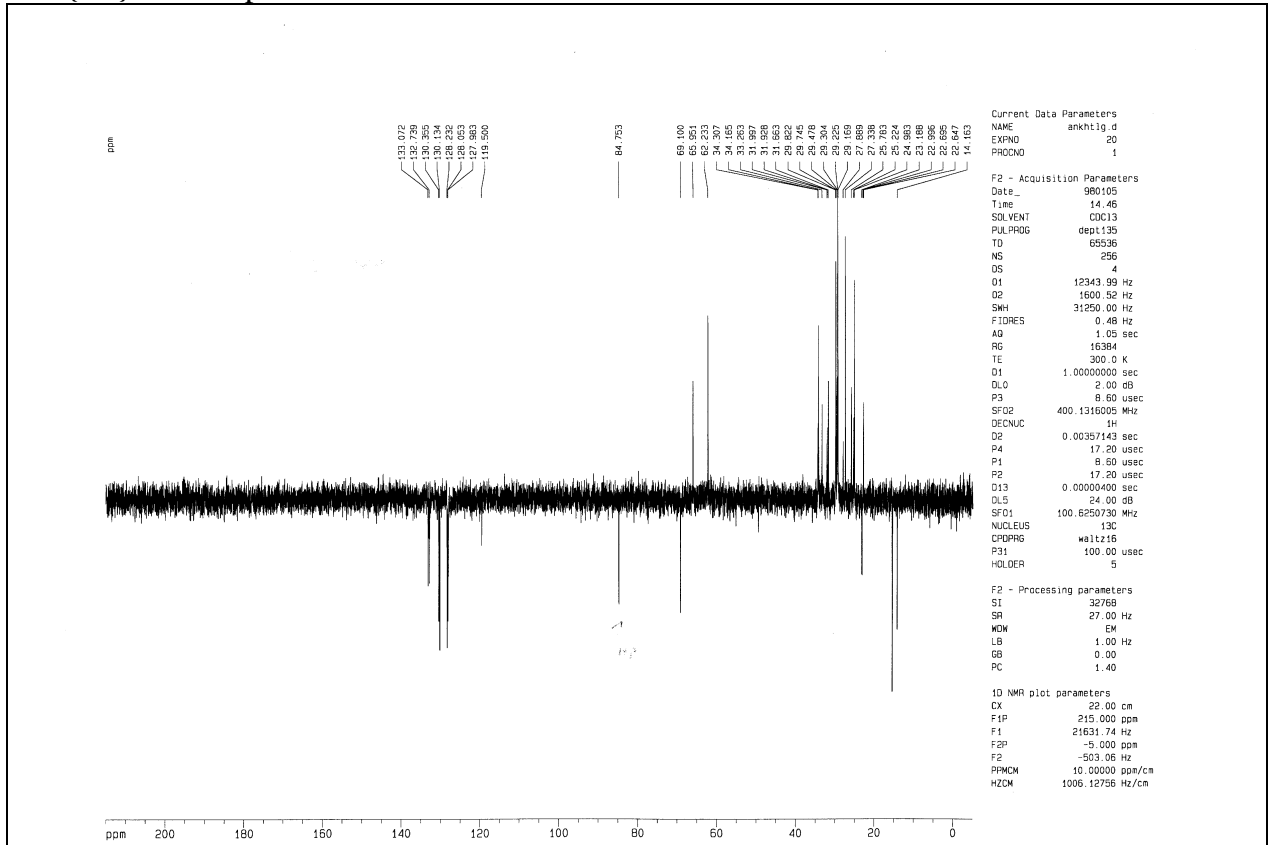
Massenspektrum



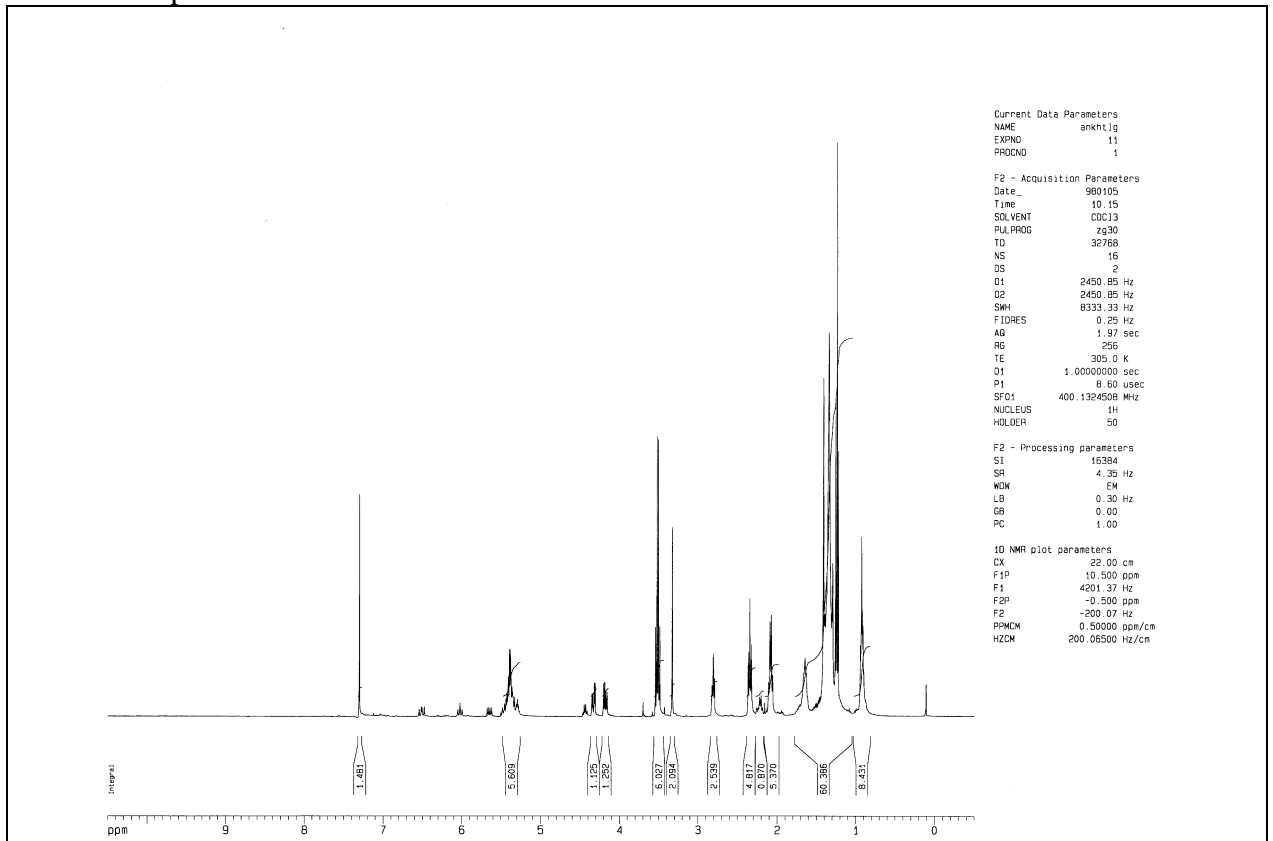
6.5.11 2-[13S-(1-Methoxy-1-methylethylperoxy)-octadeca-9(Z),11(E)-dienoyl]-1,3-dilinolein (VIII)

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

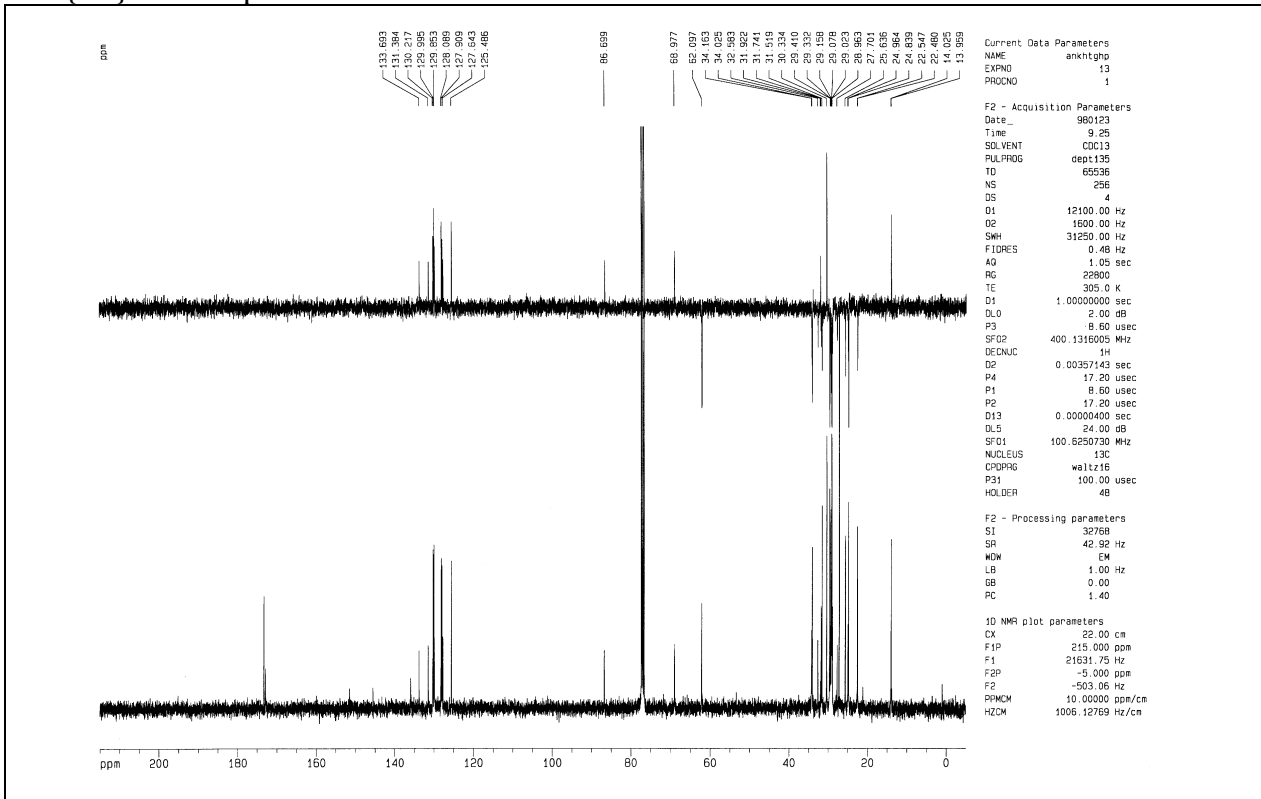
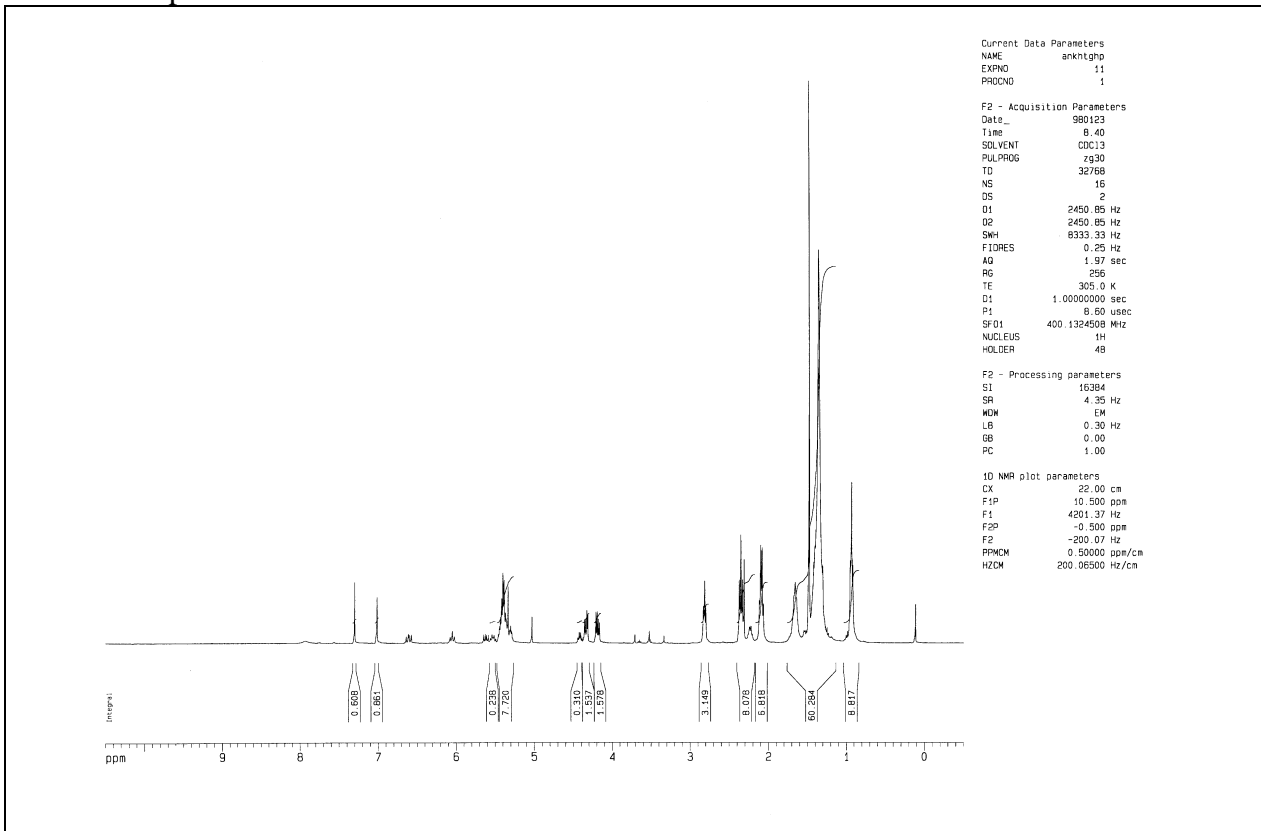
¹³C{¹H}-NMR-Spektrum



