

**Flüssigchromatographische Kopplungstechniken zur
Analyse lipophiler Substanzen in kosmetischen
Formulierungen**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Chem. Susen Gottwald

geboren am 17. April 1972 in Hildburghausen

Hannover 2001

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Februar 1998 bis April 2001 in Kooperation mit dem Institut für Anorganische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert und der Abteilung Analytische Forschung der Firma Beiersdorf AG Hamburg unter der Leitung von Herrn Dr. Ulrich Hintze angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Andreas Seubert

Korreferent: Prof. Dr. Gerold Wunsch

Tag der Promotion: 12. Juli 2001

Veröffentlichung: Juli 2001

*meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit*

*Der Zweck des Lernens liegt darin,
ein edler Mensch zu werden.
Manche lernen, aber erreichen nichts;
aber ohne zu streben,
erreicht man es niemals.*

Konfuzius

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert und Herrn Dr. Claudius Rapp für das stetige Interesse am Gelingen der vorliegenden Arbeit sowie die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Für die Bereitstellung des Themas sowie die finanzielle und materielle Unterstützung während der Erstellung der vorliegenden Arbeit danke ich der Firma Beiersdorf AG Hamburg der Abteilung Forschung und Entwicklung Cosmed – Herrn Dr. Klaus-Peter Wittern und Herrn Dr. Ulrich Hintze.

Bei den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Analytische Forschung der Firma Beiersdorf AG Hamburg und dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Seubert bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit, stetige Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Einen herzlichen Dank möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Produktanalytik für die Integration im Labor, die moralische Unterstützung, die zahlreichen Hilfestellungen, die immerwährende Motivation und das entgegengebrachte Vertrauen aussprechen.

Für die Durchführung von zellbiologischen Arbeiten danke ich der Abteilung Forschung Haut/Gesicht der Firma Beiersdorf AG, insbesondere Frau Karen tom Dieck.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Gerold Wunsch.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Geduld, Rücksichtnahme und das Verständnis, dass sie mir in dieser Zeit wie selbstverständlich entgegengebracht haben.

Kurzzusammenfassung

Susen Gottwald

Flüssigchromatographische Kopplungstechniken zur Analyse lipophiler Substanzen in kosmetischen Formulierungen

Stichworte: HPLC, ELSD, LC/MS, DAD, coulometrische Detektion, Lipide

Für die flüssigchromatographische Bestimmung lipophiler Substanzen in kosmetischen Formulierungen sind mehrere Kopplungstechniken einsetzbar. In Abhängigkeit von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Verbindungen kamen als Detektionssysteme der Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (ELSD), der Photodiodenarraydetektor (DAD), der coulometrische Detektor und das Massenspektrometer (MS) zum Einsatz.

Für die Charakterisierung neutraler Lipide, wie z. B. der Triacylglycerine und Ester, eignen sich als Detektionstechnik der ELSD und das MS. Eine Reversed-Phase-Chromatographie ermöglicht die Differenzierung von Triacylglycerinen, die gesättigte und ungesättigte Fettsäuren von 8 bis 22 Kohlenstoffatomen enthalten. Die Trennung erfolgt mit C18- bzw. C8-RP-Trennphasen und einem binären wasserfreien Gradientensystem. Je nach Wahl des Detektionssystems sind diese Verbindungen im ng- und µg-Bereich detektierbar. Diese Methoden gewährleisten eine direkte, selektive und empfindliche Quantifizierung verschiedener nativer Fette, Öle und Wachse in kosmetischen Mitteln.

Die Kopplung von Flüssigchromatographie mit coulometrischer Detektion wird für die Bestimmung von Biochinonen im Spurenbereich verwendet. Als Alternative ist eine Bestimmung mit LC/MS möglich. Diese Methoden erlauben den Nachweis von Biochinonen in humanen Zellen im pg- und ng-Bereich. Die Kopplung von HPLC mit dem DAD wurde für die Charakterisierung von Photodegradationsprodukten der Biochinone eingesetzt. Eine Normal-Phase-Chromatographie ermöglicht die Differenzierung verschiedener Abbauprodukte.

Abstract

Susen Gottwald

Liquid chromatographic methods to analyse lipophilic compounds in cosmetic formulations

Keywords: HPLC, ELSD, LC/MS, DAD, coulometric detection, lipids

To determine lipophilic compounds in cosmetic formulations it is necessary to use liquid chromatographic separation techniques and to couple with different types of detectors. In this case, the type of the used detection technique depends on the physical and chemical properties of the compounds. The different types of detectors are: the evaporative light scattering detector (ELSD), the photodiode array detector (DAD), the coulometric detector and the mass spectrometer (MS).

Useful for analysis of neutral lipids, especially triacylglycerines and esters, is to couple the HPLC with the ELSD or the MS. A reversed-phase-chromatography guarantees the differentiation of triacylglycerines containing saturated and unsaturated fatty acids with 8 to 22 carbon atoms. The separations result on an octadecyl chemically bonded or an octyl chemically bonded silica column with a nonaqueous binary gradient. The option of the detection technique enables detection limits in the range of ng and μg for the compounds. The HPLC-ELSD and LC/MS methods enables direct, sensitive and selective analysis in order to investigate different natural oils and fats in cosmetic products.

Coupling the HPLC with the coulometric detector utilize to determine at trace levels of bioquinones. Another alternative method is the LC/MS system to obtain the same sensitivity. Both methods guarantees the quantification of bioquinones in human cells. Detection limits of less than 1 ng are obtained. For the characterization of photodecomposed products of bioquinones it is useful to couple the HPLC with the DAD. A normal-phase-separation supports the differentiation of various degradation products.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung und Motivation	7
3	Grundlagen	9
3.1	Aufbau der menschlichen Haut	9
3.1.1	Funktionelle Schichten der Haut	9
3.1.2	Lipide der Haut	13
3.1.3	Permeabilitätsbarriere der Haut	15
3.1.4	Energiehaushalt der Zellen	17
3.2	Bedeutung, Eigenschaften und Einsatz lipophiler Verbindungen in kosmetischen Mitteln	20
3.2.1	Zusammensetzung und Funktionen der Fette, Öle Und Wachse in kosmetischen Formulierungen	21
3.2.2	Einteilung der Fette, Öle und Wachse	23
3.2.3	Eigenschaften und Funktionen der Biochinone im Besonderen der Ubichinone	25
3.3	Bestimmung lipophiler Substanzen	30
3.3.1	Flüssigchromatographische Trennung und Detektion lipophiler Substanzen	31
3.3.2	Bestimmung der Fette, Öle und Wachse	33
3.3.3	Bestimmung des Ubichinon-50	34
3.4	Detektionssysteme für die Bestimmung lipophiler Substanzen	39
3.4.1	Verdampfungs-Lichtstreuendetektor	39
3.4.2	Universelle Kopplung von Chromatographie und IR-Spektroskopie	45
3.4.3	Coulometrischer Detektor	46
3.4.4	API-ES-Massenspektrometer	51
3.5	Photochemie	57
3.5.1	Experimentelles	57
3.5.2	Literaturbeschriebene photochemische Studien von Ubichinon-50	59

4	Entwicklung flüssigchromatographischer Methoden für die Bestimmung neutraler Lipide	63
4.1	Charakterisierung von Acylglycerinen	63
4.1.1	Kopplung von HPLC und ELSD	63
4.1.2	Kopplung von LC mit MS	70
4.1.3	Kalibrierungsstrategien	78
4.2	Charakterisierung weiterer neutraler Lipide	81
4.2.1	Cholesterol, Cholesterylester, Alkohole und Ester	81
4.2.2	Einfluss stationärer Phasen	85
5	Flüssigchromatographische Trennungen neutraler Lipide	91
5.1	Fette, Öle und Wachse	91
5.1.1	Differenzierung von Fetten, Ölen und Wachsen mittels HPLC-ELSD	92
5.1.2	Charakterisierung von Fetten, Ölen und Wachsen mittels LC/MS	103
5.1.3	Vergleich von HPLC-ELSD mit LC/MS	115
5.1.4	Vergleich von HPLC-ELSD mit LC und IR-Spektroskopie	121
5.1.5	Ansätze für die Erstellung einer Rohstoffdatenbank	126
5.1.6	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	127
5.2	Bestimmung von neutralen Lipiden in kosmetischen Mitteln	129
6	Methoden für die spurenanalytische Bestimmung von Ubichinonen	133
6.1	Probennahme von Humanzellen	133
6.1.1	Gewinnung von Saugblasen-Epidermis (<i>ex vivo</i>)	133
6.1.2	Gewinnung von Zellkultur (<i>in vitro</i>)	134
6.1.3	Extraktion aus humanen Keratinozyten	134
6.1.4	Extraktion aus primären Fibroblasten	135
6.2	Chromatographische Bestimmung von Ubichinonen	135
6.2.1	Kopplung von HPLC mit coulometrischem Detektor	135
6.2.2	Kopplung von LC mit MS	142
6.2.3	Vergleich von HPLC-ECD mit LC/MS	146
6.2.4	Reduktion von Ubichinon-50	147
6.3	Bestimmung in Humanzellen	151
6.3.1	Untersuchungen von Saugblasen-Epidermis, Biopsien und Zelllinien	151
6.3.2	Bestimmung in Zellkultur	155

6.4	Diskussion der Ergebnisse	160
7	Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf Ubichinone	161
7.1	Bestrahlungsexperimente in Lösung	161
7.1.1	Einfluss des Lösungsmittels	164
7.1.2	Wellenlängenabhängigkeit	166
7.1.3	Einfluss der Lichtintensität	170
7.2	Bestrahlung in Zellkultur	173
7.3	Differenzierung und Charakterisierung der entstehenden Produkte	175
7.3.1	HPLC gekoppelt mit DAD	175
7.3.2	Charakterisierung via Flow-Injection MS	179
7.3.3	LC-Transform-Interface gekoppelt mit IR-Spektroskopie	184
7.3.4	NMR-Spektroskopie	185
7.4	Experimente zur Stabilisierung	186
7.4.1	Experimente mit UV-Filtern	186
7.4.2	Untersuchungen mit Antioxidantien	190
7.4.3	Experimente mit α -Tocopherol	192
7.5	Diskussion der Ergebnisse	194
8	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	195
9	Anhang	201
9.1	Methoden	201
9.1.1	HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung von Acylglycerinen	201
9.1.2	HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung von Rizinusöl	203
9.1.3	LC/MS-Methode zur Bestimmung von Acylglycerinen	204
9.1.4	HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung von Cholesterol, Cholesterylestern, Alkoholen und Estern	206
9.1.5	HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung eines neutralen Lipidgemisches	207
9.1.6	HPLC-ECD-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50	209
9.1.7	RP-HPLC-DAD-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50	210
9.1.8	NP-HPLC-DAD-Methode zur Bestimmung von Ubichinonen	210
9.1.9	LC/MS-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50	211

9.2	Tabellen	213
9.2.1	HPLC-ELSD-Daten der Triglycerid-Standards	213
9.2.2	LC/MS-Daten der Triglycerid-Standards	214
9.2.3	HPLC-Daten weiterer Standard-Substanzen und kosmetischer Rohstoffe	216
9.2.4	Darstellung von m/z-Verhältnissen der Triglyceride und Ester als Quasi-Molekular-Ionen $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ und $[M+Na]^+$	217
9.2.5	HPLC-ECD- und LC/MS-Daten für Ubichinon-50	221
9.2.6	HPLC-DAD-Daten für Ubichinon-50	222
9.3	Chromatogramme und Spektren	224
9.3.1	HPLC-ELSD-Chromatogramme der Standards	224
9.3.2	TIC-Chromatogramme und Massenspektren der Standards	230
9.3.3	HPLC-ELSD-Chromatogramme neutraler Lipide und kosmetischer Rohstoffe	238
9.3.4	HPLC-ELSD-Chromatogramme der Fette, Öle und Wachse	242
9.3.5	LC/MS-Darstellung der Fette, Öle und Wachse	259
9.3.6	IR-Spektren der Fette, Öle und Wachse	274
9.3.7	HPLC-DAD-Chromatogramme der Ubichinone	278
9.4	Chemikalien und Geräte	290
9.4.1	Chemikalien	290
9.4.2	Geräte und Materialien	297
10	Literatur	301

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
AMG	Arzneimittelgesetz
amu	atomic mass unit
API	Ionisierung bei Atmosphärendruck (<i>Atmospheric Pressure Ionisation</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	attenuated total reflexion
AU	absorbance unit
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
c	Konzentration
C	chemisches Symbol für Kohlenstoff
CD	Cyclodextrin
cm	Zentimeter
cm ⁻¹	Wellenzahl
DAD	Photodiodenarraydetektion (<i>Diode Array Detection</i>)
DMF	Dimethylformamid
dyn	Symbol für Kraft nach dem CGS-System
ECD	elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß Ionisation
ELSD	Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (<i>Evaporative Light Scattering Detection</i>)
ES	Elektrospray
et al.	et alii, und andere
EtOH	Ethanol
ex vivo	aus Saugblasenepidermis
FAB	fast atom bombardment
FIA	flow injection analysis
fmol	Femtomol
FT	Fourier Transformation
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
HETP	Bodenhöhe
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
I	Stromstärke
INCI	International Cosmetic Ingredient Dictionary
in vitro	in Zellkultur (im Reagenzglas)
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K ⁺	Kalium-Ionen

KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kg	Kilogramm
l	Liter
LC	Flüssigchromatographie (<i>Liquid Chromatography</i>)
LiClO_4	Lithiumperchlorat
LM	Lösungsmittel
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
log	Logarithmus
m	Masse
M	Molekül
m^2	Quadratmeter
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
mW	Milliwatt
n	Stoffmenge
nA	Nanoampere
Na^+	Natrium-Ionen
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NH_4^+	Ammonium-Ionen
NH_4Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP	normal phase
N_{th}	Trennstufenzahl
O/W	Öl-in-Wasser
P	Poise (1P = 0.1 Pa*s)
Pa	Pascal
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pg	Picogramm
PG	Propylgallat
pmol	Picomol
POZ	Peroxidzahl
RhZ	Rhodanzahl
RI	Brechungsindexdetektor
RP	reversed phase
s	Sekunde

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SIM	selected ion monitoring
SZ	Säurezahl
t	Zeit
TG	Triglycerid
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstrom
TLC	Dünnschichtchromatographie (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
U	Spannung
U ⁻¹	Umdrehung pro Minute
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
UV	unverseifbarer Anteil
V	Volt
v/v	volume per volume
VZ	Verseifungszahl
W	Watt
W/O	Wasser-in-Öl
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight

1 Einleitung

Der Begriff Kosmetik stammt aus dem Griechischen und leitet sich von kosmein – ordnen, putzen, schmücken ab [8]. In der Alltagssprache übersetzt man Kosmetik gemeinhin mit Körper- und Schönheitspflege [6]. Kosmetische Produkte spielen heute im täglichen Leben eine wichtige Rolle. Neben ihren Aufgaben der Reinigung, Pflege und Dekoration von Haut und Haaren beeinflussen sie zusätzlich das physiologische und psychologische Empfinden der Menschen.

Kosmetika unterliegen in Deutschland dem Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG). Der § 4 des LMBG (Fassung vom 9. September 1997) definiert kosmetische Mittel als *„... Stoffe oder Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, äußerlich am Menschen ... zur Reinigung, Pflege oder zur Beeinflussung des Aussehens oder des Körpergeruchs ... angewendet zu werden, ...“* [1]. In der Kosmetik-Verordnung sind unter anderem die Kriterien zur Kennzeichnungspflicht, zu Sicherheitsanforderungen und zu Produktangaben niedergelegt [2].

Kosmetische Mittel lassen sich nach ihren Aufgaben und Anwendungszielen in Produkte zur Reinigung, Pflege und Schutz der Haut, zur Haarbehandlung, für dekorative Anwendungen, zur Beeinflussung des Körpergeruchs und zur Zahn-, Mund- und Zahnersatzpflege unterteilen. Für die verschiedenen Anwendungsbereiche der kosmetischen Mittel werden in die Formulierungsgrundlagen (wässrige und ölige Phase) Substanzen eingearbeitet, die gewünschte Effekte mit der Anwendung erzielen. Solche Substanzen lassen sich unter dem Begriff kosmetischer Wirkstoff zusammenfassen. Kosmetische Wirkstoffe sind *„Substanzen in kosmetischen Zubereitungen u. a. zur Beeinflussung von Physiologie und / oder Funktion der Haut... bei möglichst weitgehendem Ausschluss einer systemischen Wirkung auf den Organismus“*. Der Ausschluss einer systemischen Wirkung des kosmetischen Mittels auf den Organismus, die Ziele der Anwendung und die Anwendung selbst grenzen die kosmetischen Produkte von den pharmazeutischen ab [3,4]. Der § 2 des Arzneimittelgesetzes (AMG) beschreibt Arzneimittel als *„... Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen ... Körper Krankheiten,*

Leiden, ... zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen, ... Arzneimittel sind nicht kosmetische Mittel im Sinne des § 4 des LMBG ...“ [5].

In Abhängigkeit vom Zweck und Ort der Anwendung des Produktes werden verschiedene Typen von kosmetischen Formulierungen verwendet. Neben den Emulsionen existieren andere Produktformen, wie beispielsweise Salben, Pasten, Gele, Öle, Balsame und wässrige Systeme, wobei Emulsionen den wichtigsten Formulierungstyp in der Hautpflege darstellen. In der Kosmetik bestehen Emulsionen hauptsächlich aus zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten; eine Phase ist hydrophil, die andere lipophil. Basis der hydrophilen Phase ist meist Wasser oder eine mit Wasser mischbare Flüssigkeit. Den lipophilen Anteil einer Emulsion können Fette, Öle, Mineralöle oder andere organische Flüssigkeiten bilden [6,7]. Die äußere Phase ist kontinuierlich, in der die innere in Form kleiner Tröpfchen fein verteilt ist. In Abhängigkeit von der Verteilung der inneren und äußeren Phasen unterscheidet man zwischen der Öl-in-Wasser- (O/W) und der Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O). Neben diesen beiden Grundtypen existieren noch komplexere Systeme, die als multiple Emulsionen bezeichnet werden [8]. In der Abbildung 1-1 sind ramanmikroskopische Aufnahmen einer O/W- bzw. W/O-Emulsion dargestellt.

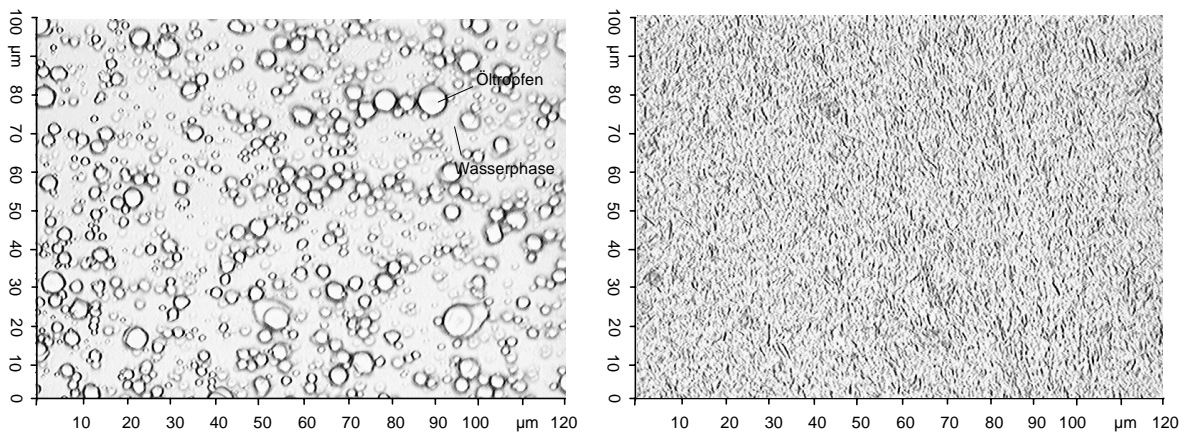


Abbildung 1-1.

Ramanmikroskopische Aufnahmen einer Öl-in-Wasser-Emulsion (links) und einer Wasser-in-Öl-Emulsion (rechts).

Diese beiden Emulsionstypen, die in 1-1 dargestellt sind, zählen zu den gebräuchlichsten. In die hydrophile und lipophile Basis lassen sich Wirk- und Hilfsstoffe einarbeiten. Als ein Beispiel sind die lipophilen Verbindungen zu nennen, die zum einen die Ölphase von Emulsionen bilden und zum anderen mit ihren pflegenden, rückfettenden und hautbefeuchtenden Eigenschaften Wirkungen in Wasch- und Pflegeprodukten erzielen. Diese Substanzen sollen die Haut während oder nach Applikation mit lipophilen Bestandteilen versorgen und die obere funktionelle Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, pflegen. Weiterhin setzt man lipophile Verbindungen in Emulsionen zur Veränderung der Konsistenz als Hilfsstoffe ein.

Die charakteristischen und vielfältigen Eigenschaften der Lipide ermöglichen den multifunktionellen Einsatz in kosmetischen Mitteln. Die Bezeichnung ‚Lipide‘ ist nicht klar definiert und benennt keine abgeschlossene Verbindungsklasse. Sie werden als Substanzen beschrieben, die (a) unlöslich in Wasser, (b) löslich in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Ether oder Benzen sind, (c) die langkettige Kohlenwasserstoffgruppen in ihren Molekülen besitzen und (d) die in lebenden Organismen vorkommen oder davon abstammen. Diese Definition umfasst langkettige Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde, Fettsäuren und deren Derivate wie Glyceride, Wachsester, Phospholipide, Glycolipide, Sulfolipide. Die fettlöslichen Vitamine A, D, E, K, ihre Derivate und die Carotinoide und Sterole mit ihren Fettsäureestern werden mit zu dieser Verbindungsklasse gezählt. Diese Substanzen sind gewöhnlich mit Membranen assoziiert und lassen sich zusammen mit Phospholipiden und neutralen Lipiden aus Zellen oder Gewebe extrahieren [9].

Die Charakterisierung der Inhaltsstoffe kosmetischer Mittel dient unter anderem dem Nachweis der Produktspezifikation, der Rohstoffspezifikation, der Überprüfung der Stabilität eines Wirkstoffes bzw. eines Produktes und dem Schutz von Patenten. Die gesetzliche Regelung des Nachweises ausgelobter Wirksamkeiten im Fertigprodukt verlangt selektive und empfindliche analytische Methoden, die es ermöglichen, Wirkungen in humanen Zellen zu messen bzw. eine Anreicherung oder Penetration des ausgelobten Wirkstoffes in humanen Zellen zu bestimmen. Der Hersteller solcher Produkte ist rechtlich verpflichtet, Unterlagen zur Durchführung amtlicher Überwachung bereitzuhalten und die Wirkungen zu belegen. Im § 5b der Kosmetik-

Verordnung ist für diesen Sachverhalt niedergelegt, dass „... *der Nachweis der Wirkung eines kosmetischen Mittels, sofern im Verkehr oder in der Werbung darauf hingewiesen wird, dass die Wirkung auf einer besonderen Beschaffenheit beruht oder sofern eine Wirkung besonders hervorgehoben wird ...*“ zu erbringen ist [2]. Der § 27 des LMBG (Verbote zum Schutz vor Täuschung) verbietet „... *kosmetische Mittel unter irreführender Bezeichnung, ... gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen oder für kosmetische Mittel allgemein ... mit irreführenden Darstellungen oder sonstigen Aussagen zu werben ...*“ [1]. Die ausgelobten Wirkungen sind nicht nur für den Wirkstoff allein, sondern auch für das Fertigprodukt darzulegen. Mit vielfältigen analytischen Methoden wird versucht, anhand einer fundierten wissenschaftlichen Basis die rechtlichen Vorschriften zu erfüllen.

Die Bestimmung lipophiler Inhaltsstoffe in komplexen kosmetischen Formulierungen und biologischen Proben verlangt eine Trennung von den störenden Begleitstoffen. Die Möglichkeiten zur Trennung von Stoffgemischen sind vielfältig; eine Technik stellt die Chromatographie dar. Unter diesem Begriff werden physikalische Methoden zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase erfolgt [10].

Zu den neueren, leistungsfähigen Trennmethoden zählt die Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC). Diese chromatographische Technik eignet sich für die Trennung lipophiler Komponenten von Begleitsubstanzen in kosmetischen Formulierungen [11,12,13]. Die sich anschließende Detektion der lipophilen Substanzen gestaltet sich aufgrund der chemischen und substanzspezifischen Eigenschaften schwierig. Bis Mitte der 80er Jahre waren Publikationen für diese Art der chromatographischen Bestimmung sehr limitiert. Zwei Hauptcharakteristika der Lipide erschwerten die Entwicklung flüssigchromatographischer Methoden mit einer empfindlichen Detektion. Der weite Bereich der Polaritäten und Löslichkeiten der verschiedenen Lipidklassen gestaltet die isokratische Arbeitsweise schwierig. Das Fehlen von chromophoren Gruppen in vielen lipophilen Verbindungen minimiert die Möglichkeit des Einsatzes der Photodiodenarray-Detektion (*Diode Array Detection* – DAD). In den letzten 15 bis 20 Jahren wurde durch die Optimierung der HPLC-Pumpen-Technik die reproduzierbare Gradientenelution einsetz-

bar. Die Einführung von empfindlichen, universell einsetzbaren Detektoren, wie Verdampfungs-Lichtstreuendetektoren (Evaporative Light Scattering Detector - ELSD) und massenselektiven Detektionsverfahren, ermöglicht die Kopplung mit der Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography Mass Spectrometry – LC/MS) [14,15,16]. Die Entwicklung neuer Einlass- und Ionisierungssysteme für massenselektive Detektionssysteme vereinfacht die Online-Kopplung mit der Flüssigchromatographie [17,18,19].

Die folgenden Darlegungen beschreiben Möglichkeiten zur Bestimmung, Charakterisierung und Identifizierung von lipophilen Verbindungen in kosmetischen Mitteln, Rohstoffen und humanen Zellen.

2 Zielsetzung und Motivation

Kosmetische Mittel setzen sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen zusammen. Für die Erfüllung der gesetzlichen Vorschriften sind analytische Methoden notwendig, um einzelne Substanzen oder Gemische nachweisen und bestimmen zu können. Zusätzlich spielen Stabilitätsstudien ebenso eine Rolle wie die Beobachtung des kosmetischen Marktes.