¹H-NMR-Spektrum



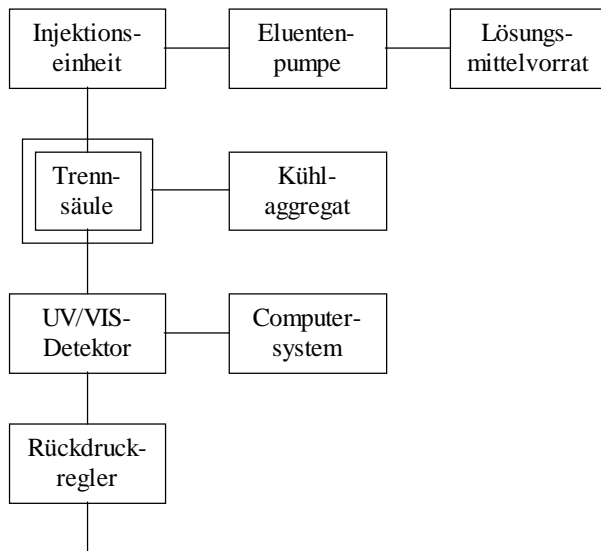
6.5.12 2-[13S-Hydroperoxy-octadeca-9(Z),11(E)-dienoyl]-1,3-dilinolein (IX)

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

6.6 Schematischer Aufbau der verwendeten HPLC-Anlagen

Die genauen Gerätebezeichnungen für die einzelnen Komponenten der HPLC-Anlagen sind, sofern nicht anders angegeben, in Kapitel 6.4 aufgeführt.

6.6.1 NP-HPLC mit UV-Detektion



Trennsäule:

Superspher Si 60 (250 mm

Länge, 4 mm ID, 4 μm)

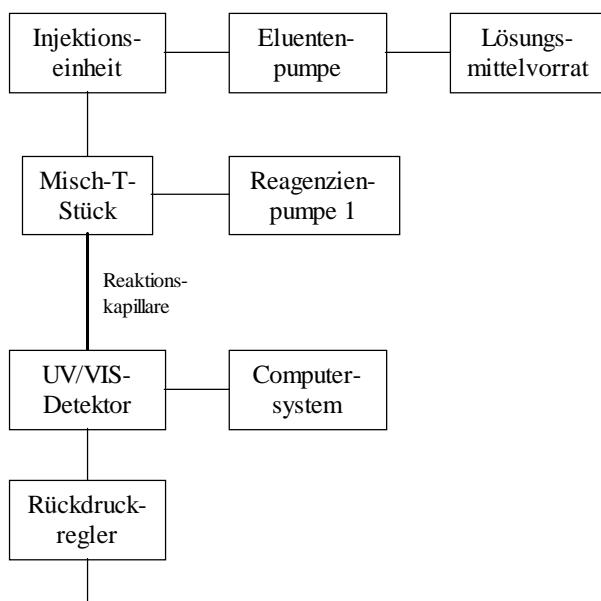
bzw.

LiChrospher Si 60 (250 mm

Länge, 4 mm ID, 5 μm)

jeweils auf 4 °C gekühlt

6.6.2 Entwicklung und Optimierung eines Nachsäulenderivatisierungssystem für die NP-HPLC



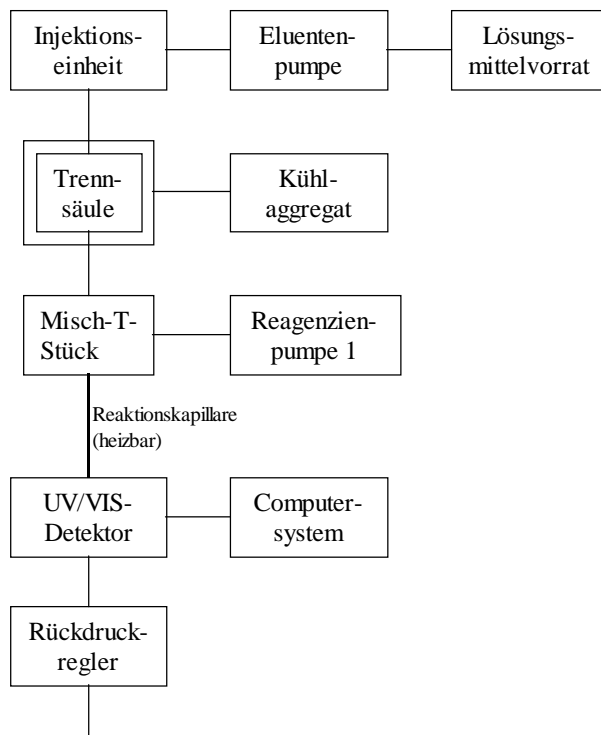
Reaktionskapillare:

Edelstahl, div. Längen,

0,25 mm ID bzw. PTFE 25 m,

0,3 mm ID (vgl. Text)

6.6.3 NP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion



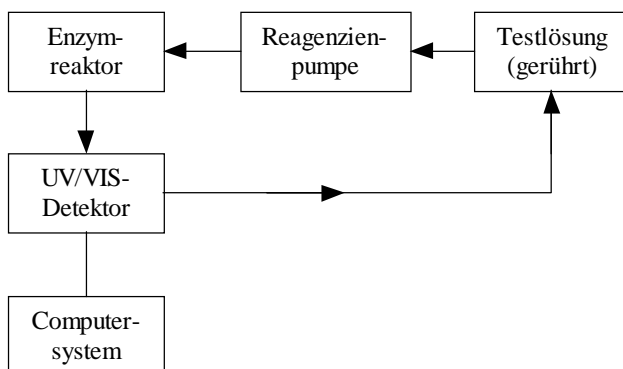
Trennsäule:

Superspher Si 60 (250 mm
Länge 4 mm ID, 4 μ m); auf
4 °C gekühlt

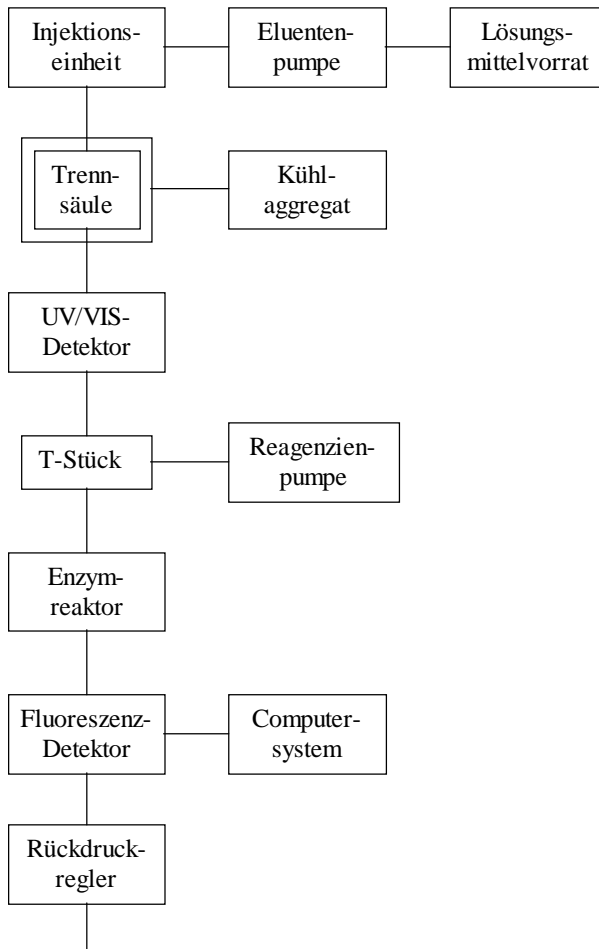
Reaktionskapillare:

25 m PTFE; 0,3 mm ID

6.6.4 Modifiziertes HPLC-System für Aktivitätsuntersuchungen von Enzymreaktoren



6.6.5 RP-HPLC mit gleichzeitiger UV/VIS- und Fluoreszenzdetektion bei Verwendung des Enzymreaktors (2-Pumpen-System)



Trennsäule:

RP-Select B (125 mm Länge, 4 mm ID; 5 μ m); auf 4 °C gekühlt

T-Stück:

Mischungs-T-Stück; Fa. Alltech

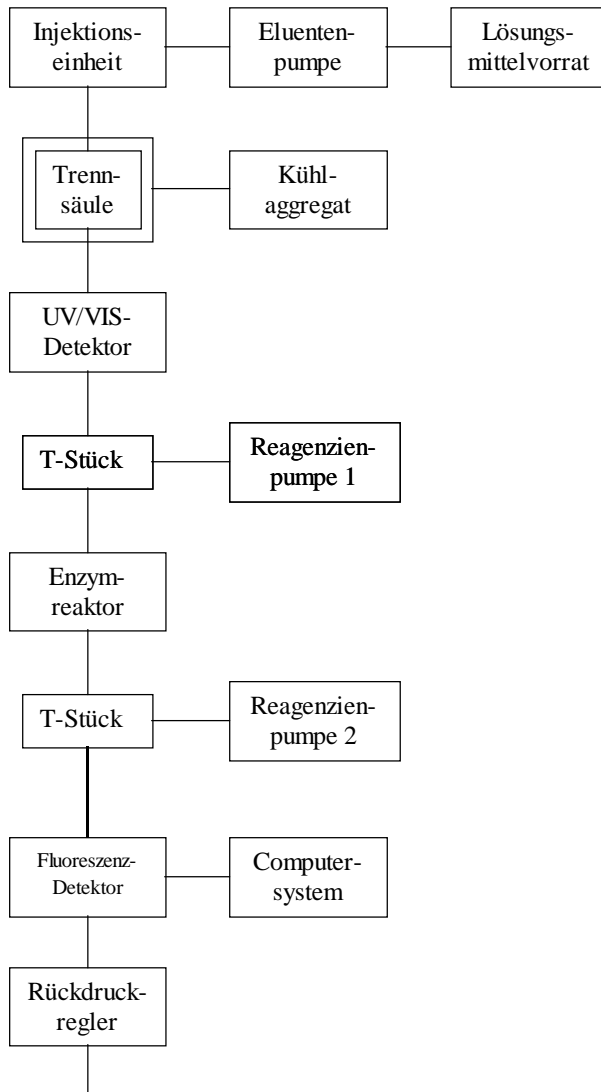
Detektionswellenlängen:

UV: $\lambda = 200$ nm, 234 nm

Fluoreszenz:

$\lambda_{em} = 234$ nm, $\lambda_{ex} = 415$ nm

6.6.6 RP-HPLC mit UV/VIS- und Fluoreszenzdetektion bei Verwendung des Enzymreaktors (3-Pumpen-System)



Trennsäule:

RP-Select B (125 mm Länge, 4 mm ID; 5 μ m); auf 4 °C gekühlt

T-Stück:

Mischungs-T-Stück; Fa. Alltech

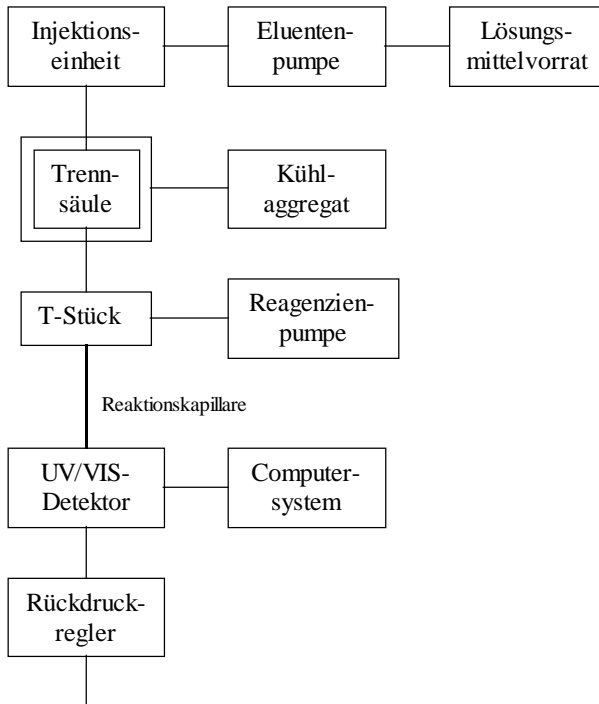
Detektionswellenlängen:

UV: $\lambda = 234$ nm

Fluoreszenz:

$\lambda_{em} = 234$ nm, $\lambda_{ex} = 415$ nm

6.6.7 RP-HPLC mit nichtenzymatischer Nachsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion



Trennsäule:

RP-Select B (125 mm Länge, 4 mm ID; 5 μm); auf 4 °C gekühlt

T-Stück:

Mischungs-T-Stück; Fa. Alltech

6.7 Lineare statistische Optimierung

6.7.1 Mathematische Grundlagen

(vgl. dazu Kapitel 4.4.2)

Zur statistischen Optimierung der Peakhöhe y wurden die fünf Einflußgrößen (Tabelle 18) auf $l = 2$ Stufen gemäß

$$x_u^+ = x_u^0 + p_u \quad x_u^- = x_u^0 - p_u$$

Gleichung 6

variiert. Diese natürlichen Variablen wurden dann mit

$$X_u^+ = \frac{x_u^+ - x_u^0}{p_u} = +1 \quad X_u^- = \frac{x_u^- - x_u^0}{p_u} = -1$$

Gleichung 7

in entsprechende codierte Variablen umgeformt.