Die Chromatographie bietet die Möglichkeit, Substanzen von störenden Begleitstoffen zu trennen. Nach der Trennung folgt eine selektive und empfindliche Detektion der Substanzen in Abhängigkeit von ihren molekülspezifischen Eigenschaften. Für diese Arbeit stehen verschiedene Detektionsverfahren zur Verfügung. Zu ihnen gehören der Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor, der coulometrische Detektor, der Photodiodenarray-Detektor, das IR-Spektroskop sowie das Massenspektrometer.

Für die Charakterisierung und Identifizierung von neutralen Lipiden in kosmetischen Emulsionen sollen flüssigchromatographische Methoden mit Verdampfungs-Lichtstreu-Detektion entwickelt werden. Bis dato werden die neutralen Lipide mit der Gaschromatographie oder IR-Spektroskopie bestimmt. Beide Methoden sind arbeits- und zeitintensiv. Die Gaschromatographie eignet sich für die Bestimmung von Fettsäuremethylestern. Für die Analyse von Triglyceriden, Wachsestern oder langkettigen Alkoholen ist sie nicht geeignet. Die IR-spektroskopische Charakterisierung kosmetischer Formulierungen kann erst nach intensiver Probenvorbereitung erfolgen. Dafür werden die zu untersuchenden kosmetischen Mittel mit klassischer Säulenchromatographie in einzelne Fraktionen getrennt. Die Quantifizierung einzelner Komponenten gestaltet sich schwierig, da die eingesetzten Rohstoffe keine Einzelsubstanzen, sondern Gemische enthalten. Es kommt zu einer Überlagerung mehrerer Verbindungen im Spektrum. Die quantitative Analyse wird erschwert.

Ziel dieser Arbeit ist es, flüssigchromatographische Methoden zu entwickeln, die aus einer einfachen Probenvorbereitung bestehen, selektiv für die zu analysierenden Substanzen sind, direkt anwendbar sind sowie eine Quantifizierung ermöglichen.

Neben der Charakterisierung von neutralen Lipiden in kosmetischen Formulierungen ist die spurenanalytische Bestimmung von lipophilen Substanzen in humanen Zellen und Zellkultur ebenso bedeutsam. Für die Verbindung Ubichinon-50 ist eine flüssigchromatographische Methode zu entwickeln, die für den Nachweis in humanen Zellen geeignet ist. Die Redoxfähigkeit des Moleküls erlaubt den Einsatz der elektrochemischen Detektion. Zur Anwendung kommt der coulometrische Detektor. Chromatographische Methoden mit DAD sind einsetzbar, erreichen aber nicht die erforderliche Nachweisgrenze. Mit dem coulometrischen Detektor soll es gelingen die Verbindung Ubichinon-50 in geringsten Mengen in extrahierten Humanzellen quantifizieren zu können. Die Lichtempfindlichkeit der Ubichinone führt zur Durchführung von Photodegradationsstudien. Für die Charakterisierung und Identifizierung entstehender Abbauprodukte werden verschiedene analytische Methoden angewendet.

Die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Elektrospray-MS ist seit Mitte der 90er Jahre für die Routineanalytik verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wird diese Technik miteinbezogen. Die Entwicklung von chromatographischen Methoden mit dem LC/MS-System gewährleistet einen selektiven Nachweis ionisierbarer Verbindungen aufgrund der verwertbaren Masseninformation. Diese Technik setzt keine Basislinientrennung der Signale voraus. Die niedrigen Flussraten und die miniaturisierten stationären Phasen führen zur Einsparung an Lösungsmitteln und Zeit. Spezielle Optionen des Massenspektrometers, wie das Selected Ion Monitoring, gestatten die Detektion von Molekülen im $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich. Dieses gerechtfertigt den Einsatz der LC/MS-Technik in der Routine- und Spurenanalytik für lipophile Verbindungen.

3 Grundlagen

Dieses Kapitel umfasst grundlegende Aspekte zum Aufbau der humanen Haut (s. 3.1), die Eigenschaften und den Einsatz von lipophilen Verbindungen in kosmetischen Formulierungen (s. 3.2), die Bestimmung von lipophilen Substanzen mit chromatographischen Methoden (s. 3.3), die Detektion dieser mit universellen und/oder speziellen Detektionssystemen (s. 3.4) und den photochemischen Abbau (s. 3.5) von Ubichinon-50.

3.1 Aufbau der humanen Haut

Die Humanhaut erfüllt vielfältige Funktionen wie z. B. Temperaturregulation, Isolatorwirkung, Energiespeicherung, Sinnesempfindungen und Schutz vor Umwelteinflüssen. Mit 1.5 bis 2.0 m² ist sie das größte Organ des Menschen und kann bis zu einem Sechstel des Körpergewichtes erreichen. Die Komplexität und Struktur der Haut ermöglicht trotz ihrer geringen Dicke eine bemerkenswerte Undurchlässigkeit für die meisten Substanzen. Die in der Haut ablaufenden Prozesse erfordern aber eine gewisse Permeabilität [20,7].

3.1.1 Funktionelle Schichten der Haut

Die humane Haut besteht aus 3 funktionellen Schichten; Epidermis (Oberhaut), Dermis oder Corium (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut). In diesen Schichten befinden sich die Hautanhangsgebilde wie Nägel, Haare und Drüsen.

Die Epidermis bildet als äußerste Hautschicht die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt. Ihre Dicke beträgt durchschnittlich 0.1 mm, schwankt jedoch zwischen 30 µm und 4 mm in Abhängigkeit vom Hautareal. Die Epidermis ist eng mit der sich anschließenden Dermis (Lederhaut) verzahnt, wodurch die Nährstoffversorgung gewährleistet wird. Die Epidermis besteht ihrerseits aus 5 Schichten [21] und differenziert sich in: Stratum corneum (Hornschicht), Stratum lucidum (Glanzsicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum

basale (Basalschicht) mit Basalmembran [7]. In der Abbildung 3-1 ist der Aufbau der Epidermis dargestellt.

Die Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten, daneben finden sich Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen. Die Keratinozyten durchlaufen verschiedene Differenzierungsgrade von der Teilung der Zelle im Stratum basale bis zur Abstoßung der Zelle als Hornschuppe. Dieser Zyklus dauert etwa 28 Tage. Die Melanozyten liegen im Stratum basale direkt auf der Basalmembran und sind zur Melaninsynthese und Sekretion befähigt. Die Melanozyten geben das Melanin an Basalzellen und suprabasal gelegene Stachelzellen ab. Melanin absorbiert und dispergiert UV-Strahlen. Die Langerhanszellen stammen aus dem Knochenmark und sind im Stratum spinosum lokalisiert, wo sie ein regelmäßig angeordnetes Netz formen. Sie spielen eine wichtige Rolle im Immunabwehrsystem und sind aufgrund ihrer Makrophageneigenschaft imstande, als erste eine Immunantwort einzuleiten [22]. Die Merkelzelle ist im Stratum basale lokalisiert und wird als Berührungsrezeptor beschrieben [23]. Die Merkelzelle steht immer mit einem Neuriten in Verbindung (Merkelzellen-Neuriten-Komplex) und ist für die Vermittlung von Tastempfindungen zuständig [24].

Das Stratum corneum stellt das Endergebnis der Keratinisierungsprozesse (Verhornung) der Haut dar und enthält abgestorbene, dehydrierte Zellen. Diese bestehen hauptsächlich aus Proteinen der Keratinreihe und interzellulären Barrierelipiden. Die Komponenten dieser Strukturen werden in den Zellen der lebenden Epidermis unterhalb des Stratum corneum synthetisiert und zu funktionellen Komplexen zusammengefügt [20].

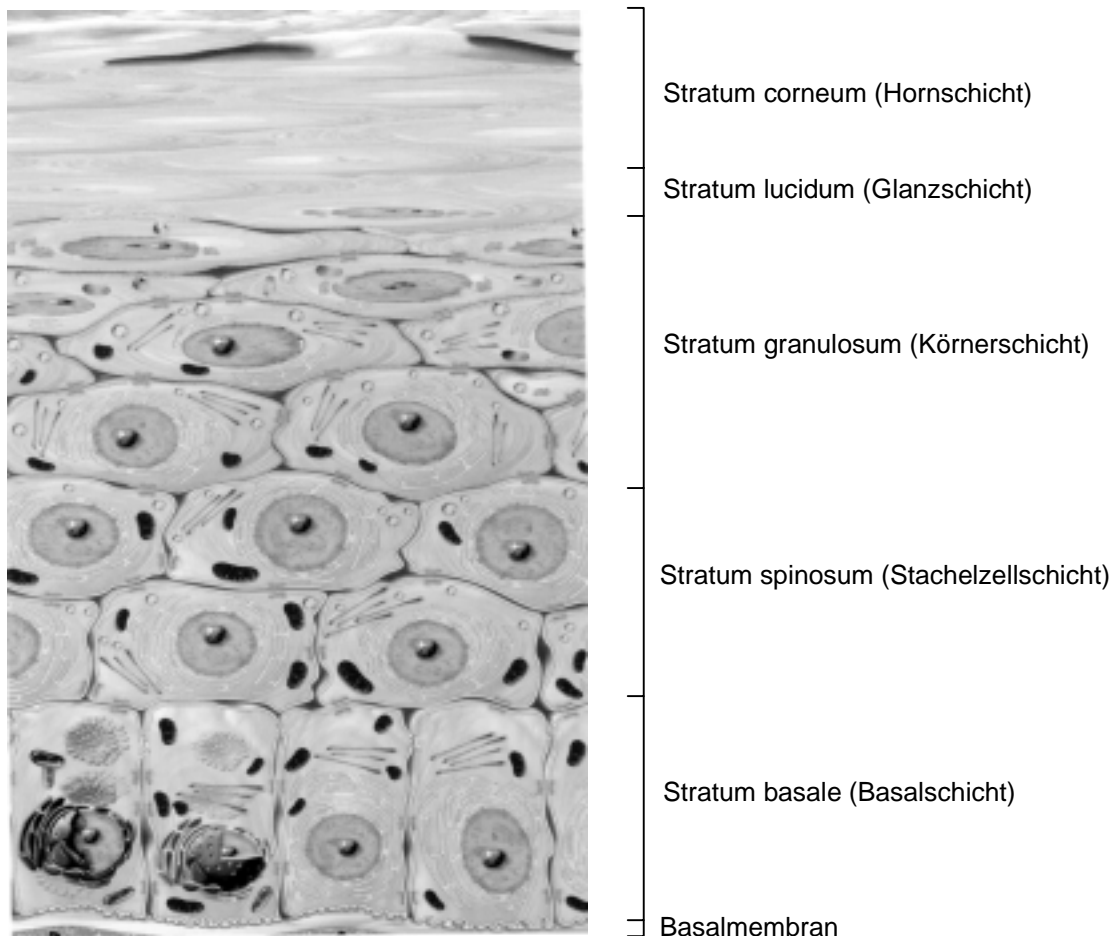


Abbildung 3-1.

Darstellung der funktionellen Schichten der Epidermis [7].

Der Keratinisierungsprozess beginnt in der untersten Schicht der Epidermis, dem Stratum basale. Durch Proliferation (Zellteilung) sorgen die Basalzellen (germinative Zellen, teilungsfähige Keratinozyten) als Mutterzellen für die kontinuierliche Erneuerung der Haut. Die Tochterzellen werden durch rege Zellteilung in weiter außen gelegene Schichten verschoben. Die durch Mitose aus den Keratinozyten des Stratum basale entstandenen Tochterzellen bilden zunächst als Stachelzellen das Stratum spinosum. Während die Basalzellen einlagig sind, finden sich im Stratum spinosum etwa 2 bis 15 Lagen Zellen, die untereinander mit feinsten netzförmigen Verankerungen verbunden sind. Auf dem Weg an die Hautoberfläche werden sie zunehmend flacher und überlappen in der Oberfläche immer stärker. Der Zellinhalt unterliegt dabei Veränderungen. Im Stratum spinosum werden erstmals die sogenannten Keratinosome, membranbegrenzte Vakuolen (Odland-Bodies), sichtbar. Sie enthalten die

Vorläufersubstanzen der epidermalen Lipide in Form von lamellar (scheibenförmig) angeordneten Doppellipidmembranen. Im Stratum granulosum beginnt die Verhornung der Keratinozyten. In dem sich anschließenden Stratum lucidum sind die Zellen stark abgeflacht und liegen dicht beisammen. Die Zellgrenzen sind nicht mehr erkennbar. Die oberste Schicht der Epidermis stellt ein Verbundsystem aus kernlosen Korneozyten (Hornzellen) und dem Lipidgemisch dar. Das Stratum corneum bildet die Permeabilitätsbarriere, die eigentliche Barrierschicht der Haut gegen exogene Faktoren. Die Regulation des Wasser- und Feuchtigkeitsgehaltes ist eine ihrer wichtigsten Funktionen für den menschlichen Körper [7,21].