Anschließend wurde ein Versuchsplan 1. Ordnung aufgestellt. Die Zahl der Versuche m berechnete sich bei den hier eingesetzten vollständigen Faktorplänen zu $m = l^u$ ($u =$ Zahl der betrachteten Einflußgrößen). Für jeden der Versuche $i = 1 \dots k$ wurden jeweils $n_j = 3$ Bestimmungen durchgeführt, deren Meßergebnisse y_k gemittelt wurden :

$$\bar{y}_k = \frac{1}{n_j} \sum_{j=1}^{n_j} y_{jk}$$

Gleichung 8

Die einzelnen Versuchspläne sind in Kapitel 6.7.2 dargestellt

Die Funktion $y = f(x_A, x_B, x_C, x_D, x_E)$, die den Zusammenhang zwischen der Zielgröße y (Peakhöhe) und den Einflußfaktoren $x_A - x_E$ beschreibt, wurde daraufhin als lineares Polynom der Form

$$y = b_0 + b_A x_A + b_B x_B + \dots + b_N x_N$$

Gleichung 9

ausgedrückt. Die Regressionskoeffizienten b_0 und b_u wurden dabei gemäß

$$b_0 = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m \bar{y}_k$$

Gleichung 10

$$b_u = \sum_{k=1}^m X_{ku} \bar{y}_k / m$$

Gleichung 11

berechnet.

Nach Arpardjan¹⁴⁰ ist die Regressionsanalyse jedoch nur dann anwendbar, wenn bei allen Experimenten ein ähnlich großer Zufallsfehler auftritt. Um dies zu überprüfen, wurde die Homogenität der Einzelvarianzen s_k^2 mit Hilfe des G-Testes nach Cochran bestimmt. Die Berechnung der Einzelvarianzen erfolgte dazu mit der Gleichung

$$s_k^2 = \frac{\left[\sum_{i=1}^{n_j} (y_{ik} - \bar{y}_k)^2 \right]}{n_j - 1}$$

Gleichung 12

Die Prüfgröße G ergab sich dann aus dem Verhältnis der zahlenmäßig größten Varianz $s_k^2(\max)$ zur Summe aller Einzelvarianzen:

$$G = \frac{s_k^2(\max)}{\sum_{k=1}^m s_k^2}$$

Gleichung 13

Die Einheitlichkeit der Varianzen war für $G < G[P;f_1;f_2]$ nachgewiesen ($f_1; f_2 =$ Freiheitsgrade mit $f_1 = n_j - 1$ und $f_2 = m(n_j - 1)$). Für $G[P;f_1;f_2]$ wurden folgende Werte angenommen (nach Dörrfel¹⁴⁰):

f_2	Prüfgröße $G[P;f_1;f_2]$
16	0,40 (Wert wurde interpoliert)
64	0,18 (Wert wurde extrapoliert)

Tabelle 37 Prüfgrößen für den G-Test nach Cochran ($P = 0,99; f_1 = 2$)

Weiterhin wurden die nach Gleichung 10 und Gleichung 11 bestimmten Regressionskoeffizienten auf ihre signifikante Abweichung von Null hin überprüft. Dazu wurde die Varianz s_b^2 des Regressionskoeffizienten bestimmt mit:

$$s_b^2 = s_y^2 / m$$

Gleichung 14

und

$$s_y^2 = \sum_{k=1}^m s_k^2 / m$$

Gleichung 15

Die Signifikanz der Regressionskoeffizienten war gegeben für $|b_0|; |b_u| > t(P; f_2) \cdot s_b = b^*$.

Es wurden folgende Werte für die Prüfgröße $t(P; f_2)$ angenommen:

f_2	Prüfgröße $t(P; f_2)$
16	2,92
64	2,64 (Wert wurde extrapoliert)

Tabelle 38 Prüfgrößen für den t-Test ($P = 0,99$)

Im weiteren Verlauf wurde nun das Regressionspolynom auf Adäquatheit im Versuchsbereich überprüft. Dazu wurde das Bestimmtheitsmaß B des Polynoms mit

$$B = \frac{\sum (\bar{y}_k - \bar{y})^2}{\sum (Y_k - \bar{y})^2}$$

Gleichung 16

und

$$\bar{y} = \frac{1}{m} \sum \bar{y}_k$$

Gleichung 17

berechnet, wobei Y_k jeweils die durch Einsetzen der codierten Variablen in das Regressionspolynom $Y_k = b_0 + b_A \cdot X_A + \dots$ erhaltenen Werte waren. Für einen Wert $B > 0,9$ wurde das Regressionsmodell als adäquat angesehen.

Im letzten Berechnungsschritt wurde nun die Wirksamkeit der einzelnen Faktoren auf die Zielfunktion bestimmt. Die Wirksamkeit W_u berechnete sich für die einzelnen Einflußfaktoren nach der Gleichung

$$W_u = b_u p_u$$

Gleichung 18

Im Verlauf der Optimierung wirkte sich dabei jeweils derjenige Faktor \hat{x}_u^0 dominierend auf die Zielfunktion (Peakhöhe) aus, der im Vergleich zu den anderen Faktoren einen maximalen Wert für W_u lieferte. Dieser Wert \hat{x}_u^0 (in natürlichen Koordinaten) wurde dann für die nächste Optimierungsrunde um eine Einheit der Schrittweite \hat{p}_u erhöht:

$$\hat{x}_u^0(\text{neu}) = \hat{x}_u^0(\text{alt}) + \hat{p}_u$$

Gleichung 19

Die entsprechenden Grundniveaus $x_u^0(\text{neu})$ aller übrigen Faktoren berechneten sich dann zu:

$$x_u^0(\text{neu}) = x_u^0(\text{alt}) + \frac{W_u}{\hat{b}}$$

Gleichung 20

wobei \hat{b} der Regressionskoeffizient der dominierenden Komponente war. Zur Berechnung der oberen und unteren Stufen gemäß Gleichung 6 wurden die ursprünglichen Schrittweiten jeweils beibehalten.

6.7.2 Versuchspläne

Die Optimierung wurde dreimal für jeweils fünf verschiedene Einflußgrößen durchgeführt. Anschließend konnte das Optimierungsproblem auf drei Einflußgrößen reduziert werden (vgl. 4.4.2), wodurch sich auch entsprechend andere Versuchspläne ergaben. Die Versuchspläne sind in nachstehenden Tabellen wiedergegeben:

1. Optimierungsschritt

lfd. Nr.	x_A in mg DPC/100 ml	x_B in %	x_C in m	x_D in ml/min	x_E in °C	X_A	X_B	X_C	X_D	X_E
1	10	20	3,0	0,25	25	-1	-1	-1	-1	-1
2	10	20	3,0	0,45	25	-1	-1	-1	+1	-1
3	10	20	3,0	0,25	45	-1	-1	-1	-1	+1
4	10	20	3,0	0,45	45	-1	-1	-1	+1	+1
5	10	20	7,0	0,25	25	-1	-1	+1	-1	-1
6	10	20	7,0	0,45	25	-1	-1	+1	+1	-1
7	10	20	7,0	0,25	45	-1	-1	+1	-1	+1
8	10	20	7,0	0,45	45	-1	-1	+1	+1	+1
9	10	10	3,0	0,25	25	-1	+1	-1	-1	-1
10	10	10	3,0	0,45	25	-1	+1	-1	+1	-1
11	10	10	3,0	0,25	45	-1	+1	-1	-1	+1
12	10	10	3,0	0,45	45	-1	+1	-1	+1	+1
13	10	10	7,0	0,25	25	-1	+1	+1	-1	-1
14	10	10	7,0	0,45	25	-1	+1	+1	+1	-1
15	10	10	7,0	0,25	45	-1	+1	+1	-1	+1
16	10	10	7,0	0,45	45	-1	+1	+1	+1	+1
17	30	20	3,0	0,25	25	+1	-1	-1	-1	-1
18	30	20	3,0	0,45	25	+1	-1	-1	+1	-1
19	30	20	3,0	0,25	45	+1	-1	-1	-1	+1
20	30	20	3,0	0,45	45	+1	-1	-1	+1	+1
21	30	20	7,0	0,25	25	+1	-1	+1	-1	-1
22	30	20	7,0	0,45	25	+1	-1	+1	+1	-1
23	30	20	7,0	0,25	45	+1	-1	+1	-1	+1
24	30	20	7,0	0,45	45	+1	-1	+1	+1	+1
25	30	10	3,0	0,25	25	+1	+1	-1	-1	-1
26	30	10	3,0	0,45	25	+1	+1	-1	+1	-1
27	30	10	3,0	0,25	45	+1	+1	-1	-1	+1
28	30	10	3,0	0,45	45	+1	+1	-1	+1	+1
29	30	10	7,0	0,25	25	+1	+1	+1	-1	-1
30	30	10	7,0	0,45	25	+1	+1	+1	+1	-1
31	30	10	7,0	0,25	45	+1	+1	+1	-1	+1
32	30	10	7,0	0,45	45	+1	+1	+1	+1	+1

Tabelle 39 Versuchsplan für den 1. Optimierungsschritt

2. Optimierungsschritt

lfd. Nr.	x_A in mg DPC/100 ml	x_B in %	x_C in m	x_D in ml/min	x_E in °C	X_A	X_B	X_C	X_D	X_E
1	15	10	5,0	0,25	35	-1	-1	-1	-1	-1
2	15	10	5,0	0,45	35	-1	-1	-1	+1	-1
3	15	10	5,0	0,25	55	-1	-1	-1	-1	+1
4	15	10	5,0	0,45	55	-1	-1	-1	+1	+1
5	15	10	9,0	0,25	35	-1	-1	+1	-1	-1
6	15	10	9,0	0,45	35	-1	-1	+1	+1	-1
7	15	10	9,0	0,25	55	-1	-1	+1	-1	+1
8	15	10	9,0	0,45	55	-1	-1	+1	+1	+1
9	15	20	5,0	0,25	35	-1	+1	-1	-1	-1
10	15	20	5,0	0,45	35	-1	+1	-1	+1	-1
11	15	20	5,0	0,25	55	-1	+1	-1	-1	+1
12	15	20	5,0	0,45	55	-1	+1	-1	+1	+1
13	15	20	9,0	0,25	35	-1	+1	+1	-1	-1
14	15	20	9,0	0,45	35	-1	+1	+1	+1	-1
15	15	20	9,0	0,25	55	-1	+1	+1	-1	+1
16	15	20	9,0	0,45	55	-1	+1	+1	+1	+1
17	35	10	5,0	0,25	35	+1	-1	-1	-1	-1
18	35	10	5,0	0,45	35	+1	-1	-1	+1	-1
19	35	10	5,0	0,25	55	+1	-1	-1	-1	+1
20	35	10	5,0	0,45	55	+1	-1	-1	+1	+1
21	35	10	9,0	0,25	35	+1	-1	+1	-1	-1
22	35	10	9,0	0,45	35	+1	-1	+1	+1	-1
23	35	10	9,0	0,25	55	+1	-1	+1	-1	+1
24	35	10	9,0	0,45	55	+1	-1	+1	+1	+1
25	35	20	5,0	0,25	35	+1	+1	-1	-1	-1
26	35	20	5,0	0,45	35	+1	+1	-1	+1	-1
27	35	20	5,0	0,25	55	+1	+1	-1	-1	+1
28	35	20	5,0	0,45	55	+1	+1	-1	+1	+1
29	35	20	9,0	0,25	35	+1	+1	+1	-1	-1
30	35	20	9,0	0,45	35	+1	+1	+1	+1	-1
31	35	20	9,0	0,25	55	+1	+1	+1	-1	+1
32	35	20	9,0	0,45	55	+1	+1	+1	+1	+1