Die Dermis ist je nach Lokalisation 4 bis 15 mal dicker als die Epidermis und durch die Basalmembran papillär fest mit ihr verbunden. Sie besteht aus 2 Schichten, dem Stratum papillare (Papille lat. – *Höcker*) und dem Stratum reticulare (reticular lat. – *netzförmig*), und stellt ein gut durchblutetes, von Lymphbahnen und Nerven durchzogenes Bindegewebe dar. Sie gewährleistet durch Diffusion die Versorgung der gefäßfreien Epidermis. Das Stratum papillare ist aus scheinbar ungeordneten kollagenen Fasern, und senkrecht zur Epidermis angeordneten elastischen Fasern, aus Fibroblasten und Grundsubstanz zusammengesetzt. Die Grundsubstanz enthält als wesentliche Bestandteile makromolekulare Proteoglykan-Hyaluronat-Komplexe, wobei als Basismolekül die Hyaluronsäure mit Proteinketten seitlich verknüpft ist. Das darunter liegende Stratum reticulare ist durch dickere parallel zur Epidermis verlaufende kollagene Bündel mit dazwischenliegenden feinen und elastischen Fasern gekennzeichnet. Fibroblasten und Grundsubstanz sind weitere wesentliche Elemente dieser Schicht [21,23].

Der wichtigste Zelltyp der Dermis ist der Fibroblast. Er hat einen spindel- bzw. sternförmigen Zellkern, der in einem Zytoplasma ohne scharfe Zellgrenzen liegt. Der Fibroblast verfügt über ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum, zahlreiche Mitochondrien und einen ausgeprägten Golgi-Apparat als Zeichen einer hochaktiven Zelle. Das Kollagen wird von Fibroblasten synthetisiert und ist das dermale Strukturprotein, das 70 bis 80 % des Trockengewichts der Dermis ausmacht. Es gibt mehr als 10 Kollagentypen, wovon mindestens 5 in der Haut vorkommen. Die Typ-I-Kollagen-bündel weisen eine Breite von 20 nm sowie hohe mechanische Stabilität

auf und kommen überwiegend im Stratum reticulare vor. Bei Typ-III-Kollagen handelt es sich um dünne, 1.5 nm breite kollagene Bündel, die hauptsächlich im Stratum papillare vorhanden sind [25]. Der Fibroplast bildet die elastischen Fasern, die Mikrofibrillen und die Grundsubstanz. Die Fasern und Mikrofibrillen sind in Elastin eingebettet [23].

Als Subcutis bezeichnet man das Unterhautfettgewebe. Es besteht aus lockerem Bindegewebe mit eingelagerten, energiespeichernden Fettzellen (Adipozyten). Die Fettzellen sind zu größeren, kissenförmigen Verbänden zusammengefasst und werden durch Kollagenfasern gehalten. Die Unterhaut ist stark mit Blutgefäßen durchzogen und gewährleistet bei Bedarf einen schnellen Weitertransport von gespeicherten Nährstoffen. Zu den Aufgaben des Unterhautfettgewebes gehören neben der Speicherung von Nährstoffen auch die Isolation des Körpers gegen Kälte und die Abpolsterung gegen mechanische Stöße.

3.1.2 Lipide der Haut

An der Oberfläche ist das Stratum corneum von einem Hydrolipidfilm überzogen. Dieser setzt sich aus den Lipiden des Talgdrüsensekretes, transepidermal abgegebenem Wasser und den Sekreten der Schweißdrüse zusammen. Die natürliche Emulsion enthält Fette des Stratum corneum, die aus der epidermalen Lipidbarriere an die Oberfläche gelangt sind. Der Lipidanteil des Hydrolipidfilms stammt zu 90 % aus den Talgdrüsen und beinhaltet mit 41 % Triglyceride, daneben noch Wachsester und Squalen sowie in geringen Konzentrationen Cholesterol und Cholesterylester [26].

Die Synthese der epidermalen Lipide findet im Golgi-Apparat [27] der Zellen des oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum statt und führt zu Granula, in denen die Lipide lamellar angeordnet sind (Odland bodies). Dort werden die polaren Komponenten Glycolipide, Sterolester und Phospholipide durch katabolische Enzyme gespalten. Durch Hydrolyse von Zuckern und Fettsäuren aus Glykolipiden und Veresterung eines Teils der Fettsäuren und des freien Cholesterols findet in den Interzellularen des Stratum corneum ein Umbau zu neutralen Lipiden statt, die als

großflächige Lamellen die Interzellularräume des Stratum corneum füllen und das morphologische Substrat der epidermalen Barriere bilden. Für die Synthese der polaren Lipide der Keratinosomen sind essentielle Fettsäuren erforderlich. Ihr Mangel beeinflusst unmittelbar über die fehlende Lipidsynthese der Keratinosomen die epidermale Barrierefunktion [28].

Die Zusammensetzung der Lipide in verschiedenen Schichten der Epidermis während der Differenzierung wurde von Lampe [29] untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3-1.

Prozentuale Zusammensetzung der epidermalen Lipide [28,29].

Fraktion	Stratum basale/ Stratum spinosum	Stratum granulosum	Stratum corneum
Polare Lipide	45	25	5
Cholesterylsulfat	3	6	2
Neutrale Lipide, davon	51	57	78
Freie Sterole	11	12	14
Freie Fettsäuren	7	9	19
Triglyceride	12	25	25
Sterole/Wachsester	5	5	5
Squalen	5	5	5
n-Alkane	4	4	6
Sphingolipide	7	12	18
Glucosylceramide	4	5	< 1
Ceramide	4	9	18

Bei der Differenzierung der Zellen nimmt der Anteil der Ceramide und Sphingolipide zu. Im Stratum corneum setzen sich die Lipide nach Strauß [27] aus 25 % Ceramiden, 25 % Triglyceriden, 20 % freien Fettsäuren, 10 % Kohlenwasserstoffen, 15 % Sterolen und 5 % sonstigen Lipiden zusammen. Die Gehaltsangaben für die epidermalen Lipide variieren in verschiedenen Veröffentlichungen. Die Angabe des Ceramidgehaltes schwankt je nach Extraktionsmethode, Hautareal und jahreszeitlichen Einflüssen zwischen 25 und 40 % zum Gesamtgehalt. Triglyceride und Cholesterylester sind nur in geringen Mengen nachweisbar [26,30].

In den Lipiden des Stratum corneum sind Phospholipide kaum existent, obwohl sie Bestandteile der Membrandoppelschichten der Zelle sind. Dies lässt vermuten, dass die Phospholipide nicht geeignet sind Lipidstrukturen zu bilden. Wie die Tabelle 3-1 belegt, nehmen die Phospholipide von innen nach außen ab, während beispielsweise freie Fettsäuren und Sphingolipide deutlich zunehmen. Die Zunahme der freien Fettsäuren schreibt man der Hydrolyse der Phospholipide oder Triglyceride zu [28,31].

3.1.3 Permeabilitätsbarriere der Haut

Die Haut stellt eine Barriere zwischen dem menschlichen Organismus und seiner Umgebung dar. Die Barriere wird vom Stratum corneum gebildet und ist vereinfacht als mauerartige Organisation (brick wall) zu beschreiben. Sie besteht im wesentlichen aus proteinhaltigen Zellen und Lipidlamellen im Interzellularraum. Die Korneozyten sind vergleichbar mit den Steinen (bricks) einer Mauer und versehen das Stratum corneum mit physikalischer und chemischer Stabilität. Die lamellaren Doppellipidschichten formen eine kontinuierliche Matrix und umschließen als Kittsubstanz bzw. Mörtel (mortar) die abgeflachten Zellen [32]. Die folgende Abbildung 3-2 spiegelt den Aufbau aus Korneozyten und Lipidschichten wider. Die Korneozyten sind plattenförmig gestapelt und bilden mit der Lipidschicht (blau eingefärbt) ein Verbundsystem.

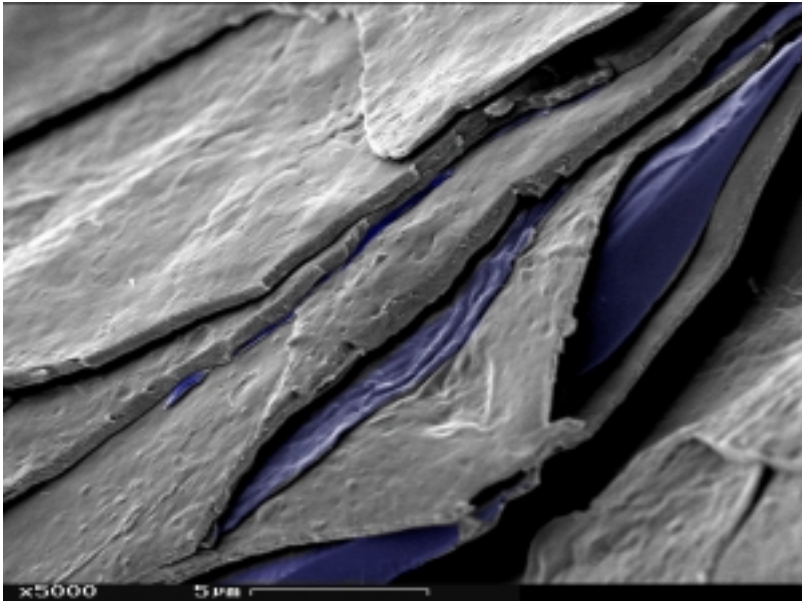


Abbildung 3-2.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Stratum corneum [33].

So wie die Haut eine Barriere für Stoffe von außen darstellt, reguliert sie den Austritt von Flüssigkeiten aus dem Körper. Der transepidermale Wasserverlust ist als Parameter für die Wirksamkeit der Barrierefunktion anzusehen [34]. Störungen in den lamellaren Schichten führen zwangsläufig zu einer Veränderung der Barriere in Struktur oder Funktion. Neben dem Schutz vor Austrocknung des Körpers regelt die Permeabilitätsbarriere auch die Penetration von Wasser und gelösten Stoffen. Die Penetration von Molekülen durch die Haut ist ein Diffusionsprozess, der von den zu penetrierenden Substanzen abhängt.

Die ständige Erneuerung der Hornschichtzellen gewährleistet die Reparatur kleiner Verletzungen. Dieser Mechanismus verlangt aber einen dynamischen, mehrstufigen Prozess für die Bildung und Erneuerung der Barriere. Die epidermale Differenzierung der Zellen sowie die Bildung von Lamellengranula und Lipiddoppelschichten bildet die Grundlage für den Aufbau der Permeabilitätsbarriere.

3.1.4 Der Energiehaushalt der Zellen

Die Zellen der Haut benötigen zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen Energie. Diese Energie entsteht während der intrazellulären Stoffwechselfvorgänge. Durch den dermalen Blutstrom werden die Basalzellen mit Nährstoffen wie Lipiden, Kohlenhydraten, Proteinen und Sauerstoff versorgt. Freie Fettsäuren spielen die größte Rolle bei der Energiegewinnung der Hautzellen. In den Zellen des Stratum granulosum – in die wenig Glucose diffundiert – scheinen sogar die beim Abbau der Zellmembran freigesetzten Fettsäuren zur Energiegewinnung beizutragen [26].

Bei der Energiegewinnung der Zellen unterscheidet man zwischen: Glykolyse, Citratcyclus und Atmungskette. Die Glykolyse findet im Zytoplasma statt und ist eine schnell abrufbare Form der Energiegewinnung. Die als „Biologische Oxidation“ bezeichneten Stufen des Citratzyklus und der Atmungskette laufen in den Mitochondrien der Zellen ab. Alle enzymatischen Abbauvorgänge von Fetten, Kohlenhydraten und Aminosäuren enden in der Atmungskette.

Charakteristisch für die Mitochondrien ist der Aufbau aus innerer und äußerer Mitochondrienmembran, dem Innenraum (Matrix) und einem Zwischenmembran-Raum (der Zwischenmembran-Raum wird auch C-Raum genannt, da er mit dem Cytosol in Verbindung steht). Die innere Membran ist durch zahlreiche Einstülpungen (Cristae) zum Matrix-Raum hin gekennzeichnet. Die äußere Mitochondrienmembran ist durch Membrankanäle relativ permeabel. Die innere Membran ist ein Isolator und besteht zu 20 % aus Lipiden und zu 80 % aus Proteinen. Die Redoxsysteme der Atmungskette und das damit gekoppelte Phosphorylierungssystem sind Strukturbestandteile der inneren Membran, die den Matrix-Raum vom Zwischenmembran-Raum trennen. Über diese Membran wird ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, der die ATP-Synthese treibt.

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus einer Reihe von Proteinkomplexen, die als Oxidoreduktasen wirken. Sie werden als Komplexe I bis IV bezeichnet und enthalten Reaktionszentren mit Flavinen, Eisenschwefel-Komplexen und Eisenporphyrinen (Cytochromen). Zwischen diesen dienen die Redoxhilfssubstrate Ubichinon-50

und Cytochrom c als Sammelbecken für Wasserstoff bzw. Elektronen. Innerhalb der Komplexe I, III und IV finden Elektronenübergänge zwischen Reaktionszentren sehr unterschiedlichen Redoxpotentials statt; deren freie Energie wird für die Transportarbeit bei der Erzeugung des H^+ -Ionen-Gradienten benötigt. Die Komplexe I, III und IV katalysieren gleichzeitig zwei Prozesse: einerseits den Elektronentransport zwischen den Redoxzentren innerhalb der Membran, andererseits den gerichteten Transport von Protonen durch die Membran. Der Komplex II wirkt lediglich als Dehydrogenase und nicht als Protonenpumpe. In den Komplexen I, II und III bildet das Ubichinon-50 die Sammelstelle für Reduktionsäquivalente bzw. fungiert als Elektronenüberträger [35]. Die Abbildung 3-3 verdeutlicht den Aufbau eines Mitochondriums und stellt schematisch den Ubichinon-50-Zyklus an Komplex III dar.

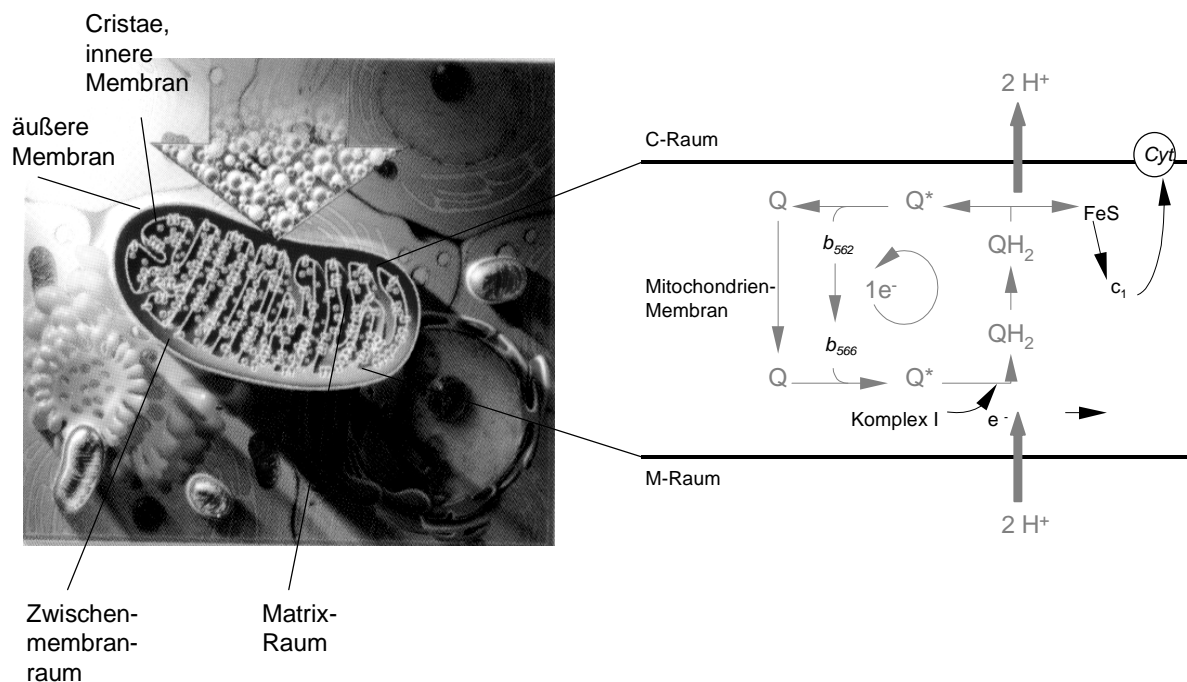


Abbildung 3-3.

Querschnitt durch ein Mitochondrium und Darstellung des Ubichinon-50-Zyklus an Komplex III [35]. Der Zyklus hat 2 Bindungs- bzw. Reaktionsstellen für das Ubichinon-50, von denen eine Reduktion nahe der inneren, die andere Oxidation nahe der äußeren Membranoberfläche lokalisiert ist. Formal befindet sich immer ein Elektron im zyklischen Umlauf durch das System und ermöglicht so die Mitführung von 2 Protonen je Elektron, das auf das Cytochrom c übertragen wird.

Die Abbildung 3-4 zeigt die auf molekularer Ebene stattfindende Oxidation vom Hydrochinon zum Chinon. Nach Dissoziation des Hydrochinons zum Diphenolat-anion folgt der Elektronenentzug aus dieser Spezies. Es entsteht ein Semichinon-anion, dass den radikalischen Übergangszustand darstellt. Durch einen weiteren Elektronenentzug entsteht das Chinon. Dieser Prozess ist reversibel und hängt von den Potentialen der einzelnen Reaktionspartner und von ihren Konzentrationen ab.

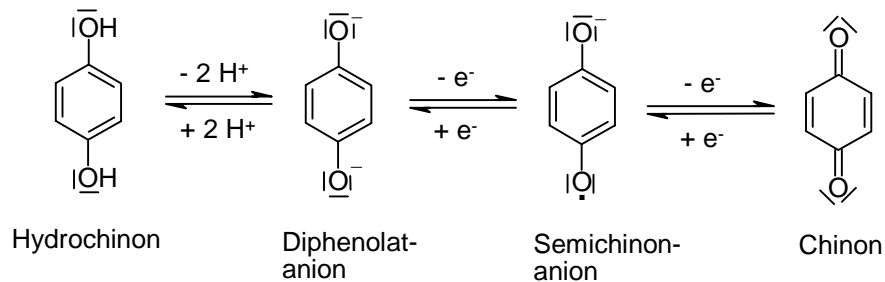


Abbildung 3-4.

Darstellung des Redoxsystems Hydrochinon – Chinon [35].

Das Ubichinon-50 gehört zu den wasserstoffübertragenden Coenzymen und kommt ausschließlich in der Mitochondrienmembran vor. Aufgrund seiner Funktion bei der Wasserstoff- und Elektronenübertragung ist es wichtig, dass es in der Membran leicht beweglich ist. Eine weitere Funktion hat es als „Redoxpuffer“, da es im Vergleich mit anderen Komponenten der Atmungskette etwa im 10-15fachen Überschuss vorhanden ist. Ähnliche Funktionen übernehmen die Plastochinone in pflanzlichen Zellen oder die Menachinone in Membranen von anaerob atmenden Mikroorganismen.

3.2 Bedeutung, Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten lipophiler Verbindungen in kosmetischen Mitteln

Kosmetische Mittel setzen sich aus Grundlagen-, Wirk-, Hilfs- und Duftstoffen zusammen. Die mengenmäßig größten Anteile in kosmetischen Formulierungen sind Wasser, Öle, Fette, Wachse und Emulgatoren. Aus Wasser, Ölen, Fetten und Emulgatoren werden überwiegend Emulsionen hergestellt. Shampoos bzw. Duschgele setzen sich hauptsächlich aus Wasser, Tensiden und Verdickern zusammen. Die kosmetischen Wirkstoffe (Vitamine, Antioxidantien) dürfen nach den gesetzlichen Regelungen die Physiologie und die Funktionen der Haut nicht systemisch beeinflussen. Die Hilfsstoffe (Emulgatoren, Lösungsvermittler, Konservierungsmittel) stabilisieren kosmetische Zubereitungen und verändern die Konsistenz des kosmetischen Mittels. Die Duftstoffe verleihen den Rezepturen den entscheidenden Geruch [36,37].

Über 90 % aller Pflegepräparate bestehen aus demselben Formulierungstyp, der Emulsion. Sie ist dem natürlichen Hydrolipidfilm der Haut ähnlich und besitzt gute Pflegeeigenschaften. Zu den Basiskomponenten einer Emulsion gehören synthetische Mineralöle, Silikone sowie natürliche Öle und Fette. Öle und Fette weisen gegenüber Mineralölen (Paraffinölen) hautpflegende Eigenschaften auf. Für die Herstellung von Emulsionen und Salben wählt man die einzelnen Fettgrundstoffe nach technischen, kosmetischen und dermatologischen Kriterien aus. Gesättigte Esteröle (Triglyceride) und Paraffinöle (Kohlenwasserstoffe) haben die größte Bedeutung. Im Bereich der Fette und Wachse finden je nach Anforderung Mono- und Diglyceride, Wachsester und bestimmte Paraffin- oder Mikrowachse Beachtung [36,38].

Die technische Veränderung pflanzlicher bzw. tierischer Rohstoffe gewährleistet eine weitere Einsatzmöglichkeit für kosmetische Produkte. Fette und Öle, die ungesättigte, mit Glycerin veresterte Fettsäuren enthalten, können durch Behandlung mit reinem Wasserstoff bei erhöhter Temperatur in Gegenwart von Katalysatoren (z. B. Nickel) gehärtet werden (Hydrierung). Durch Hydrierung werden leicht ranzig werdende Fette erheblich beständiger u. a. Erdnussöl, Kokosöl, Rizinusöl. Die kosmetische Industrie macht von gehärteten oder teilweise gehärteten Fetten zunehmend Gebrauch. Neben den Hydrierungsprodukten sind mit zunehmender Bedeutung die

Umesterungsprodukte bzw. die synthetischen Triglyceride für die Kosmetik zu nennen [40].

Ein hoher Anteil nativer Öle ist ein Qualitätsmerkmal der Grundlage von kosmetischen Zubereitungen und ist aus Sicht der Hautpflege wünschenswert. Pflanzliche und tierische Wachse sind gute Hautpflegemittel und bei entsprechender Zusammensetzung zugleich Emulgatoren [36].

Silikone können kettenförmige, verzweigte oder Ringstruktur haben und sind je nach dem Polymerisierungsgrad von flüssiger bis wachsartiger Konsistenz und in unterschiedlichen Produktformen einsetzbar. Silikonöle verteilen sich gut auf der Haut, hindern die Hautatmung und Wasserverdunstung nicht, und sind den Mineralölen unter Hautpflegegesichtspunkten vorzuziehen [39]. Der Nachteil ist die schlechte biologische Abbaubarkeit, die zu einer Akkumulation dieser Substanzklasse in der Umwelt führt.

3.2.1 Zusammensetzung und Funktionen der Fette, Öle und Wachse in kosmetischen Formulierungen

Fette und Öle sind in der Natur verbreitete, feste, halbfeste oder flüssige Glycerinester höherer Fettsäuren mit vorwiegend gerader Kohlenstoffzahl, die leichter als Wasser sind. Sie haben eine nach der Herkunft charakteristische Zusammensetzung und als Naturprodukte schwanken die Inhaltsstoffe in gewissen Grenzen. Die Mehrzahl der Fette und Öle sind komplex zusammengesetzte gemischte Glyceride (Acylglycerine, Neutralfette), in denen die Zusammensetzung der Fettsäuren die physikalischen und chemischen Eigenschaften bedingt. Die Hauptbestandteile der Fette sind gemischte Triglyceride, z. B. 1-Linoleoyl-2-oleoyl-3-palmitoleoyl-rac-glycerol. In untergeordneten Mengen sind stets noch freie Fettsäuren, Mono- und Diglyceride, Sterine oder Phytosterine zugegen [40]. Zu den in der Natur am häufigsten vorkommenden Fettsäuren gehören Caprin- (*n-Decan-*), Laurin- (*n-Dodecan-*), Myristin- (*n-Tetradecan-*), Palmitin- (*n-Hexadecan-*), Stearin- (*n-Octadecan-*), Arachin- (*n-Eicosan-*), Behen- (*n-Docosan-*), Palmitolein- (*cis-9-Hexadecen-*), Öl- (*cis-9-Octadecen-*), Eruca- (*cis-13-Docosen-*), Linol- (*cis-9,cis-12-Octadecadien-*) und

Linolensäure (*cis-9,cis-12,cis-15-Octadecatriensäure*). In pflanzlichen Fetten und Ölen kommen geradzahlige und unverzweigte Fettsäuren von C8 bis C22 mit Glycerin verestert vor. Als Fette werden Triglycerid-Mischungen bezeichnet, wo Stearinsäure zu einem bedeutendem Anteil mit Glycerin verestert ist. In tierischen Fetten und Ölen existieren zusätzlich zu den geradzahligen auch ungeradzahlige und verzweigte Fettsäuren, die mit Glycerin verestert sind [40,7].

Für die kosmetische Verwendung der Öle und Fette ist ihre Spreitung, Viskosität und Oberflächenspannung von Interesse. Die Spreitung bzw. das Spreitvermögen ist die Eigenschaft einer unlöslichen festen oder flüssigen Substanz, sich auf einem Festkörper, z. B. Haut, auszubreiten [39]. Die Unterschiede in der Oberflächenspannung sind wenig ausgeprägt, größer sind sie in der Viskosität, die mit der Spreitung zusammenhängt. Glyceride spreiten besonders gut, wenn die gesättigten Fettsäuren Caprin-, Capron- (*n-Hexan-*) und Laurinsäure sowie die ungesättigten Fettsäuren Öl- und Linolsäure die Glyceride bilden [40].

Pflanzliche Öle mit einem hohen Gehalt an Linolensäure und γ -Linolensäure, wie Borretschöl (*INCI – Borage Seed Oil*) und Nachtkerzenöl (*Evening Prime Rose Oil*), werden zur Behandlung von trockener und sehr trockener Haut (atopische Dermatitis) in Formulierungen eingearbeitet. Macadamiaöl (*Macadamia Nut Oil*), Mandelöl (*Almond Oil*) und Sojaöl (*Soybean Oil*) kommen aufgrund ihrer pflegenden sowie rückfettenden Eigenschaften in Haar- und Hautpflegeprodukten zum Einsatz. Schibutter (*Shea Butter*) zeichnet sich durch eine gute Hautverträglichkeit und ein hohes Spreitvermögen aus [8,41]. Die pflanzlichen Öle und Fette wie Avocadoöl (*Avocado Oil*), Baumwollsamensöl (*Cotton Seed Oil*), Erdnussöl (*Peanut Oil*), Olivenöl (*Olive Oil*), Sonnenblumenöl (*Sunflower Seed Oil*), Weizenkeimöl (*Corn Oil*), Traubenkernöl (*Grape Seed Oil*), Färberdistelöl (*Safflower Oil*), Rizinusöl (*Castor Oil*), Kakaobutter (*Cacao butter*), Babassuöl (*Babassu Butter*), Illipiebutter (*Shorea Butter*) werden aufgrund ihrer hautpflegenden Eigenschaften in kosmetischen Mitteln verwendet [42].