Tabelle 40 Versuchsplan für den 2. Optimierungsschritt

3. Optimierungsschritt

lfd. Nr.	x_A in mg DPC/100 ml	x_B in %	x_C in m	x_D in ml/min	x_E in °C	X_A	X_B	X_C	X_D	X_E
1	20	10	7,0	0,25	45	-1	-1	-1	-1	-1
2	20	10	7,0	0,45	45	-1	-1	-1	+1	-1
3	20	10	7,0	0,25	65	-1	-1	-1	-1	+1
4	20	10	7,0	0,45	65	-1	-1	-1	+1	+1
5	20	10	11,0	0,25	45	-1	-1	+1	-1	-1
6	20	10	11,0	0,45	45	-1	-1	+1	+1	-1
7	20	10	11,0	0,25	65	-1	-1	+1	-1	+1
8	20	10	11,0	0,45	65	-1	-1	+1	+1	+1
9	20	20	7,0	0,25	45	-1	+1	-1	-1	-1
10	20	20	7,0	0,45	45	-1	+1	-1	+1	-1
11	20	20	7,0	0,25	65	-1	+1	-1	-1	+1
12	20	20	7,0	0,45	65	-1	+1	-1	+1	+1
13	20	20	11,0	0,25	45	-1	+1	+1	-1	-1
14	20	20	11,0	0,45	45	-1	+1	+1	+1	-1
15	20	20	11,0	0,25	65	-1	+1	+1	-1	+1
16	20	20	11,0	0,45	65	-1	+1	+1	+1	+1
17	40	10	7,0	0,25	45	+1	-1	-1	-1	-1
18	40	10	7,0	0,45	45	+1	-1	-1	+1	-1
19	40	10	7,0	0,25	65	+1	-1	-1	-1	+1
20	40	10	7,0	0,45	65	+1	-1	-1	+1	+1
21	40	10	11,0	0,25	45	+1	-1	+1	-1	-1
22	40	10	11,0	0,45	45	+1	-1	+1	+1	-1
23	40	10	11,0	0,25	65	+1	-1	+1	-1	+1
24	40	10	11,0	0,45	65	+1	-1	+1	+1	+1
25	40	20	7,0	0,25	45	+1	+1	-1	-1	-1
26	40	20	7,0	0,45	45	+1	+1	-1	+1	-1
27	40	20	7,0	0,25	65	+1	+1	-1	-1	+1
28	40	20	7,0	0,45	65	+1	+1	-1	+1	+1
29	40	20	11,0	0,25	45	+1	+1	+1	-1	-1
30	40	20	11,0	0,45	45	+1	+1	+1	+1	-1
31	40	20	11,0	0,25	65	+1	+1	+1	-1	+1
32	40	20	11,0	0,45	65	+1	+1	+1	+1	+1

Tabelle 41 Versuchsplan für den 3. Optimierungsschritt

4. Optimierungsschritt

lfd. Nr.	x_A in mg DPC/100 ml	x_B in %	x_C in m	x_D in ml/min	x_E in °C	X_A	X_B	X_C	X_D	X_E
1	25	20	11,0	0,25	65	-1	-1	—	-1	—
2	25	20	11,0	0,45	65	-1	-1	—	+1	—
3	25	10	11,0	0,45	65	-1	+1	—	+1	—
4	25	10	11,0	0,25	65	-1	+1	—	-1	—
5	45	20	11,0	0,25	65	+1	-1	—	-1	—
6	45	20	11,0	0,45	65	+1	-1	—	+1	—
7	45	10	11,0	0,45	65	+1	+1	—	+1	—
8	45	10	11,0	0,25	65	+1	+1	—	-1	—

Tabelle 42 Versuchsanordnung für den 4. Optimierungsschritt

5. Optimierungsschritt

lfd. Nr.	x_A in mg DPC/100 ml	x_B in %	x_C in m	x_D in ml/min	x_E in °C	X_A	X_B	X_C	X_D	X_E
1	35	20	11,0	0,25	65	-1	-1	—	-1	—
2	35	20	11,0	0,45	65	-1	-1	—	+1	—
3	35	10	11,0	0,45	65	-1	+1	—	+1	—
4	35	10	11,0	0,25	65	-1	+1	—	-1	—
5	55	20	11,0	0,25	65	+1	-1	—	-1	—
6	55	20	11,0	0,45	65	+1	-1	—	+1	—
7	55	10	11,0	0,45	65	+1	+1	—	+1	—
8	55	10	11,0	0,25	65	+1	+1	—	-1	—

Tabelle 43 Versuchsanordnung für den 5. Optimierungsschritt

6.7.3 Optimierungsergebnisse

1. Optimierungsschritt:

Eingangswerte:

	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
	c(Reagenz) in mg DPC/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß Reagenzlösung in ml/min	Temperatur in °C
Nullniveau	20,0	15,0	5,0	0,35	35
Schrittweite	10,0	5,0	2,0	0,10	10
oberer Wert	30,0	20,0	7,0	0,45	45
unterer Wert	10,0	10,0	3,0	0,25	25

Faktor	Regressionsparameter b_u	Signifikanz	Wirksamkeit W_u	neue nat. Koor- dinaten x_u^0(neu)	Veränderung gegenüber alten Werten in %
0	25289,698	Faktor ist signifikant			
A	5559,844	Faktor ist signifikant	55598,438	23,721	18,606
B	-5579,365	Faktor ist signifikant	-27896,823	13,133	-12,448
C	15204,427	Faktor ist signifikant	30408,854	7,035	40,705
D	-4263,094	Faktor ist signifikant	-426,309	0,325	-8,152
E	14940,948	Faktor ist signifikant	149409,479	45,00	28,571

wichtigster Faktor Faktor E

Bestimmtheitsmaß B 1,404

Regressionsmodell ist adäquat!

Tabelle 44 Ergebnisse des 1. Optimierungsschrittes

2. Optimierungsschritt

Eingangswerte:

	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
	c(Reagenz) in mg DPC/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß Reagenzlösung in ml/min	Temperatur in °C
Nullniveau	25,0	15,0	7,0	0,35	45
Schrittweite	10,0	5	2,0	0,10	10
oberer Wert	35,0	20,0	9,0	0,45	55
unterer Wert	15,0	10,0	5,0	0,25	35

Faktor	Regressionsparameter b_u	Signifikanz	Wirksamkeit W_u	neue nat. Koor- dinaten x_u^0(neu)	Veränderung gegenüber alten Werten in %
0	66224,208	Faktor ist signifikant			
A	12261,500	Faktor ist signifikant	122615,000	27,905	11,621
B	-8417,458	Faktor ist signifikant	-42087,292	14,003	-6,648
C	35731,396	Faktor ist signifikant	71462,792	8,693	24,188
D	-10605,958	Faktor ist signifikant	-1060,596	0,325	-7,180
E	42206,271	Faktor ist signifikant	422062,708	55,000	22,222

wichtigster Faktor Faktor E

Bestimmtheitsmaß B 1,253

Regressionsmodell ist adäquat !

Tabelle 45 Ergebnisse des 2. Optimierungsschrittes

3. Optimierungsschritt

Eingangswerte:

	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
	c(Reagenz) in mg DPC/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß Reagenzlösung in ml/min	Temperatur in °C
Nullniveau	30,0	15,0	9,0	0,35	55
Schrittweite	10,0	5,0	2,0	0,10	10
oberer Wert	40,0	20,0	11,0	0,45	65
unterer Wert	20,0	10,0	7,0	0,25	45

Faktor	Regressionsparameter b_u	Signifikanz	Wirksamkeit W_u	neue nat. Koor- dinaten x_u^0(neu)	Veränderung gegenüber alten Werten in %
0	121987,698	Faktor ist signifikant			
A	38321,802	Faktor ist signifikant	383218,021	34,618	15,395
B	-11772,885	Faktor ist signifikant	-58864,427	14,291	-4,729
C	61160,969	Faktor ist signifikant	122321,938	10,474	16,380
D	-3290,302	Faktor ist signifikant	-329,030	0,346	-1,133
E	82975,615	Faktor ist signifikant	829756,146	65,000	18,182

wichtigster Faktor Faktor E **Bestimmtheitsmaß B** 1,346 **Regressionsmodell ist adäquat !**

Tabelle 46 Ergebnisse des 3. Optimierungsschrittes

4. Optimierungsschritt

Eingangswerte:

	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
	c(Reagenz) in mg DPC/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß Reagenzlösung in ml/min	Temperatur in °C
Nullniveau	35,0	15,0	11,0	0,35	65
Schrittweite	10,0	5,0	11,0	0,10	65
oberer Wert	45,0	20,0	11,0	0,45	65
unterer Wert	25,0	10,0	11,0	0,25	65

Faktor	Regressionsparameter b_u	Signifikanz	Wirksamkeit W_u	neue nat. Koor- dinate x_u^0(neu)	Veränderung gegenüber alten Werten in %
0	189079,667	Faktor ist signifikant			
A	30672,083	Faktor ist signifikant	306720,833	45,000	28,571
B	-23170,167	Faktor ist signifikant	-115850,833	11,223	-25,181
C	0,000	Faktor übt keinen Einfluß auf Zielfunktion aus	0,000	0,000	
D	-28457,750	Faktor ist signifikant	-2845,775	0,257	-26,509
E	0,000	Faktor übt keinen Einfluß auf Zielfunktion aus	0,000	0,000	
wichtigster Faktor	Faktor A	Bestimmtheitsmaß	B 1,026	Regressionsmodell ist adäquat !	

Tabelle 47 Ergebnisse des 4. Optimierungsschrittes

5. Optimierungsschritt

Eingangswerte:

	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Faktor D	Faktor E
	c(Reagenz) in mg DPC/100 ml	Gehalt HOAc in der Reagenzlösung in %	Kapillarlänge in m	Fluß Reagenzlösung in ml/min	Temperatur in °C
Nullniveau	45,0	15,0	11,0	0,35	65
Schrittweite	10,0	5,0	11,0	0,10	65
oberer Wert	55,0	20,0	11,0	0,45	65
unterer Wert	35,0	10,0	11,0	0,25	65

Faktor	Regressionsparameter b_u	Signifikanz	Wirksamkeit W_u	neue nat. Koor- dinate x_u^0(neu)	Veränderung gegenüber alten Werten in %
0	201850,250	Faktor ist signifikant			
A	15512,083	Faktor ist signifikant	155120,833	55,000	22,222
B	-33106,333	Faktor ist signifikant	-165531,667	4,329	-71,141
C	0,000	Faktor übt keinen Einfluß auf Zielfunktion aus	0,000	0,000	
D	-33427,333	Faktor ist signifikant	-3342,733	0,135	-61,569
E	0,000	Faktor übt keinen Einfluß auf Zielfunktion aus	0,000	0,000	
wichtigster Faktor	Faktor A	Bestimmtheitsmaß B	1,078	Regressionsmodell ist adäquat !	

Tabelle 48 Ergebnisse des 5. Optimierungsschrittes

6.8 Bestimmung der Trägerbelegung bei der Immobilisierung von Mikroperoxidase mittels der Atomabsorptionsspektrometrie

Zur Bestimmung der Trägerbelegung mittels der Atomabsorptionsspektrometrie und der Standardadditionsmethode wurde nach beendeter Immobilisierung jeweils eine bestimmte Menge des Reaktionslösung mit 0,05 % Salzsäure auf 25 ml aufgefüllt. 10 ml davon wurden direkt zur Messung verwendet, weitere 10 ml wurden mit 50 bzw. 100 µl der Standardlösung aufgestockt. Die so vorbereiteten Lösungen wurden an einem Atomabsorptionsspektrometer auf den Eisengehalt hin untersucht ($\lambda = 248,3$ nm, Acetylen/Luft-Flamme; Perkin-Elmer Intensitron Multielementlampe Al/Ca/Cu/Fe/Mg/Si/Zn, Lampenstrom 30 mA).

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Gleichung:

$$c_x = \frac{h_x \cdot c_s \cdot V_s}{h_{xs} \cdot (V_x + V_s) - h_x V_x}$$

Gleichung 21

- c_x = Konzentration der Probe
- c_s = Konzentration des Standards
- V_x = Volumen Probelösung
- V_s = Volumen zugesetzter Standardlösung
- h_x = Meßwert der Probe
- h_{xs} = Meßwert Probe + Standard

Aus der berechneten Eisenkonzentration der Lösung konnte mit Hilfe der Molmasse der Mikroperoxidase ($M = 1862$ g/mol) und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Enzymgehalt im Reaktionsansatz nach der Immobilisierung berechnet werden. Bei bekannter Menge der zuvor eingesetzten Aminopropyl-CPG-Beads und der Mikroperoxidase konnte damit die Trägerbelegung in mg MP-11 / 100 mg Beads bestimmt werden. In nachstehender Tabelle sind die Meßergebnisse im einzelnen aufgeführt:

Beadsorte	50/63,2		50/78,8		50/99,8		50/125	
Einwaage MP-11 in mg	10,3		9,9		9,4		9,4	
c_s in mg Fe/l	500		500		500		500	
V_x in ml	10		10		10		10	
V_s in ml	0,05	0,10	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
h_x in AU	0,0017	0,006	0,002	0,005	0,002	0,004	0,0033	0,0040
h_{xs} in AU	0,0993	0,1717	0,0707	0,0807	0,0953	0,0930	0,1003	0,0957
c_x in mg Fe/l	0,0433	0,1792	0,0724	0,1643	0,0533	0,1118	0,0855	0,1085
c_x in mg MP-11/l	1,4405	5,9582	2,409	5,4637	1,7722	3,7165	2,8418	3,6084
Verdünnungsfaktor	250	50	50	25	50	25	50	25
Konzentration MP-11 im Ansatz nach der Immobilisierung in mg MP-11/l	360,14	297,91	120,44	136,59	88,61	92,91	142,09	90,21
Ansatzvolumen nach der Reaktion in ml	3,50		3,70		3,35		3,48	
Menge MP-11 im Ansatz nach der Immobilisierung in mg	1,80	1,49	0,12	0,14	0,09	0,09	0,49	0,31
Menge immobilisierte MP-11 in mg	8,50	8,81	9,78	9,76	9,31	9,31	8,91	9,09
Einwaage Träger in mg	300,0		303,6		300,0		300,0	
Belegung des Trägers in mg MP-11/100 mg CPG	2,83	2,94	3,22	3,22	3,10	3,10	2,97	3,03
mittlere Trägerbelegung in mg MP-11/100 mg CPG	2,88		3,22		3,10		2,99	

Tabelle 49 Bestimmung der Belegung von Aminopropyl-CPG-Beads mit Mikroperoxidase-11