Neben den Ölen und Fetten existiert noch die Stoffklasse der Wachse. Der Begriff kennzeichnet nicht nur feste Ester der höhermolekularen Fettsäuren mit höhermolekularen Alkoholen, sondern auch Stoffklassen mit völlig anderer chemischer Zusam-

mensetzung, deren physikalisches Verhalten an Wachse erinnert. Der Begriff „flüssiges Wachs“ gilt ebenfalls für Fettsäureester, doch bestehen die Alkylgruppen aus niedermolekularen Alkoholen oder die Komponenten sind bei Raumtemperatur mehr oder weniger flüssig. Für kosmetische Rezepturen sind als feste Wachse Bienenwachs (*Cera alba*), Carnaubawachs (*Carnauba*), Wollwachs (*Lanolin*) und als flüssiges Wachs das Jojobaöl (*Jojoba Oil*) von Bedeutung. Bienenwachs wird zur Konsistenzverbesserung in Salben und Cremes und zur Lippenstiftherstellung verwendet. Carnaubawachs erhöht den Schmelzpunkt von Formulierungsgrundlagen und wird ebenfalls zur Lippenstiftherstellung eingesetzt. Wollwachs gehört zu den ältesten W/O-Emulgatoren und zeichnet sich durch pflegende Eigenschaften aus. Jojobaöl spreitet gut auf der Haut und zieht rasch ein. Seine pflegenden Eigenschaften und das Bindevermögen für Feuchtigkeit rechtfertigen den Einsatz in Pflegeprodukten. Die pflanzlichen und tierischen Wachse sind den Fetten und Ölen in der Mehrheit der spezifischen Eigenschaften vielfach ähnlich [40,8].

3.2.2 Einteilung der Fette, Öle und Wachse

Die Fette, Öle und Wachse lassen sich anhand der chemischen Zusammensetzung verschieden klassifizieren. Die pflanzlichen Fette und Öle werden in 7 Hauptgruppen unterteilt. Ausschlaggebend hierfür ist die Kettenlänge der Fettsäuren, der Anteil der ungesättigten Fettsäuren sowie die Zahl und Stellung der Doppelbindungen. Hinzu kommen noch Öle mit oxidierten Fettsäuren (Beispiel: Ricinolsäure – *12-Hydroxy-cis-9-Octadecensäure*), von denen Rizinusöl der wichtigste Vertreter ist [41].

Tabelle 3-2.

Einteilung handelsüblicher Pflanzenöle und -fette (nach Rehm/Espig) [41].

Gruppe kommerzieller Öle	Vertreter
1. Laurinsäure-Gruppe	Babassuöl Kokosnussöl Palmkernöl
2. Pflanzenbutter-Gruppe	Kakaobutter Schibutter
3. Ölsäure-Gruppe	Avocadoöl Erdnussöl

	Mandelöl
	Olivenöl
	Palmöl
	Sesamöl
4. Linolsäure-Gruppe	Baumwollsamensöl
	Kürbiskernöl
	Maiskeimöl
	Mohnöl
	Färberdistelöl
	Sonnenblumenöl
5. Erucasäure-Gruppe	Rapsöl
6. Linolensäure-Gruppe	Leinöl
	Sojaöl
	Weizenkeimöl
7. Fettsäure-Gruppe (konjugiert)	Tungöl

Für kosmetische Zwecke ist die Einteilung der Fette und Öle nach ihrem Verhalten gegenüber Luftsauerstoff wichtig. Reagieren sie schnell, spricht man von „trocknenden Ölen“, reagieren sie langsam, bezeichnet man sie als „halbtrocknende Öle“, reagieren sie nicht bzw. sehr langsam, spricht man von „nicht trocknenden Ölen“. Die Bestimmung der Jodzahl und des Gehaltes bestimmter Fettsäuren ermöglicht die folgende Unterteilung [40,41]:

- Nicht trocknende Öle mit hohem Gehalt an Ölsäure (Jodzahl 75–100);
- Schwach oder halbtrocknende Öle mit niedrigem Gehalt an Linolsäure (Jodzahl 100–150);
- Trocknende Öle mit höherem Gehalt an Linol- und Linolensäure (Jodzahl 150–190);
- Feste pflanzliche Fette mit niedriger Jodzahl (< 75).

Die Wachse lassen sich aufgrund einer neueren Begriffsbildung wie folgt einteilen:

- pflanzliche Wachse und Raffinate (Esterwachse) – Carnaubawachs, Candelillawachs, Jojobaöl,
- tierische Wachse und deren Raffinate – Bienenwachs, Chinesisches Insektenwachs, Wollwachs raffiniert,
- Mineralwachse und deren Raffinate,
- chemisch veränderte Wachse – Carnaubawachs raffiniert,
- teilsynthetische Wachse und
- vollsynthetische Wachse.

In einigen Eigenschaften (Löslichkeit, Viskosität, Oberflächenspannung, Spreitung) übertreffen einige künstlichen Wachse die Natürlichen und sind somit für kosmetische Zwecke geeignet [40].

3.2.3 Eigenschaften und Funktionen der Biochinone im besonderen der Ubichinone

Die Bezeichnung Biochinone umfasst Ubichinone, K-Vitamine, Plastochinone und Tocopherylchinone. Aufgrund ihrer 1,4-benzochinoiden Struktur lassen sich Ubichinone auch als Benzochinone bezeichnen (s. Abb. 3-5). Typisch für diese Substanzklasse ist die polyprenoide Seitenkette und der aromatische Kern. Dieser bildet das reaktive Zentrum und ist ausschlaggebend für die biologischen Aktivitäten. Die Biochinone haben einen bedeutenden Anteil an den Elektronentransportaktivitäten in den Zellen und besitzen die molekulare Kapazität Oxidationen und Reduktionen einzugehen. Die polyprenoide Seitenkette weist unterschiedliche Längen und Sättigungsgrade in Abhängigkeit vom Verbindungstyp (K-Vitamine, Plastochinone, etc.) auf. Diese Seitenkette verleiht den Biochinonen den hydrophoben Charakter und ermöglicht Bindungen mit lipophilen Zellstrukturelementen einzugehen. Die Biochinone sind in tierischen und pflanzlichen Organismen sowie in Mikroorganismen natürlich existent [43].

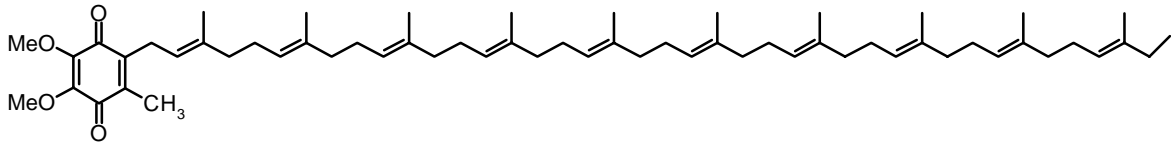
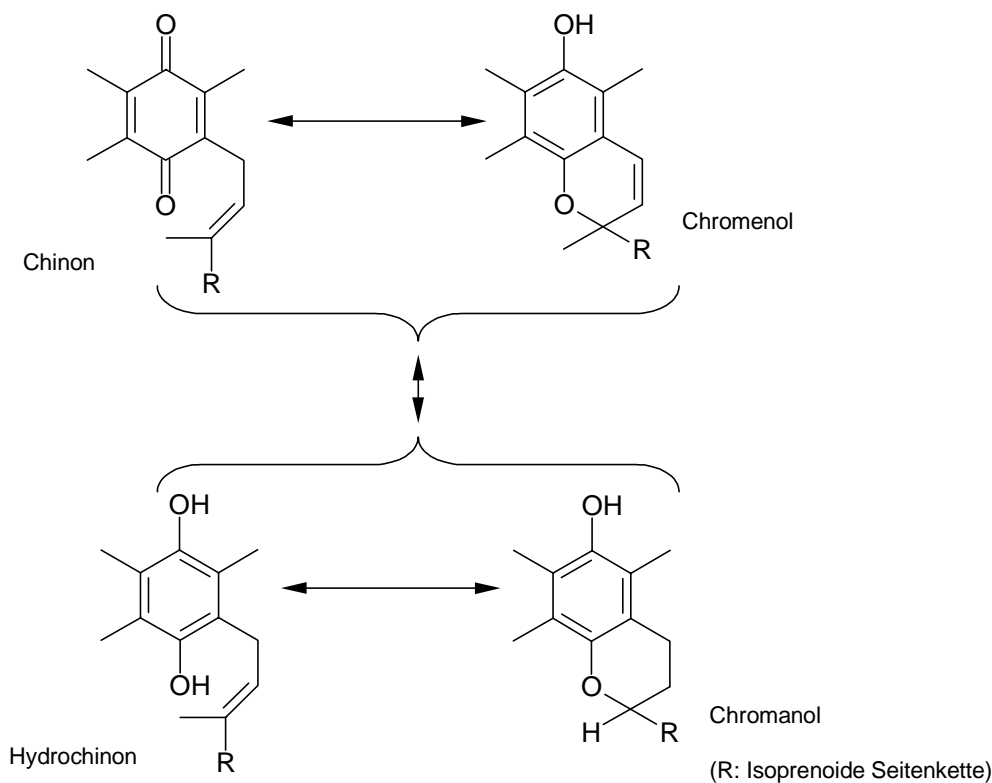


Abbildung 3-5.

Chemische Strukturformel für Ubichinon-50. IUPAC-Name: 2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-(3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-decamethyl-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-tetracontadecaenyl)-1,4-benzoquinone.

Die Seitenkette der Ubichinone variiert zwischen 6 und 10 Isopreneinheiten. Bezeichnen lassen sich die Ubichinone mit dem Symbol Q_n , wobei n die Anzahl der Isopreneinheiten angibt. Die in der Seitenkette enthaltenen isolierten Doppelbindungen sind alle *trans*-ständig. Die indirekte Doppelbindung in Nachbarstellung zur Carbonylfunktion erlaubt die Cyclisierung der Biochinone mit Bildung von Chromenolen und Chromanolen (s. Abb. 3-6). Im oxidierten und reduzierten Zustand können die Biochinone cyclisieren und es entstehen insgesamt 4 Isomere. Die Cyclisierungsprodukte kommen natürlich in den Mitochondrien vor [43].

**Abbildung 3-6.**

Darstellung der 4 isomeren Formen der Biochinone [43].

Die Biochinone fungieren als Elektronen- und Protonenüberträger und nehmen an den enzymatischen Vorgängen der Atmungskette sowie an der oxidativen Phosphorylierung teil. Als Coenzyme sind die Ubichinone an beiden Prozessen beteiligt. Die reduzierte Form – das Ubichinol – wirkt als Antioxidanz und schützt biologische Membranen vor Lipidperoxidation [44,45]. Ubichinol-50 unterbindet den Beginn und die Verbreitung der Peroxidation, wogegen Vitamin E ausschließlich der Verbreitung entgegenwirkt. Die Lokalisierung des Ubichinol-50 in den hydrophoben Regionen der Phospholipiddoppelschichten ist ausschlaggebend für die Funktionalität. Alle enzymatischen Prozesse, die in der Atmungskette ablaufen, ermöglichen durch die Ubichinol-50-Cytochrom c Reduktase (Komplex III) die Regeneration von Ubichinol-50 aus dem Semichinon-Radikal (s. Abb. 3-3 und Kapitel 3.1.4) [46]. Das Semichinon-Radikal, das während des Oxidations-Reduktions-Mechanismus auftritt, wird durch Bindungen an spezifische Proteine stabilisiert. Mitochondrien, Zellorganelle der Atmungskette, weisen einen ‚Ubichinon-Pool‘ (Überschuss) auf, der hauptsächlich Ubichinon-50 oder Ubichinol-50 enthält und für die antioxidative Aktivität verantwortlich

ist [47]. Studien belegen, dass Ubichinol-50 in vielen Geweben repräsentativ ist und die Lipidperoxidation in isolierten Mikrosomen inhibiert. Des Weiteren stellt es ein effektives Antioxidanz für Liposomen (Phospholipiddoppelschichten) dar [48]. Beobachtungen und Untersuchungen von Lea und Kwietny [49] sowie Mellors und Tappel [50,51] zeigten, dass Ubichinon-50-Fettsäuremischungen und/oder isolierte Mitochondrien bei induzierter Photooxidation vor Lipidperoxidation schützen können. Studien von Takeshige et al. [52] belegen, dass Ubichinon-50 in Liposomen reduziert werden kann und dadurch einen Schutz der liposomalen Phospholipide gegen Peroxidation darstellt.

In tierischen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Ubichinon-50 in der Innenmembran der Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum, in Lysosomen, Peroxisomen und in der Plasmamembran lokalisiert ist. Es gibt Hinweise, dass die Synthese von Ubichinon-50 im endoplasmatischen Retikulum stattfindet. Mit Hilfe des Golgi-Apparates kann es an verschiedene zelluläre Bestimmungsorte transportiert werden [48].