6.9 Bestimmung oxidierter Pflanzenöle

6.9.1 Meßwerte FOX2-Test

Lagerungs- dauer	Volumen 1-Propanol in ml	a _w -Wert	Einwaage Fett in g	Extinktion	mg [O]/kg Fett	POZ bez. auf Fett	% Fett i. d. Trockenmasse	mg [O]/kg Trockenmasse	POZ bez. auf Trockenmasse
5 h	0,5	0,11	0,0191	0,0361	180	22,6	26,3	48	6,0
		0,23	0,0230	0,0334	167	20,9	25,5	47	5,8
		0,31	0,0215	0,0214	110	13,8	26,5	44	5,6
		0,40	0,0197	0,0129	620	77,6	26,9	165	20,6
		0,51	0,0224	0,0058	285	35,6	24,8	62	7,8
		0,75	0,0193	0,459	2192	274,0	26,5	69	8,6
1 d	0,5	0,11	0,0267	0,476	2275	284,4	29,3	693	86,6
		0,23	0,0224	0,480	2294	286,8	28,9	659	82,3
		0,31	0,0193	0,479	2287	285,9	26,7	609	76,2
		0,40	0,0209	0,584	2790	348,7	28,5	775	96,9
		0,51	0,0201	0,495	2363	295,4	25,3	591	73,9
		0,75	0,0205	0,566	2703	338,0	30,4	816	102,0
2 d	1	0,11	0,0279	0,400	3822	477,7	28,2	1062	132,8
		0,23	0,0273	0,396	3784	473,0	27,2	979	122,4
		0,31	0,0258	0,508	4851	606,3	26,2	1168	146,0
		0,40	0,0306	0,357	3412	426,6	27,4	831	103,9
		0,51	0,0270	0,534	5098	637,3	24,9	1151	143,9
		0,75	0,0317	0,473	4517	564,7	26,9	1159	144,9
3 d	1	0,11	0,0151	0,156	1503	187,9	24,9	345	43,2
		0,23	0,0173	0,197	1893	236,7	24,1	456	57,0
		0,31	0,0150	0,180	1731	216,4	24,4	425	53,1
		0,40	0,0179	0,306	2931	366,4	24,0	652	81,5
		0,51	0,0155	0,293	2803	350,4	27,2	729	91,2
		0,75	0,0161	0,257	2460	307,5	17,8	409	51,1
6 d	3	0,11	0,0240	0,304	8737	1092,2	28,5	2291	311,4
		0,23	0,0248	0,363	10423	1302,8	26,4	2694	336,7
		0,31	0,0283	0,490	14037	1754,7	25,4	3200	400,0
		0,40	0,0219	0,344	9880	1235,0	25,2	2418	302,3
		0,51	0,0270	0,458	13137	1642,2	28,8	3375	421,9
		0,75	0,0244	0,333	9566	1195,7	27,1	2468	308,5
8 d	5	0,11	0,0200	0,287	13729	1716,1	29,4	3270	408,8
		0,23	0,0253	0,302	14443	1805,4	30,3	4074	509,3
		0,31	0,0204	0,264	12633	1579,2	28,7	4047	505,9
		0,40	0,0218	0,278	13300	1662,5	30,3	4030	503,8
		0,51	0,0225	0,352	16848	2106,0	32,5	5466	683,3
		0,75	0,0238	0,261	12514	1564,3	26,0	3032	379,0
10 d	7	0,11	0,0247	0,185	12420	1552,5	22,6	2643	330,3
		0,23	0,0275	0,261	17520	2190,0	21,4	3450	431,3
		0,31	0,0248	0,256	17187	2148,4	23,0	4194	524,3
		0,40	0,0236	0,231	15520	1940,0	27,3	4106	513,2
		0,51	0,0270	0,307	20554	2569,2	-	-	-
		0,75	0,0271	0,302	20254	2531,7	23,0	4482	560,3

Lagerungs- dauer	Volumen 1-Propanol in ml	a_w -Wert	Einwaage Fett in g	Extinktion	mg [O]/kg Fett	POZ bez. auf Fett	% Fett i. d. Trockenmasse	mg [O]/kg Trockenmasse	POZ bez. auf Trockenmasse
12 d	7	0,11	0,0209	0,219	14687	1835,9	26,8	4161	520,2
		0,23	0,0241	0,276	18520	2315,0	26,0	4961	620,2
		0,31	0,0260	0,333	22320	2790,0	25,1	5388	673,5
		0,40	0,0228	0,265	17787	2223,4	27,6	4950	618,8
		0,51	0,0245	0,299	20054	2506,7	24,8	4882	610,3
		0,75	0,0212	0,228	15321	1915,0	25,8	3735	466,9
16 d	10	0,11	0,0244	0,313	29981	3747,7	19,7	5872	734,0
		0,23	0,0232	0,286	27410	3426,2	19,6	5212	651,5
		0,31	0,0207	0,265	25362	3170,3	19,0	4568	571,0
		0,40	0,0256	0,335	32029	4003,6	19,4	6086	760,7
		0,51	0,0245	0,284	27172	3396,5	19,6	5377	672,2
		0,75	0,0243	0,325	31077	3884,6	18,9	5833	729,1

6.9.2 Kalibriergeraden und Meßwerte der HPLC-Bestimmung mit UV- und Fluoreszenzdetektion

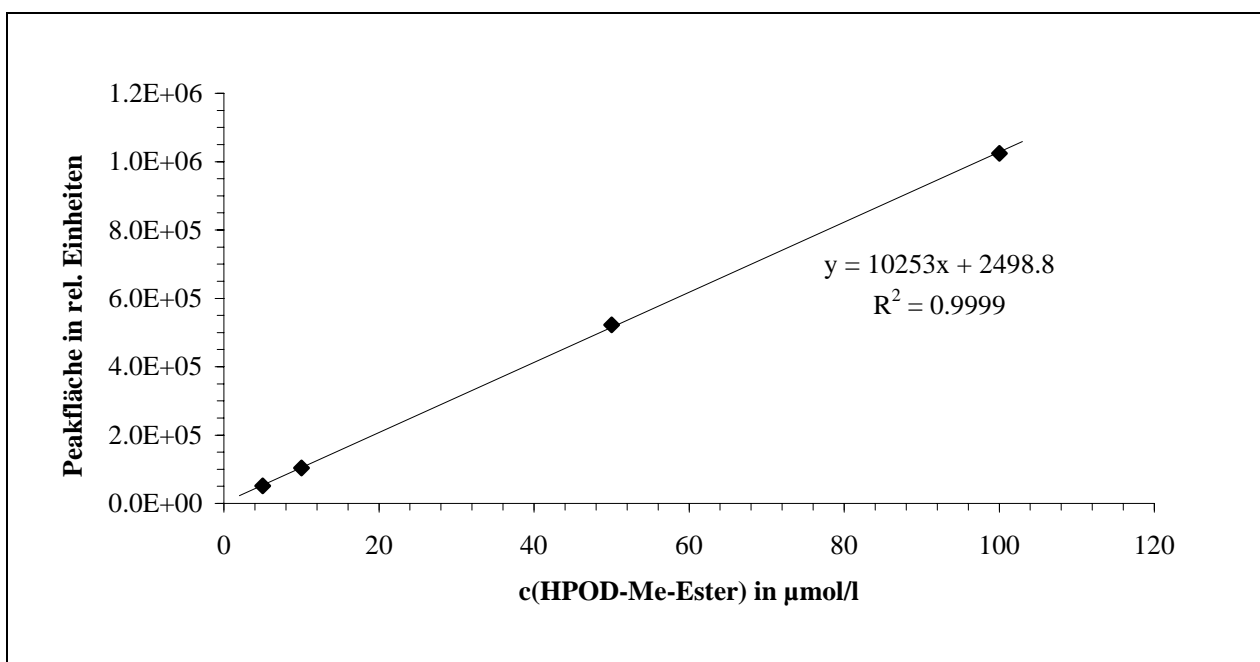


Abbildung 66 Kalibriergerade für die HPLC-Bestimmung von HPOD-Me-Ester mit UV-Detektion bei 234 nm (13S-HPOD-Me-Ester als Standard)

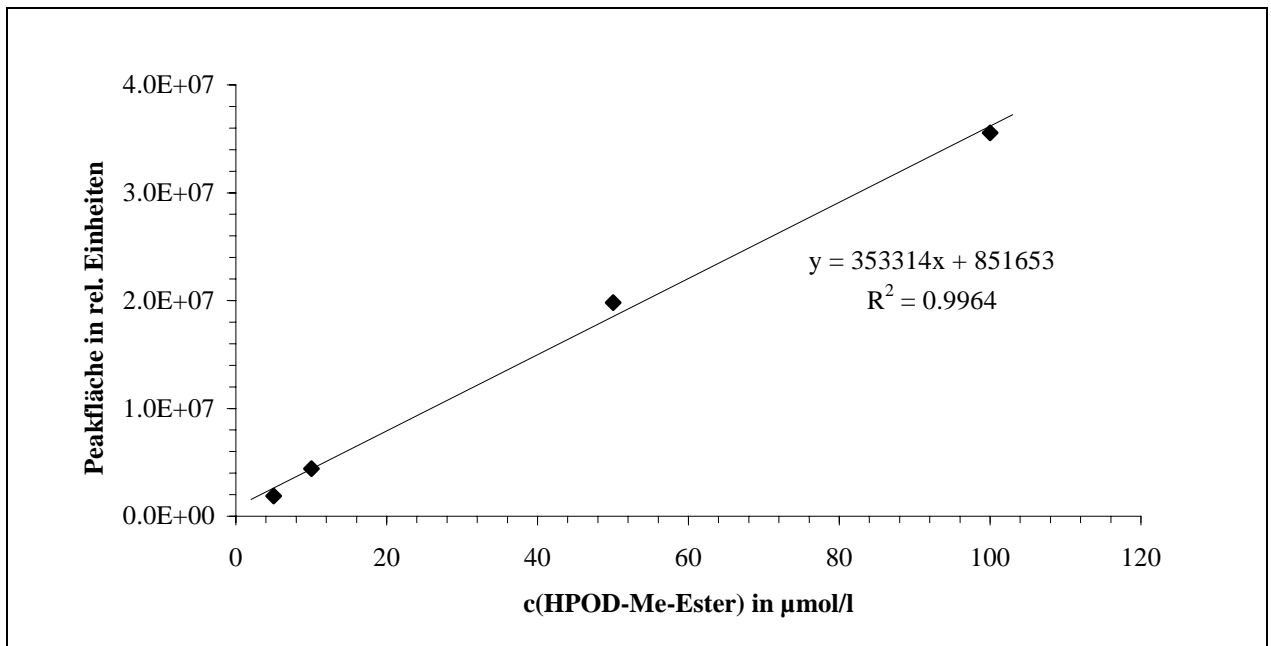


Abbildung 67 Kalibriergerade für die HPLC-Bestimmung von HPOD-Me-Ester mit Fluoreszenz-Detektion (Enzymreaktor; 13S-HPOD-Me-Ester als Standard)

Lagerungs- dauer	a_w -Wert	UV (234 nm)		Fluoreszenz	
		Konzentration LOOH in g/kg Fett	Konzentration LOOH in g/kg Fett i. d. Trok- kenmasse	Konzentration LOOH in g/kg Fett	Konzentration LOOH in g/kg Fett i. d. Trok- kenmasse
5 h	0,11	0,0600	0,0135	-	-
	0,23	0,0811	0,0174	-	-
	0,31	0,0849	0,0195	-	-
	0,40	0,0757	0,0206	-	-
	0,51	0,0891	-	-	-
	0,75	0,0959	0,0221	-	-
1 d	0,11	0,0752	0,0221	-	-
	0,23	0,1122	0,0339	-	-
	0,31	0,1253	0,0360	0,0293	0,0084
	0,40	0,1266	0,0383	0,0259	0,0078
	0,51	0,1411	0,0458	0,0544	0,0177
	0,75	0,1417	0,0389	0,0541	0,0141
2 d	0,11	0,1564	0,0446	0,0660	0,0188
	0,23	0,1826	0,0482	0,0923	0,0244
	0,31	0,1955	0,0497	0,1248	0,0317
	0,40	0,2164	0,0545	0,1297	0,0327
	0,51	0,2401	0,0690	0,1436	0,0413
	0,75	0,1970	0,0537	0,1229	0,0333

Lagerungs- dauer	a _w -Wert	UV (234 nm)		Fluoreszenz	
		Konzentration LOOH in g/kg Fett	Konzentration LOOH in g/kg Fett i. d. Trok- kenmasse	Konzentration LOOH in g/kg Fett	Konzentration LOOH in g/kg Fett i. d. Trok- kenmasse
3 d	0,11	0,1942	0,0483	0,1199	0,0298
	0,23	0,2025	0,0488	0,1465	0,0353
	0,31	0,2312	0,0564	0,1458	0,0356
	0,40	0,2634	0,063	0,2077	0,0499
	0,51	0,2452	0,0666	0,1651	0,0449
	0,75	0,2716	0,0482	0,1808	0,0321
6 d	0,11	0,3214	0,0906	0,2654	0,0748
	0,23	0,3894	0,1057	0,3538	0,0960
	0,31	0,3834	0,1006	0,3584	0,0940
	0,40	0,4262	0,1167	0,3978	0,1089
	0,51	0,4497	0,1121	0,3918	0,0976
	0,75	0,4277	0,1152	0,3429	0,0924
8 d	0,11	0,4097	0,1200	0,3587	0,1050
	0,23	0,4216	0,1218	0,3835	0,1108
	0,31	0,5238	0,1400	0,5251	0,1403
	0,40	0,7891	0,2246	0,7209	0,2052
	0,51	0,4593	0,1160	0,4088	0,1032
	0,75	0,6783	0,2062	0,6030	0,1833
10 d	0,11	0,6318	0,1664	0,6810	0,1793
	0,23	0,7770	0,1979	0,8263	0,2105
	0,31	0,7280	0,1931	0,7800	0,2069
	0,40	0,7547	0,2027	0,8424	0,2263
	0,51	0,7395	0,1837	0,8386	0,2083
	0,75	0,7116	0,1886	0,7730	0,2049
12 d	0,11	0,8220	0,2204	0,8015	0,2149
	0,23	0,8560	0,2229	0,8046	0,2095
	0,31	0,8917	0,2240	0,8772	0,2203
	0,40	0,8996	0,2485	0,8730	0,2412
	0,51	0,9872	0,2444	0,9750	0,2412
	0,75	0,9456	0,2443	0,8882	0,2295

6.9.3 Kalibriergerade und Meßwerte der HPLC-Bestimmung mit nichtenzymatischer Nachsäulendetektion

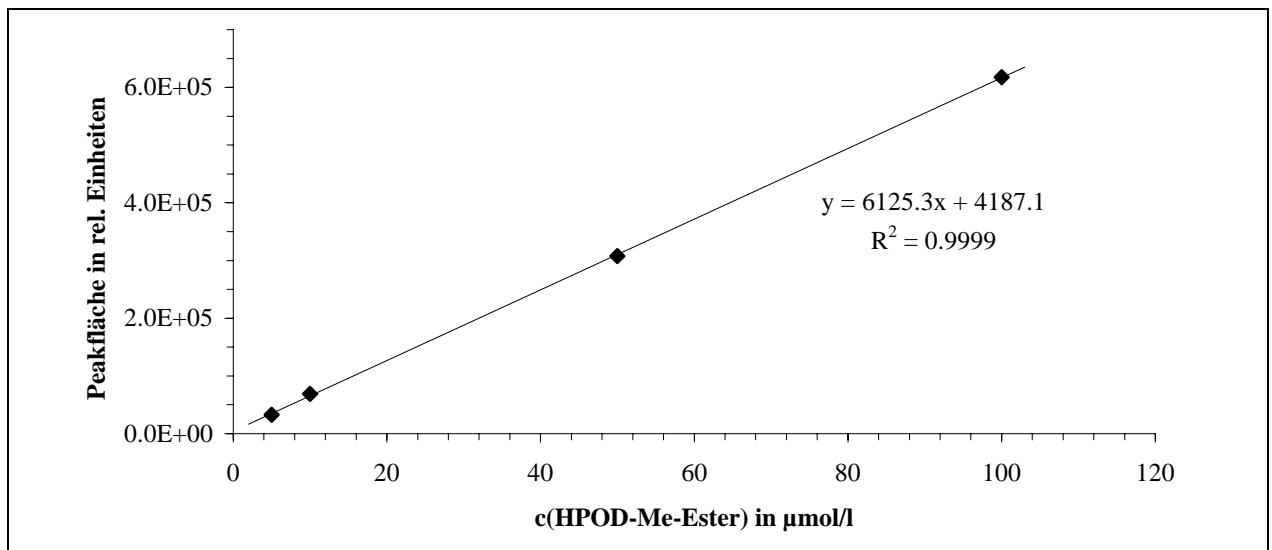


Abbildung 68 Kalibriergerade für die HPLC-Bestimmung von HPOD-Me-Ester mit UV/VIS-Detektion (DMPD-System ; 13S-HPOD-Me-Ester als Standard)

Lagerungszeit	a_w -Wert	Konzentration LOOH in g / kg Fett	Konzentration LOOH in g / kg Fett i. d. Trockenmasse
5 h	0,11	0	0
	0,23	0,0444	0,0095
	0,31	0,0334	0,0077
	0,40	0,0483	0,0132
	0,51	0,0474	0
	0,75	0,0304	0,0072
1 d	0,11	0,0447	0,0131
	0,23	0,0576	0,0174
	0,31	0,0836	0,0240
	0,40	0,1022	0,0309
	0,51	0,1055	0,0342
	0,75	0,1054	0,0274
2 d	0,11	0,1157	0,0330
	0,23	0,1335	0,0353
	0,31	0,1682	0,0427
	0,40	0,1826	0,0460
	0,51	0,1854	0,0533
	0,75	0,1678	0,0455
3 d	0,11	0,1503	0,0373
	0,23	0,1698	0,0409
	0,31	0,1945	0,0475
	0,40	0,2440	0,0586
	0,51	0,2086	0,0567
	0,75	0,2178	0,0387

Lagerungszeit	a _w -Wert	Konzentration LOOH in g / kg Fett	Konzentration LOOH in g / kg Fett i. d. Trockenmasse
6 d	0,11	0,2228	0,0628
	0,23	0,3078	0,0836
	0,31	0,4393	0,1152
	0,40	0,3132	0,0857
	0,51	0,4336	0,1081
	0,75	0,3569	0,0962
8 d	0,11	0,3719	0,1089
	0,23	0,3571	0,1032
	0,31	0,4882	0,1305
	0,40	0,6875	0,1957
	0,51	0,3996	0,1009
	0,75	0,5912	0,1797
10 d	0,11	0,5479	0,1443
	0,23	0,6794	0,1730
	0,31	0,6306	0,1672
	0,40	0,2111	0,0567
	0,51	0,6881	0,1709
	0,75	0,6428	0,1703
12 d	0,11	0,7791	0,2089
	0,23	0,2320	0,0604
	0,31	0,8301	0,2085
	0,40	0,8603	0,2377
	0,51	0,3256	0,0806
	0,75	0,2800	0,0724
16 d	0,11	1,0568	0,2083
	0,23	0,8813	0,1730
	0,31	0,7969	0,1512
	0,40	1,1797	0,2293
	0,51	1,2949	0,2540
	0,75	1,647	0,2573
23 d	0,11	2,5757	0,5962
	0,23	1,7209	0,4052
	0,31	1,6709	0,3780
	0,40	2,0828	0,5054
	0,51	1,7517	0,4032
	0,75	1,4381	0,3224

6.10 Literaturverzeichnis

- ¹ J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*; 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1989-1992
- ² G. O. Löffler, P. E. Petrides: *Physiologische Chemie*; 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1988
- ³ H.-D. Belitz, W. Grosch: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1992
- ⁴ D. Steinhilber: Leukotriene als Mediatoren bei Entzündungsprozessen: Physiologie und Pharmakologie des 5-Lipoxygenasestoffwechsels; *BIOforum* **17**, 296-303 (1994)
- ⁵ H. Bader (Hrsg.): *Lehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*; 2. Auflage, VCH Weinheim 1985
- ⁶ B. Samuelsson: Die Leukotriene, superaktive, an Allergie und Entzündung beteiligte Wirkstoffe; *Angew. Chem.* **94**, 881-889 (1982)
- ⁷ J. Sabieraj: Welche Rolle spielen modifizierte Lipoproteine?; *Deutsche Apotheker Zeitung* **33**, 1711-1712 (1991)
- ⁸ H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jürgens: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL; *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 341-390 (1991)
- ⁹ M. Karel, K. Schaich, R. B. Roy: Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids; *J. Agric. Food Chem.* **23**, 159-163 (1975)
- ¹⁰ R. T. Dean, S. Fu, R. Stocker, M. J. Davies: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation; *Biochem. J.* **324**, 1-18 (1997)
- ¹¹ P. Heinmöller: *HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in biologischen Proben unter Verwendung selektiver Detektionsmethoden*; Dissertation, Technische Universität München, 1997
- ¹² I. R. Kompanall, B. H. S. Lau: Ozone damage of Escherichia coli K-12; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 610-614 (1996)
- ¹³ J. J. Thiele, M. G. Traber, T. G. Polefka, C. E. Cross, L. Packer: Ozone-exposure Depletes Vitamin E and Induces Lipid Peroxidation in Murine Stratum Corneum; *J. Invest. Dermatol.* **108**, 753-757 (1997)
- ¹⁴ G. Mulhaupt, T. Ruppert, A. Schlicksupp, L. Hesse, D. Beher, C. L. Masters, K. Beyreuther: Reactive Oxygen Species and Alzheimer's Disease; *Biochem. Pharmacol.* **54**, 533-539 (1997)

- ¹⁵ C. Hölzel, G. Spiteller: Zellschädigung als Ursache für die Bildung von Hydroperoxiden ungesättigter Fettsäuren; *Naturwissenschaften* **82**, 452-460 (1995)
- ¹⁶ E. N. Frankel: Lipid Oxidation; *Prog. Lipid Res.* **19**, 1-22 (1980)
- ¹⁷ E. N. Frankel: Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids; *Prog. Lipid Res.* **23**, 197-221 (1985)
- ¹⁸ P. Lechten: Singulett-Sauerstoff; *Chem. unserer Zeit* **8**, 11-16 (1974)
- ¹⁹ J. Jiang, A. Kamal-Eldin: Comparing Methylene Blue-Photosensitized Oxidation of Methyl-Conjugated Linoleate and Methyl Linoleate; *J. Agric. Food Chem.* **46**, 923-927 (1998)
- ²⁰ E. N. Frankel, W. E. Neff, T. R. Bessler: Analysis of Autoxidized Fats by Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry: V. Photosensitized Oxidation; *Lipids* **14**, 961-967 (1979)
- ²¹ W. Adam: Die Singulett-sauerstoff-Story; *Chem. unserer Zeit* **15**, 190-196 (1981)
- ²² B. Ohtani, M. Nishida, S. Nishimoto, T. Kagiya: Photooxygenation of methyl linoleate sensitized by porphyrins and dyes in acetonitrile solution and aqueous emulsion systems; *Photochem. Photobiol.* **44**, 725-732 (1986)
- ²³ J. C. Andre, M. O. Funk: Determination of Stereochemistry in the Fatty Acid Hydroperoxide Products of Lipoxygenase Catalysis; *Anal. Biochem.* **158**, 316-321 (1986)
- ²⁴ M. O. Funk, J. C. Andre, T. Otsuki: Oxygenation of Trans Polyunsaturated Fatty Acids by Lipoxygenase Reveals Steric Features of the Catalytic Mechanism; *Biochem.* **26**, 6880-6884 (1987)
- ²⁵ K. V. Honn, D. G. Tang, X. Gao, I. A. Butovich, B. Liu, J. Timar, W. Hagmann: 12-Lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis; *Cancer and Metastasis Reviews* **13**, 365-396 (1994)
- ²⁶ T. Galliard, D. R. Phillips: Lipoxygenase from potato tubers - Partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid; *Biochem. J.* **124**, 431-438 (1971)
- ²⁷ P. Reddanna, J. Whelan, K. R. Maddipati: Purification of Arachidonate 5-Lipoxygenase from Potato Tubers; *Methods Enzymol.* **187**, 268-277 (1990)
- ²⁸ P. Dussault: The Peroxide Changes Everything: New Methodology for the Synthesis of Peroxide-containing Natural Products; *Synlett* 997-1003 (1995)
- ²⁹ P. Dussault, I. Quen Lee: A Chemoenzymatic Approach to Hydroperoxyeicosatetraenoic Acids. Total Synthesis of 5(S)-HPETE; *J. Org. Chem.* **60**, 218-226 (1995)

- ³⁰ K. Heitkamp: *Synthese und HPLC-Bestimmung von Hydroperoxyfettsäuren und -estern*; Diplomarbeit, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal (1994)
- ³¹ Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*: Band E13/1, S. 384; Stuttgart 1988
- ³² N. Baba, S. Tahara, S. Nakajima, J. Iwasa, T. Kaneko, M. Matsuo: Synthesis of Cholesteryl 13-Hydroperoxyoctadecadienoate and Its Derivative with Lipoxygenase; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 540 (1992)
- ³³ N. Baba, N. Hirota, S. Nakajima, J. Iwasa, T. Kaneko, M. Matsuo: Chemoenzymatic Synthesis of Triacylglyceride Hydroperoxide, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1694-1695 (1992)
- ³⁴ N. Baba, K. Yoneda, S. Tahara, J. Iwasa, T. Kaneko, M. Matsuo: A Regioselective, Stereoselektive Synthesis of Diacylglycerophosphocholine Hydroperoxide by use of Lipoxygenase and Lipase, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **18**, 1281-1282 (1990)
- ³⁵ W. Grosch: Abbau von Linol- und Linolensäurehydroperoxiden in Gegenwart von Ascorbinsäure; *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **163**, 4-7 (1977)
- ³⁶ H. Stöckmann: *Untersuchung oxidierter Öle bzw. Fette auf Peroxide mittels FOX-2-Test und zweier HPLC-Systeme mit unterschiedlicher Nachsäulenderivatisierung*; Projektaufgabe im Fach Lebensmittelchemie; Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal; Wintersemester 1994-1995
- ³⁷ S. Bergström, R. T. Holman; Lipoxidase and the autoxidation of unsaturated fatty acids; *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 425-457 (1948)
- ³⁸ H. W.-S. Chan, W. Grosch; *Autoxidation of unsaturated Lipids: 4. Reactions of Hydroperoxide-Products of Low Molecular Weight*; Academic Press, London 1987, S. 95-139
- ³⁹ H. T. Badings: Cold storage defects in butter and their relation to the autoxidation of unsaturated fatty acids; *Ned. Med. Zuiveltijdschr.* **24**, 147-215 (1970)
- ⁴⁰ P. Schieberle, W. Grosch: Decomposition of linoleic acid hydroperoxides; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **173**, 192-198 (1981)
- ⁴¹ H. W. Gardner, D. Weisleder, E. C. Nielson: Acid Catalysis of a Linoleic Acid Hydroperoxide: Formation of Epoxides by an Intramolecular Cyclization of the Hydroperoxide Group; *J. Org. Chem.* **49**, 508-515 (1984)
- ⁴² H. W. Gardner, T. D. Simpson, M. Hamberg: Transformation of Fatty Acid Hydroperoxides by Alkali and Characterization of Products; *Lipids* **28**, 487-495 (1993)