Der Reduktionsmechanismus von Ubichinon-50 in Membranen, außerhalb der Mitochondrien, ist nur ungenügend bekannt. Eine Möglichkeit erörtert, dass Chinon-Reduktasen in verschiedenen Membranen diese Funktion durchführen. Dabei können die mikrosomalen NADH-cytochrome b_5 und NADPH-cytochrome P-450 Reduktasen, die DT-diaphorasen und die NADH-dehydrogenasen in Verbindung mit der mitochondrialen Außenmembran und der Plasmamembran als Ubichinon-50-Reduktasen wirken [53,54,55]. Ein weiterer vorstellbarer Mechanismus erfordert eine vorübergehende Überlagerung von Mitochondrien und anderen Membranorganellen, um die Reduktion von Ubichinon-50 in den vereinigten Membranen des mitochondrialen Elektronen-Transport-Systems zu gewährleisten [56].

Studien zur Altersabhängigkeit des Ubichinon-50-Gehaltes belegen eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und antioxidativer Wirkung. Beyer et al. [57] haben für das Versuchstier Ratte gezeigt, dass der Ubichinon-50-Gehalt in verschiedenen Geweben nach der Geburt ansteigt, sein Maximum nach 18 Monaten erreicht und mit fortschreitendem Alter wieder abnimmt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Kalén et al.

[58] mit humanem Gewebe. Untersuchungen von humanem Gewebe zeigen ein Maximum von Ubichinon-50 im Alter von 20 Jahren und mit zunehmendem Alterungsprozess einen stetigen Abbau des Ubichinon-Gehaltes (s. Tabelle 3-5). Der Ubichinon-50-Gehalt im menschlichen Blut und andere lipophile und hydrophile Antioxidantien sowie deren Verteilung zwischen den Blutkomponenten und Lipoproteinen dienen als Marker für oxidative Schädigungen der Zellen und zeigen pathologische Veränderungen auf [59]. Ultraviolette Strahlung führt zu oxidativen Schädigungen von Zellen, vor allem von Hautzellen. Dies korreliert mit einer Abnahme der Antioxidantien in den Zellen [60].

Tabelle 3-3.

Altersabhängigkeit des Ubichinon-Gehaltes humaner Organe (in µg/mg bezogen auf Feuchtgewicht des Gewebes) [58].

Organ	1-3 Tage	0.7 – 2 Jahre	19-21 Jahre	39-43 Jahre	77-81 Jahre
Herz	36.7	78.5	110.0	75.0	47.2
Niere	17.4	53.4	98.0	71.1	64.0
Leber	12.9	45.1	61.2	58.3	50.8
Bauchspeicheldrüse	9.2	38.2	21.0	19.3	6.5
Milz	20.7	30.2	32.8	28.6	13.1
Lunge	2.2	6.4	6.0	6.5	3.1

Parallel zur Abnahme des Ubichinon-50-Gehaltes mit zunehmendem Alter ist eine drastische Zunahme der Substanz Dolichol – in bestimmten Organen um mehr als das 100fache – zu verzeichnen; der Gehalt an Cholesterol bleibt relativ unverändert. Dolichol ist ein langkettiger isoprenoideer Alkohol und in humanen Zellen existent. Die Aufrechterhaltung eines angemessenen Ubichinol-50-Gehaltes verhindert bzw. verlangsamt die beginnende Lipidperoxidation und somit die Schwächung des Organismus [48].

3.3 Bestimmung lipophiler Substanzen

In der analytischen Chemie eignen sich chromatographische Techniken für die Trennung und Bestimmung lipophiler Substanzen. Die Anwendung flüssigchromatographischer Verfahren [61,62] in Verbindung mit verschiedenen Detektionstechniken zeigen Lösungsansätze für die vorliegenden Trennprobleme. Seit Anfang der 80er Jahre hat sich für die Bestimmung von Lipiden die Flüssigchromatographie zu einer quantitativen Methode entwickelt. Die Charakterisierung von Lipiden spielt in der klinischen Chemie [63,64], der Lebensmittelchemie [65,66] sowie der kosmetischen Industrie [11] eine wichtige Rolle.

Universelle Detektionssysteme, wie Verdampfungs-Lichtstredetektor und Elektrospray-Massenspektrometer, ermöglichen durch online Kopplung mit der Flüssigchromatographie die direkte und einfache Bestimmung von Lipiden [17,67]. Der Einsatz des DAD's u. a. zur Bestimmung von fettlöslichen Vitaminen und Carotinoiden im menschlichen Blutplasma [68], für die quantitative Bestimmung von Phospholipiden in Fruchtwässern [69], für die Bestimmung von Cholesteryl-fettsäureestern in biologischen Proben nach Lipidextraktion und säulenchromatographischer Isolierung der Fettsäureester [70], oder für die Bestimmung von Fettsäuren nach Überführung in ihre Hydroxysäuren [71] limitiert die zur Verfügung stehenden Eluenten und die zu detektierenden Substanzklassen. Substanzklassen, wie die neutralen Lipide, die über eine geringe UV-Absorption verfügen, sind nur durch Derivatisierung der Verbindungen mit HPLC-DAD nachweisbar. Weitere chromatographische Techniken, wie Gaschromatographie (*Gas Chromatography* – GC) oder Dünnschichtchromatographie (*Thin Layer Chromatography* – TLC), wurden von Sajbidor et al. [72] eingesetzt, um Lipide von Mikroorganismen nachzuweisen. Hierfür wurden Zellextrakte angefertigt, diese mit TLC in polare und unpolare Fraktionen getrennt und einzeln mit GC analysiert.

Die HPLC-ELSD und LC/MS stellen im Vergleich zu den routinemäßig eingesetzten Methoden, wie HPLC gekoppelt mit DAD, GC oder TLC, eine signifikante Verbesserung aufgrund einer empfindlicheren und selektiveren Detektion dar [73,16]. Sie sind direkt und meist ohne größeren Mehraufwand an Probenvorbereitung anwendbar.

3.3.1 Flüssigchromatographische Trennung und Detektion lipophiler Substanzen

Die Lipide lassen sich in unpolare und polare Fraktionen unterteilen. Zu den unpolaren Substanzen zählen Triglyceride, freie Fettsäuren, Fettsäureester, Sterole und Sterylester. Die Glycolipide, Sphingolipide und Phospholipide gehören zu den polaren Lipiden.

Die Trennung in Lipidklassen, wie in Phospholipide, Sterole, Ester, Fettsäuren, erfolgt mit polaren, auf kieselgelbasierenden stationären Phasen. Treiber [74] beschreibt den Nutzen einer Normal-Phasen HPLC für die Klassifizierung von Substanzklassen nach ihrer Polarität. Die Trennung erfolgt auf einer LiChrospher 100 Diol Säule mit einem Gradienten, der den gesamten Polaritätsbereich von Hexan bis Wasser abdeckt. Die mobile Phase wurde als Serie aufeinanderfolgender Gradienten entwickelt. Analyte ohne ausreichende UV-Absorption werden mit ELSD detektiert. Angewendet wird diese Methode zur Klassifizierung von biologischem Material und zur Durchführung von Metabolismusstudien. Christie [13] beschreibt die Trennung eines Lipidextraktes in Cholesterylester, Triacylglycerole, Cholesterol, Cardiolipin, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholin mit Hilfe einer Kieselgelsäule und einem Gradientengemisch aus tierischem Gewebe. In einer weiteren Veröffentlichung von Christie und Urwin [75] wird die Trennung von Lipidklassen (einfache Lipide, Glycolipide und Phospholipide) mit chemisch gebundenen stationären Phasen (Cyanopropyl Phase und polymerisierte Polyvinylphase) und Gradientensystem zum Nachweis in pflanzlichen Geweben dargestellt.

Unpolare Lipide trennt man mittels modifizierter stationärer Phasen auf, z. B. mit Cyanopropylen derivatisierten Kieselgelen. El-Hamdy und Christie [76] trennten Cholesterylester, Triacylglyceride, freie Fettsäuren, Mono- und Diglyceride mit solch einer stationären Phase. Mit Alkylketten derivatisierte Kieselgelsäulen ermöglichten Marcato und Cecchin [77] die Bestimmung von Fettsäuren, Mono-, Di- und Triglycerid-Mischungen, die als antistatische Verbindungen in thermoplastischen Polymeren eingesetzt werden. Stationäre Phasen basierend auf Aluminiumoxid wurden von Nordbäck und Lundberg [78] verwendet, um Kohlenwasserstoffe, Wachsester, Ste-

rylester, Triacylglyceride und Sterole zu trennen und in natürlichen Proben zu quantifizieren. Die beschriebenen Methoden nutzen als Detektionsprinzip den ELSD.

Für die Charakterisierung von polaren Lipiden, insbesondere von Phospholipiden, existieren eine Vielzahl von Applikationen. Gunnarsson et al. [79] bestimmten Phospholipide in Blutextrakten mittels HPLC-ELSD und LC/MS. Für die flüssigchromatographische Trennung wird eine LiChrospher 100 Diol Säule mit einem Gradientensystem verwendet. Bünger und Pison [80] beschreiben die Trennung und Quantifizierung von 9 Lipidklassen mit einer Kieselgelsäule als stationärer Phase und einem Gradienten bestehend aus Mischungen von Chloroform, Methanol und Wasser für den Nachweis in biologischen Proben. Für die Charakterisierung pflanzlich vorkommender polarer Lipide entwickelten Abidi et al. [65], Picchioni et al. [81] und Vaghela und Kilara [82] HPLC-Methoden mit Lichtstredetektion. Die Methode von Abidi et al. [66] trennt stickstoffhaltige Phospholipide mit Hilfe einer C18-Phase und die Detektion erfolgt durch Lichtstreu- und UV-Absorptions-Detektion. Picchioni et al. [81], Vaghela und Kilara [82] arbeiten mit Kieselgelsäulen als stationäre Phasen für die Trennung von Phospho- und Glycolipiden. Für die Bestimmung tierischer Phospholipide verwenden Caboni et al. [83] eine Kieselgelsäule und ein binäres Gradientensystem.

Für die Bestimmung von Ceramiden in Hautextrakten wurde die TLC und die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (*High Performance Thin Layer Chromatography* - HPTLC) verwendet. Gildenast und Lasch [84] sowie Gaudin et al. [85] entwickelten eine flüssigchromatographische Methode mit ELS-Detektion für die Analyse dieser Substanzen. Vietzke [30] entwickelte eine LC/MS-Methode zur Charakterisierung und Identifizierung der Stratum corneum Ceramide.

McNabb et al. [86] vergleichen im Artikel alle kommerziell erhältlichen Lichtstredetektoren anhand der flüssigchromatographischen Trennungen für neutrale, polare und saure Lipidklassen. Der Nutzen des ELSD besteht in seiner breiten Anwendbarkeit, Empfindlichkeit, Robustheit und Bezahlbarkeit der kommerziell erhältlichen Modelle. Mit Verbesserungen des Aussehens und der technologischen Verständlichkeit wird sich der ELSD zu einem kostbaren Detektor für die HPLC entwickeln. Lipp und Anklam [15] stellen in ihrem Übersichtsartikel die Vorteile des Lichtstredetektors in

Kombination mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und der überkritischen Fluidchromatographie für die Lebensmittelanalytik heraus.

3.3.2 Bestimmung der Fette, Öle und Wachse

Für die Untersuchung der Fette, Öle und Wachse sind die DGF-Einheitmethoden (Deutsche Einheitmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen) für die zertifizierten Untersuchungslabore maßgebend [87]. Die Fette, Öle und Wachse sind komplexe Ester-mischungen und die Analytik basiert auf standardisierten physikalischen, chemischen, biochemischen und sensorischen Methoden. In den Einheitmethoden sind die Verfahren von der Probennahme über qualitative Prüfungen, physikalische Prüfungen, chemische Kennzahlen bis zu speziellen Verfahren festgelegt. Einfache physikalische Messungen, wie Dichte, Brechungsindex, Schmelzpunkt werden zur Beurteilung der Fette, Öle und Wachse herangezogen wie instrumentell aufwendigere Methoden, wie z. B. die gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuremethylestern [88].

Für die Beurteilung der Fette und Öle dienen das spezifische Gewicht, der Brechungsindex, der Schmelz- bzw. Erstarrungspunkt, die Säurezahl (SZ), die Verseifungszahl (VZ), die Jodzahl (JZ), die Rhodanzahl (Rh.Z.), der unverseifbare Anteil (UV), die Peroxidzahl (POZ) und der Aschegehalt. Für die Kennzeichnung der Wachse ist die Ermittlung der chemisch-physikalischen Konstanten, wie Dichte, Brechungsindex, Tropf- und Schmelzpunkt, VZ, SZ, JZ und Unverseifbares, wichtig. Gegenüber den Fetten ist die Verseifungszahl im allgemeinen niedrig und die Jodzahl klein [40].

Die Charakterisierung der Fette und Öle wird durch die Bestimmung der Glyceride mittels Flüssigchromatographie, Gaschromatographie, enzymatischer Hydrolyse und überkritischer Fluidchromatographie ermöglicht. Zusätzlich lassen sich Fette und Öle durch die Analyse freier Fettsäuren und der Nebenkomponten, wie Phospholipide, Sterole, Tocopherole und Polyphenole, charakterisieren [88].