- ⁴³ T. D. Simpson, H. W. Gardner: Conversion of 13S-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadienoic Acid to the Corresponding Hydroxy Fatty Acid by KOH: A Kinetic Study; *Lipids* **28**, 325-330 (1993)
- ⁴⁴ C. H. Lea: Rancidity in Edible Fats; *Rep. Food Invest. Board. London* 31-38 (1929)
- ⁴⁵ C. H. Lea: The Effect of Light on the Oxidation of Fats; *Proc. Roy. Soc. [B] London* **108**, 175-189 (1931)
- ⁴⁶ D. H. Wheeler: Peroxide Formation as a Measure of Autoxidative Deterioration; *Oil Soap* **9**, 89 ff. (1932)
- ⁴⁷ V.C. Mehlenbacher: *The Analysis of Fats and Oils*, Garrard Press, Champaign, IL, 1960
- ⁴⁸ K. Oette, M. L. Peterson, R. L. McAuley: A highly sensitive method for measurement of lipid hydroperoxide by iodimetry and amperometric endpoint; *J. Lipid Res.* **4**, 212-215 (1963)
- ⁴⁹ J. I. Gray: Measurement of Lipid Oxidation: A Review; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 539-546 (1977)
- ⁵⁰ Y. Yoshimura, S. Koike, H. Tanaka, K. Tamura, K. Ohsawa, K. Imaeda, S. Akiyama, K. Nakashima: Fluorometric Determination of Lipid Peroxides in Tissues with 1,3-Diphenyl-2-thiobarbituric Acid; *Anal. Sci.* **4**, 207-210 (1988)
- ⁵¹ L. K. Dahle, E. G. Hill, R. T. Holman: The Thiobarbituric Acid Reaction and the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acid Methyl Esters; *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 253-261 (1962)
- ⁵² D. V. Hoyland, A. J. Taylor: A Review of the Methodology of the 2-Thiobarbituric Acid Test; *Food. Chem.* **40**, 271-291 (1991)
- ⁵³ K. Ohsawa, Y. Yoshimura, H. Tanaka, F. Okajima, K. Tamura, K. Imaeda: High Performance Liquid Chromatography-Fluorometric Determination of Lipid Peroxides in Serum with 1,3-Diphenyl-2-thiobarbituric Acid; *Anal. Sci.* **1**, 473 (1985)
- ⁵⁴ J. Fernandez, J. A. Perez-Alvarez, J.A. Fernandez-Lopez: Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat; *Food Chem.* **59**, 345-353 (1997)
- ⁵⁵ D. Bonnefont-Rousselot, C. Motta, A. O. Khalil, R. Sola, A. E. La Ville, J. Delattre, M. Gardes-Albert: Physicochemical changes in human high-density lipoproteins (HDL) oxidized by gamma radiolysis-generated oxyradicals. Effect on their cholesterol effluxing capacity; *Biochim. Biophys. Acta* **1255**, 23-30 (1995)

- ⁵⁶ S. H. Ibbotson, C. R. Lambert, M. N. Moran, M. C. Lynch, I. E. Kochevar: Benzoyl peroxide increases UVA-induced plasma membrane damage and lipid oxidation in murine leukemia L1210 cells; *J. Invest. Dermatol.* **110**, 79-83 (1998)
- ⁵⁷ F. W. Heaton, N. Uri: Improved iodometric methods for the determination of lipid peroxides; *J. Sci. Food Agric.* **9**, 781-786 (1958)
- ⁵⁸ M. El-Saadani, H. Esterbauer, M. El-Sayed, M. Goher, A. Y. Nassar, G. Jürgens: A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent; *J. Lipid Res.* **30**, 627-630 (1989)
- ⁵⁹ J. M. Gebicki, J. Guille: Spectrophotometric and High-Performance Chromatographic Assays of Hydroperoxides by the Iodometric Technique; *Anal. Biochem.* **176**, 360-364 (1989)
- ⁶⁰ R. A. Chapman, W. D. McFarlane: A colorimetric method for the determination of fat- peroxides and its application in the study of the keeping quality of milk powders; *Canad. J. Res.[B]* **21**, 133 ff. (1943)
- ⁶¹ G. L. Hills, C. C. Thiel: The ferric thiocyanate method of estimating peroxide in fat of butter, milk and dried milk; *J. Dairy Res.* **14**, 340 ff. (1946)
- ⁶² H. Smith: The determination of fat peroxide in small samples of the lean and fatty tissues of meat by the ferric thiocyanate method; *J. Sci. Food Agric.* **3**, 26-31 (1952)
- ⁶³ A. F. Holleman, E. Wiberg: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*; 91.-100 Auflage , de Gruyter, Berlin 1985
- ⁶⁴ A. Dieffenbacher, B. Lüthi: Die direkte kolorimetrische Bestimmung der Peroxidzahl (POZ) in Milchprodukten; *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **77**, 544-553 (1986)
- ⁶⁵ B. L. Gupta: Microdetermination Techniques for H₂O₂ in Irradiated Solutions; *Microchem. J.* **18**, 363-374 (1973)
- ⁶⁶ H. W. Michaels, J. W. Hunt: Determination of peroxides and hydroperoxides in irradiated solutions of nucleic acid constituents and DNA; *Anal. Biochem.* **87**, 135-140 (1978)
- ⁶⁷ Z.-Y. Jiang, J. V. Hunt, S. P. Wolff: Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein; *Anal. Biochem.* **202**, 384-389 (1992)
- ⁶⁸ Z.-Y. Jiang, A. C. S. Woollard, S. P. Wolff: Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ in the Presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method; *Lipids* **26**, 853-856 (1991)

- ⁶⁹ J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi, S. P. Wolff: Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine; *Anal. Biochem.* **220**, 403-409 (1994)
- ⁷⁰ Z.-Y. Jiang, A. C. S. Woollard, S. P. Wolff: Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation; *FEBS Letters* **268**, 69-71 (1990)
- ⁷¹ C. Wurster: Zur Kenntnis des Dimethylparaphenyldiamins/Über die Einwirkung oxydirender Agentien auf Tetramethylparaphenyldiamin; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **12**, 1803-1813 (1879)
- ⁷² L. L. Smith, F. L. Hill: Detection of sterol hydroperoxides of thin-layer chromatoplates by means of Wurster dyes; *J. Chromatogr.* **66**, 101-109 (1972)
- ⁷³ K. Hirayama, N. Unohara: Spectrometric catalytic determination of an ultratrace amount of iron(III) in water based on the oxidation of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine by hydrogen peroxide; *Anal. Chem.* **60**, 2537-2577 (1988)
- ⁷⁴ I. Y. Kolotyrkina, L. K. Shpigun, Y. A. Zoltov, A. Malahoff: Application of flow injection spectrophotometry to the determination of dissolved iron in sea-water; *The Analyst (London)* **120**, 201-206 (1995)
- ⁷⁵ I. Mori, H. Tominaga, Y. Fukjita, T. Matsuo: Sensitive spectrophotometric determination of benzoyl peroxide with N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; *Anal. Letters* **30**, 2433-2439 (1997)
- ⁷⁶ J. Stamm: Evidence of Decomposition in Oils and Fats; *Analyst (London)* **51**, 416-417 (1926)
- ⁷⁷ S. Korpáczy: Bestimmung der Ranzigkeit von Fetten mittels der Reaktion nach Stamm; *Zeitschr. Unters. Lebensmittel* **67**, 75-79 (1934)
- ⁷⁸ D. L. Hamm, E. G. Hammond, V. Parvanah, H. E. Snyder: The Determination of Peroxides by the Stamm Method; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 920-922 (1965)
- ⁷⁹ K. Ueberreiter, G. Sorge: Zur quantitativen Bestimmung organischer Peroxide - Teil I: Zwei kolorimetrische Verfahren; *Angew. Chem.* **68**, 352-354 (1956)
- ⁸⁰ K. Ueberreiter, G. Sorge: Zur quantitativen Bestimmung organischer Peroxide - Teil II: Prüfung der Methylenblau-Methode; *Angew. Chem.* **68**, 486-492 (1956)
- ⁸¹ M. I. Eiss, P. Giesecke: Colorimetric Determination of Organic Peroxides; *Anal. Chem.* **31**, 1558-1560 (1959)

- ⁸² B. J. Auerbach, J. S. Kiely, J. A. Cornicelli: A Spectrophotometric Microtiter-Based Assay for the Detection of Hydroperoxy Derivatives of Linoleic Acid; *Anal. Biochem.* **201**, 375-380 (1992)
- ⁸³ K. Yagi, K. Kiuchi, Y. Saito, A. Miike, N. Kayahara, T. Tatano, N. Ohishi: Use of a new methylene blue derivative for determination of lipid peroxides in foods; *Biochem. Int.* **12**, 367-371 (1986)
- ⁸⁴ K. Kanazawa, S. Minamoto, H. Ashida, K. Yamada, G. Danno, M. Natake: Determination of Lipid Peroxide Contents in Rat Liver by a New Coloration Test; *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2799-2801 (1985)
- ⁸⁵ W. E. Neff, E. N. Frankel: Quantitative Analyses of Hydroxystearate Isomers from Hydroperoxides by High Pressure Liquid Chromatography of Autoxidized and Photosensitized-oxidized Fatty Esters; *Lipids* **15**, 587-590 (1980)
- ⁸⁶ J. I. Teng, L. L. Smith: High-performance liquid chromatography of linoleic acid hydroperoxides and their corresponding alcohol derivatives; *J. Chromatogr.* **350**, 445-451 (1985)
- ⁸⁷ M. L. Lenz, H. Hughes, J. R. Mitchell, D. P. Via, J. R. Guyton, A. A. Taylor, A. M. Gotto, C. V. Smith: Lipid hydroperoxy and hydroxy derivatives in copper catalyzed oxidation of low density lipoprotein; *J. Lipid Res.* **31**, 1043-1050 (1990)
- ⁸⁸ J. P. Koskas, J. Cillard, P. Cillard: Direct high-performance liquid chromatographic separation of hydroperoxide isomers of linoleic acid; *J. Chromatogr.* **258**, 280-283 (1983)
- ⁸⁹ S. M. Siegel, K. Roberts: Biochemical activity and water: The activity of heme enzymes in non-aqueous media; *Space Life Science* **1**, 131-134 (1968)
- ⁹⁰ J. Terao, I. Asano, S. Matsushita: Preparation of Hydroperoxy and Hydroxy Derivatives of Rat Liver Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine; *Lipids* **20**, 312-317 (1985)
- ⁹¹ T. Miyazawa: Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by chemiluminescence-HPLC-assay; *Free Radical. Biol. Med.* **7**, 209-217 (1989)
- ⁹² T. Miyazawa, K. Fujimoto, S. Oikawa: Determination of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein from Human Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection; *Biomedical Chromatography* **4**, 131-134 (1990)
- ⁹³ Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker, B. N. Ames: Detection and Characterization of Lipid Hydroperoxides at Picomole Levels by High-Performance Liquid Chromatography; *Anal. Biochem.* **160**, 7-13 (1987)

- ⁹⁴ Y. Yamamoto, B. N. Ames: Detection of lipid hydroperoxides and hydrogen peroxide at picomole levels by an HPLC isoluminol chemiluminescence assay; *Free Radical. Biol. Med.* **3**, 359-361 (1987)
- ⁹⁵ T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto: Chemiluminescence - High performance liquid chromatography of phosphatidylcholine hydroperoxide; *Anal. Lett.* **20**, 915-925 (1987)
- ⁹⁶ Y. Yamamoto, B. Frei, B. N. Ames: Assay of Lipid Hydroperoxides Using High-Performance Liquid Chromatography with Isoluminol Chemiluminescence Detection; *Methods Enzymol.* **186**, 371-381 (1990)
- ⁹⁷ A. Mullertz, A. Schmedes, G. Holmer: Separation and Detection of Phospholipid Hydroperoxides in the Low Nanomolar Range by a High Performance Liquid Chromatography/Ironthiocyanate Assay; *Lipids* **25**, 415-418 (1990)
- ⁹⁸ K. Akasaka, T. Suzuki, H. Ohru, H. Meguro: Study on aromatic phosphines for novel fluorometry of hydroperoxides (II) - The determination of lipid hydroperoxides with diphenyl-1-pyrenylphosphin; *Analyt. Lett.* **20**, 797-807 (1987)
- ⁹⁹ K. Akasaka, H. Ohru, H. Meguro: An aromatic phosphine reagent for the HPLC-fluorescence determination of hydroperoxides - Determination of phosphatidylcholine hydroperoxides in human plasma; *Analyt. Lett.* **21**, 965-975 (1988)
- ¹⁰⁰ K. Akasaka, T. Suzuki, H. Ohru, H. Meguro: Study on aromatic phosphines for novel fluorometry of hydroperoxides (I) - Synthesis and spectral properties of diphenyl aryl phosphines and their oxides; *Analyt. Lett.* **20**, 731-745 (1987)
- ¹⁰¹ K. Akasaka, H. Ohru, H. Meguro: Normal-phase high-performance liquid chromatography with a fluorimetric postcolumn detection system for lipid hydroperoxides; *J. Chromatogr.* **628**, 31-35 (1993)
- ¹⁰² K. Akasaka, H. Ohru, H. Meguro: Measurement of Cholesterol Ester Hydroperoxide of High and Combined Low and Very Low Density Lipoprotein in Human Plasma, *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 396-399 (1994)
- ¹⁰³ J. R. Wagner, M. Berger, J. Cadet, J. E. van Lier: Analysis of thymidine hydroperoxides by post column reaction high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr.* **504**, 191-196 (1990)
- ¹⁰⁴ A. Boddenberg: *Entwicklung neuer Nachsäulenreaktionssysteme zur UV/VIS-Detektion von Hydroperoxiden in der HPLC*; Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal 1998

- ¹⁰⁵ M. O. Funk, M. B. Keller, B. Levison: Determination of Peroxides by High Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection; *Anal. Chem.* **52**, 771-773 (1980)
- ¹⁰⁶ M. O. Funk, W. J. Baker: Determination of organic peroxides by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection; *J. Liquid Chromatogr.* **8**, 63-675 (1985)
- ¹⁰⁷ A. L. Lazrus, G. L. Kok, S. N. Gilin, J. A. Lind: Automated Fluorometric Method for Hydrogen Peroxide in Atmospheric Precipitation; *Anal. Chem.* **57**, 917-922 (1985)
- ¹⁰⁸ E. Hellpointner, S. Gäb: Detection of methyl, hydroxymethyl and hydroxyethyl hydroperoxides in air and precipitation; *Nature* **337**, 631-634 (1989)
- ¹⁰⁹ H. H. Kurth: *Bestimmung von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden in pg-Mengen: Entwicklung und Anwendung von flüssigkeitschromatographischen Methoden zur Analyse von Umweltproben*; Dissertation, Technische Universität München 1992
- ¹¹⁰ E. N. Frankel, W. E. Neff, W. K. Rohwedder, B. P. S. Khambay, R. F. Garwood, B. C. L. Weedon: Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: I. Methyl Oleate; *Lipids* **12**, 901-907 (1977)
- ¹¹¹ E. N. Frankel, W. E. Neff, W. K. Rohwedder, B. P. S. Khambay, R. F. Garwood, B. C. L. Weedon: Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: II. Methyl Linoleate; *Lipids* **12**, 908-913 (1977)
- ¹¹² E. N. Frankel, W. E. Neff, W. K. Rohwedder, B. P. S. Khambay, R. F. Garwood, B. C. L. Weedon: Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: III. Methyl Linolenate; *Lipids* **12**, 1055-1061 (1977)
- ¹¹³ D. C. Zimmerman, B. A. Vick: Specificity of Flaxseed Lipoxygenase; *Lipids* **5**, 392-397 (1969)
- ¹¹⁴ W. D. Lehmann, M. Stephan, G. Fürstenberger: Profiling Assay for Lipoxygenase Products of Linoleic and Arachidonic Acid by Gas Chromatography - Mass Spectrometry; *Anal. Biochem.* **204**, 158-170 (1992)
- ¹¹⁵ C. Sondermann, W. Grosch: Nachweis einer Lipidperoxidation in wasserarmen Lebensmitteln durch Analyse der Monohydroxyfettsäuren; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **168**, 260-265 (1984)
- ¹¹⁶ J. Terao, S. Matsushita: Analysis of Photosensitized Oxidation Products of Unsaturated Triglycerides and Vegetable Oils by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry; *Agric. Biol. Chem.* **45**, 601-608 (1981)

- ¹¹⁷ D. M. Guido, R. McKenna, W. R. Mathews: Quantitation of Hydroperoxy-Eicosatetraenoic acids and Hydroxy-Eicosatetraenoic Acids as Indicators of Lipid Peroxidation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry; *Anal. Biochem.* **209**, 123-129 (1993)
- ¹¹⁸ T. Nikkari, U. Malo-Ranta, T. Hiltunen, O. Jaakkola, S. Ylä-Herttua: Monitoring of lipoprotein oxidation by gas-chromatographic analysis of hydroxy fatty acids; *J. Lipid Res.* **36**, 200-207 (1995)
- ¹¹⁹ S. Budavari (Editor): *The Merck Index 12th edition*, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station NJ, 1996
- ¹²⁰ D. W. Thomas, F. J. G. M. van Kuijk, E. A. Dratz, R. J. Stephens: Quantitative determination of hydroxy fatty acids as an indicator of in-vivo lipid peroxidation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methods; *Anal. Biochem.* **198**, 104-111 (1991)
- ¹²¹ P. Wheelan, J. A. Zirrolli, R. C. Murphy: Analysis of Hydroxy Fatty Acids as Pentafluorobenzyl Ester, Trimethylsilyl Ether Derivatives by Electron Ionization Gas Chromatography/Mass Spectrometry; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, 40-51 (1995)
- ¹²² R. Wilson, R. Smith, P. Wilson, M. J. Shepherd, R. A. Riemer: Quantitative Gas Chromatography-Mass Spectrometry Isomer-Specific Measurement of Hydroxy Fatty Acids in Biological Samples and Food as a Marker of Lipid Peroxidation; *Anal. Biochem.* **248**, 76-85 (1997)
- ¹²³ M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* **72**, 248-154 (1976)
- ¹²⁴ C. M. Stoschek: Quantitation of Protein; *Methods Enzymol.* **182**, 50-68 (1990)
- ¹²⁵ H. Theorell, S. Bergström, A. Akesson: Activity Determination and Further Purification of the Lipoxidase; *Pharm. Acta Helv.* **21**, 318-324 (1946)
- ¹²⁶ Produktbeschreibung für Lipoxidase aus Sojabohnen Typ IB; Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA (1989)
- ¹²⁷ T. Shimizu, Z.-I. Honda, I. Miki, Y. Seyama, T. Izumi, O. Radmark, B. Samuelsson: Potato Arachidonate 5-Lipoxygenase: Purification, Characterization, and Preparation of 5(S)-Hydroperoxyeicosatetraenoic Acid; *Methods Enzymol.* **187**, 296-306 (1990)
- ¹²⁸ G. Scheller, E. Jäger, S. Weyd, P. Schreier: Untersuchungen zur Selektivität der Lipoxygenase-Reaktion; *Lebensmittelchemie* **47**, 80 (1993)
- ¹²⁹ H. Schlenk, J. L. Gellermann: Esterification of Fatty Acids with Diazomethane on a Small Scale; *Anal. Chem.* **32**, 1412-1414 (1960)

- ¹³⁰ D. Parra-Diaz, D. P. Brower, M. B. Medina, G. J. Piazza: A Method for immobilization of lipoxygenase; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **18**, 359-367 (1993)
- ¹³¹ M. del Carmen Pinto, J. L. Gata, P. Macias: Immobilization of Potato Tuber Lipoxygenase on Oxirane Acrylic Beads; *Biotechnol. Progr.* **13**, 394-398 (1997)
- ¹³² A.-F. Hsu, T. A. Foglia, G. J. Piazza: Immobilization of lipoxygenase in an alginate-silicate solgel matrix: formation of fatty acid hydroperoxides; *Biotechnol. Lett.* **19**, 71-74 (1997)
- ¹³³ U. Nickel: Reaktionen mit Wursterschen Kationen; *Chem. unserer Zeit* **12**, 89-98 (1973)
- ¹³⁴ L. Michaelis, E. S. Hill: Potentiometric studies on semiquinones; *J. Am. Chem. Soc.* **55**, 1481-1495 (1933)
- ¹³⁵ Deutsche Norm: *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung*; DIN 32645 (1994)
- ¹³⁶ G. L. Cramer, J. F. Miller, R. B. Pendleton, W. E. M. Lands: Iodometric Measurement of Lipid Hydroperoxides in Human Plasma; *Anal. Biochem.* **193**, 204-211 (1991)
- ¹³⁷ G. Jander, K. Jahr: *Maßanalyse: Theorie und Praxis der Titrationen mit chemischen und physikalischen Indikationen*; de Gruyter, Berlin 1989
- ¹³⁸ O. Schmitz, S. Gäb: Separation of isomeric hydroperoxides of unsaturated fatty acids by capillary electrophoresis; *J. Chromatogr. Ser. A* **767**, 249-253 (1997)
- ¹³⁹ O. Schmitz, S. Gäb: Separation of unsaturated fatty acids and related isomeric hydroperoxides by micellar electrokinetic chromatography; *J. Chromatogr. Ser. A* **781**, 215-221 (1997)
- ¹⁴⁰ S. Arpadjan in K. Doerffel: *Statistik in der analytischen Chemie*; VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1990
- ¹⁴¹ H.-H. Kurth, S. Gäb, W. V. Turner, A. Kettrup: A High-Performance Liquid Chromatography System with an Immobilized Enzyme Reactor for Detection of Hydrophilic Organic Peroxides; *Anal. Chem.* **63**, 2586-2589 (1991)
- ¹⁴² S. Fukui, A. Tanaka: "Enzymes" in *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry* 5th edition; VCH New York, Berlin 1985
- ¹⁴³ J. E. Prinosil, Ö. M. Kut, I. J. Dunn, E. Heinzle: "Immobilized Biocatalysts" in *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry* 5th edition; VCH New York, Berlin 1985
- ¹⁴⁴ J. F. Kennedy, J. M. S. Cabral in H. J. Rehm, G. Reed (Hrsg.): *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vol.*; Bd. 7a, S. 349-404; VCH, Weinheim 1987

- ¹⁴⁵ W. H. Scouten: A Survey of Enzyme Coupling Techniques; *Methods of Enzymology* **135**, 30-65 (1987)
- ¹⁴⁶ W. H. Scouten, J. H. T. Luong, R. S. Brown: Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design; *TIBTECH* **13**, 178-185 (1995)
- ¹⁴⁷ A. Wadano, T. Ikeda, M. Matumoto: Immobilized Catalyst for Detecting Chemiluminescence in Lipid Hydroperoxide; *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1217-1223 (1991)
- ¹⁴⁸ G. Jacob: *Entwicklung von flüssigkeits-chromatographischen Methoden zur Bestimmung von H₂O₂ und organischen Hydroperoxiden in Umweltproben*; Dissertation Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal 1998
- ¹⁴⁹ W. Hartmeier: *Immobilisierte Biokatalysatoren*; Springer Verlag Berlin-Heidelberg (1986)
- ¹⁵⁰ T. Lötzbeyer, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt: Minizymes. A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron-transfer processes; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **42**, 1-6 (1997)
- ¹⁵¹ W. Schuhmann: *persönliche Mitteilung*, Bochum 1997
- ¹⁵² H. Gallati: Aktivitätsbestimmung von Peroxidase mit Hilfe des "Trinder-Reagens"; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **15**, 699-703 (1977)
- ¹⁵³ I. Akaza, N. Aota: Colorimetric determination of lipid hydroperoxides in oils and fats with microperoxidase; *Talanta* **37**, 925-929 (1990)
- ¹⁵⁴ K. Buchholz, J. Klein: Characterization of Immobilized Biocatalysts; *Methods of Enzymology* **135**, 3-28 (1987)
- ¹⁵⁵ D. Gabel, R. Axén: Characterization of Immobilized Enzymes by Chemical Methods; *Methods of Enzymology* **44**, 383-393 (1976)
- ¹⁵⁶ V. R. Meyer: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*; Salle + Sauerländer Frankfurt(Main), Aarau (1992)
- ¹⁵⁷ F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.): *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin (1998)
- ¹⁵⁸ H. Weetall: Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials; *Methods Enzymol.* **44**, 134-149 (1976)
- ¹⁵⁹ G. Dallmann: *persönliche Mitteilung*, Wuppertal 1998
- ¹⁶⁰ H. Kaiser, H. Specker: Bewertung und Vergleich von Analysenverfahren; *Fres. Z. Anal. Chem.* **149**, 46-66 (1956)

- ¹⁶¹ Z.-Y. Li, O. P. Ward: Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol and n-3-Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate in Organic Solvent; *J. Am. Oil Chemists Society* **70**, 745-748 (1993)
- ¹⁶² L. G. Butler: Enzymes in non-aqueous solvents; *Enzyme Microb. Technol.* **1**, 253-259 (1979)
- ¹⁶³ T.P. Labuza: Kinetics of lipid oxidation in foods; *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **2**, 355-405 (1971)
- ¹⁶⁴ N. Dillhage: *persönliche Mitteilung*, Wuppertal 1998
- ¹⁶⁵ L. Rockland: Saturated Salt Solution for Static Control of Relative Humidity between 5°C and 40°C; *Anal. Chem.* **32**, 1375-1376 (1960)
- ¹⁶⁶ Deutsche Norm: *Konstantklimare über wässrigen Lösungen; Gesättigte Salzlösungen - Glycerinlösungen*; DIN 50008 Teil 1 (1981)
- ¹⁶⁷ M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 3. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart, 1987