Fiebig [89] beschrieb 1985, dass für die qualitative Trennung von Triglyceriden besonders die Hochleistungsflüssigchromatographie an Umkehrphasen mit chemisch gebundenen C18-Alkylen entwickelt und angewendet worden ist. Sie ist der Technik der Gaschromatographie für diese Substanzen überlegen und liefert auf schonende Art und Weise mehr Information über die Zusammensetzung eines Fettes oder Öles. Er verwendete verschiedene C18-Phasen zur Trennung und einen RI-Detektor für den Nachweis der Triglyceride. Bei der Charakterisierung von Mandelölen - Vergleich des Kernöls mit dem Schalenöl – wurden von Saura-Calixto et al. [90] für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung die Methylester gaschromatographisch an verschiedenen Phasen analysiert. Für die Bestimmung der Triglyceridzusammensetzung in Johannisbeersamenöl nutzte Perrin et al. [91] eine HPLC-Methode mit Laser-Lichtstreu-Detektion. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden einige Triglyceridfraktionen gesammelt, in die Methylester umgewandelt und gaschromatographisch analysiert. Zur Überprüfung der Reinheit von Olivenöl wurde von Salivaras und McCurdy [92] eine HPLC-Methode entwickelt, die mit einer C18-Phase die Triglyceride trennt und so Verunreinigungen mit Canolaöl erfassen kann. Die Charakterisierung von Acylglycerinen und weiteren Lipidklassen in essbaren Fetten und Ölen gelang Moreau und Powell [93] mit einer Diol-Phase und UV-Absorptions- und Lichtstreuungsdetektion. Die Bestimmung von Triglyceriden mit HPLC-ELSD unter isokratischen Bedingungen gewährleistet die Differenzierung verschiedener Fette und Öle. Stolywho et al. [117], Aitzetmüller und Grönheim [118] und Robinson [67] geben in ihren Veröffentlichungen HPLC-Methoden zur Bestimmung von Triglyceriden mit Lichtstreuungsdetektion wieder.

3.3.3 Bestimmung des Ubichinon-50

Ubichinon-50 lässt sich in biologischen Proben mit flüssigchromatographischen Methoden und verschiedenen Detektionstechniken nachweisen. Die Eigenschaften der Ubichinone erlauben den Ablauf reduktiver und oxidativer Prozesse. Aufgrund der Redoxfähigkeit kommen elektrochemische Detektoren zum Einsatz, die den selektiven Nachweis im Spurenbereich ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ermöglichen. Ubichinone verfügen zudem über ein lokales Absorptionsmaximum bei 275 nm, wodurch zusätzlich der DAD angewendet werden kann.

Für die Bestimmung von Ubichinon-50 in humanem Blut wurde von Morimoto et al. [94] eine gaschromatographische Methode mit Elektroneneinfang-Detektion (*Electron Capture Detector* - ECD) getestet. Während der chromatographischen Trennung cyclisierte ein Teil des Ubichinon-50 zu Ubichromenol-45. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erwies sich als ungenügend.

Eine Trennung von Ubichinonen mit unterschiedlicher Seitenkettenlänge ermöglichte die von Proska und Slavikova [95] publizierte Methode. Als stationäre Phase wurde eine C18-Trennsäule verwendet. Die Ubichinone, die 6 bis 10 Isopreneinheiten enthalten, wurden mit einem Eluenten bestehend aus Methanol und Tetrahydrofuran von der stationären Phase eluiert und mit dem DAD bei 270 nm detektiert.

Für die Bestimmung von Ubichinon-50 in Plasma ist eine vollständige Extraktion aus dem biologischen Material erforderlich. Nach Hirota et al. [96] beeinflusst die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) entscheidend die Wiederfindungsrate von Ubichinon-50 bei Temperaturen unter 17°C. Wird die Extraktion unterhalb dieser Temperaturen durchgeführt, ist für die Wiederfindung von Ubichinon-50 in Plasma SDS entscheidend. Die Wiederfindungsrate von Ubichinon-50 bei einer Extraktionstemperatur von 7°C liegt ohne SDS bei 12.3 +/- 3.1 % und mit SDS bei 100.9 +/- 4.1 %. Ubichinon-50 ist gut löslich in n-Hexan. Es eignet sich nicht für die Extraktion von Plasma bei niedrigen Temperaturen. Durch die Zugabe von SDS zum Plasma wird Ubichinon-50 extrahierbar. Das Natriumdodecylsulfat besitzt die Fähigkeit, die Struktur der Proteine zu verändern und Bindungen zu zerstören. Zhiri und Belichard [97] führten Stabilitätsstudien von Ubichinon-50 in Plasma unter verschiedenen Bedingungen, z. B. 6 Stunden bei Raumtemperatur, Einfrieren und Auftauen, Lagerung für 24 Wochen bei - 20°C, durch. Es wurde keine Abnahme der Ubichinon-50 Konzentration unter den getesteten Bedingungen festgestellt.

Verschiedene klinische Studien untersuchten das therapeutische Potential von Ubichinon-50 zur Behandlung bestimmter Krankheiten, wie z. B. Herzmuskelleiden (Cardiomyopathy), Herzkrampfleiden (Angina pectoris) und Bluthochdruck. Die medizinische Forschung kann mit Daten zum Ubichinon-50-Gehalt im Blut begleitet und unterstützt werden. Vadhanavikit et al. [98], Okamoto et al. [99] und Artuch et al.

[100] bestimmten den Ubichinon-50-Gehalt im Blut flüssigchromatographisch für ihre klinischen Studien an verschiedenen Patientengruppen. Bezugnehmend auf den Artikel von Vadhanavikit et al. [98] optimierten Muratsu et al. [101] die Methode in Bezug auf Durchsatz und Kosten für die Analyse von Ubichinon-50 in Blut von Menschen, Kaninchen und Ratten für Forschungszwecke. Für den Nachweis von Ubichinon-50 in pharmazeutischen Formulierungen entwickelte Andersson [102] eine flüssigchromatographische Methode mit einer Spherisorb ODS-2 Säule als stationäre Phase und einer mobilen Phase, die sich aus n-Hexan und Methanol zusammensetzt. Die Detektion erfolgte mittels DAD bei 275 nm. Graves et al. [103] beschrieben in der Veröffentlichung die Analyse von Ubichinon-50 aus humanem Plasma und tierischem Gewebe (Plasma, Leber, Herz und Hirn der Ratte). Vor der HPLC-Trennung auf einer C8-Trennphase mit Methanol und n-Hexan, wurde das Ubichinon-50 aus menschlichem Plasma und tierischem Gewebe verschiedenen Extraktionsschritten unterzogen. Detektiert wurde Ubichinon-50 bei 275 nm. Die Bedeutung des Lipid/Ubichinon-50-Verhältnisses als ein möglicher Marker für das ansteigende Risiko von Artherosklerose beschrieben Tomasetti et al. [104] in ihrem Artikel. Zusätzlich zu Ubichinon-50 wurden die Antioxidantien α -Tocopherol, β -Carotin und Retinol sowie Lipoprotein-Fractionen im Plasma untersucht. Nach Extraktion der fettlöslichen Komponenten aus dem Plasma wurden die Antioxidantien auf einer Spherisorb ODS-C18 Phase getrennt und mit UV-Absorptionsmessung bei 325 nm (Retinol), 292 nm (α -Tocopherol) und 275 nm (Ubichinon-50) detektiert. Die Bestimmung von β -Carotin wurde separat mit HPLC-DAD bei 450 nm durchgeführt.

Die Redoxfähigkeit der Ubichinone und Tocopherole erlaubt die Bestimmung mit elektrochemischer Detektion. Amperometrische oder coulometrische Detektionssysteme ermöglichen teilweise einen selektiveren und sensitiveren Nachweis für diese Substanzen; benötigen für den Stromfluss in den elektrochemischen Zellen ein Leitsalz, dass der mobilen Phase zugesetzt werden muss. Beide Techniken werden in Kombination mit dem DAD verwendet, da nicht alle zu detektierenden Substanzen über diese Eigenschaften verfügen. Für die simultane Bestimmung von Antioxidantien setzten Lang et al. [105,106] den DAD in Reihe geschaltet vor den amperometrischen Detektor ein. An den amperometrischen Detektor wurde ein Potential von + 0.5 bis + 0.7 V angelegt. Die biologischen Proben wurden vor der flüssigchromato-

graphischen Trennung einer Extraktion unterzogen. Podda et al. [107] bestimmte Tocopherole, Tocotrienole, Ubichinone und Ubichinole im Gewebe mit DAD und amperometrischer Detektion. Die Ubichinone wurden bei 275 nm mit DAD detektiert und die anderen Verbindungen amperometrisch mit einem Potential von + 0.5 V. Die Nachweisgrenze für die elektrochemische Detektion lag für Tocopherole bei 0.1 pmol und für Ubichinol-50 bei 0.3 pmol. Die Nachweisgrenze für die ultraviolette Absorption von Ubichinol-50 lag bei 0.2 pmol aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten. Für die Analyse von Ubichinol-50 und Ubichinon-50 im menschlichem Plasma setzten Yamashita und Yamamoto [108] einen amperometrischen Detektor mit einem Potential von + 0.6 V ein. Die Bestimmungsgrenze von Ubichinol und Ubichinon für diese Methode liegt bei 4 nmol. Das Verhältnis von Ubichinol zu Ubichinon ist ein guter Marker für oxidativen Stress und sollte bei gesunden Menschen 95/5 betragen. Okamoto et al. [109] veröffentlichten, dass die Methode mit elektrochemischer (amperometrisch) Detektion 70mal empfindlicher als die vorangegangene mit UV-Absorption ist. Die Nachweisgrenze für Ubichinol-50 lag bei 150 pg.

Die coulometrischen Elektroden arbeiteten in der Veröffentlichung von Edlund [110] im Oxidations-Reduktions-Oxidations-Mode (+ 0.5 V; - 0.5 V; + 0.3 V). Dabei wurde die letzte Elektrode zur Detektion von α -Tocopherol, Ubichinol-50 und Ubichinon-50 verwendet. Cholesterol wurde mittels UV bei 215 nm detektiert. Die Trennung dieser Substanzen nach der Extraktion aus Blut und Gewebe erfolgt mit Vorsäule und analytischer Säule (Sperisorb ODS-2). Die Vorsäule wurde für die Elimination polarer Verbindungen eingesetzt und verbesserte die Basislinienstabilität während der elektrochemischen Detektion. Eine Methode zur Bestimmung der lipophilen Antioxidantien α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Ubichinol-50, Ubichinon-50, β -Cryptoxanthin und β -Carotin in Plasma von Neugeborenen wurde von Finckh et al. [111] präsentiert. Zuerst wurde die Lipidextraktion durchgeführt und anschließend die Verbindungen auf einer RP_{C₂/C₁₈}-Säule getrennt. Die coulometrische Detektion wurde im Reduktions-Oxidations-Modus (- 0.6 V; - 0.15 V; + 0.6 V) durchgeführt. Die Nachweisgrenzen für alle Substanzen lagen zwischen 21 und 60 fmol, das entspricht Werten zwischen 0.004 und 0.012 μ mol/l Plasma. Diese Methode ermöglichte die Konzentrationsbestimmung von lipophilen Antioxidantien im Plasma kranker, frühgeborener Kinder zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress. Grossi et al. [112] beschrieben

in ihrer Veröffentlichung eine verbesserte HPLC-Methode für die Bestimmung von Ubichinon-50 in Plasma. Das Ubichinon-50 wurde von den Lipoproteinen im Plasma getrennt durch Zugabe von Methanol und mit n-Hexan extrahiert. Nach der Flüssigextraktion wurde eine Festphasenextraktion mit Kieselgel- und C18-Kartuschen durchgeführt. Die flüssigchromatographische Trennung basiert auf einer Ultrasphere XL C18-Phase. Für die Detektion wurde die UV-Absorption und die coulometrische Detektion im Reduktions-Oxidations-Modus (- 0.6 V; - 0.15V; + 0.45 V) eingesetzt. Der durchschnittliche Gehalt von Ubichinon-50 im Plasma gesunder Probanden beträgt 0.80 +/- 0.20 mg/l. Die Bestimmungsgrenze von Ubichinon-50 im Plasma betrug 0.05 mg/l für die UV-Absorption und 0.005 mg/l für die elektrochemische Detektion. Die Bestimmung des Verhältnisses zwischen reduziertem und oxidiertem Ubichinon-50 im Plasma als ein möglicher Marker für oxidativen Stress wurde von Lagendijk et al. [113] beschrieben. Die Vorbereitung der Proben beeinflusst den Redoxstatus des Ubichinon-50. Die veröffentlichte isokratische HPLC-Methode für die Bestimmung von Ubichinol-50 und Ubichinon-50 in Plasma-Isopropanol-Extrakten wurde zur Optimierung der Probenvorbereitung benutzt, um das Verhältnis -ol/-on zuverlässig zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigten, dass Ubichinol-50 im Blut, im Plasma und in Isopropanol-Extrakten nicht stabil ist. Das Verhältnis -ol/-on verändert sich innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme erheblich. Extrahiert wurden die Proben nach den Methoden von Edlund [110] und Lang et al. [105]; die flüssigchromatographische Bestimmung wurde in Anlehnung an die Methode von Edlund [110] im Oxidations-Reduktions-Oxidations-Modus (+ 0.5 V; - 0.5 V; + 0.3 V) durchgeführt. Das Zeitintervall zwischen Blutentnahme und HPLC-Analyse sowie die Probenvorbereitung beeinflussten entscheidend das zu messende Verhältnis. Dieser Indikator ist unabhängig vom Cholesterolgehalt des Plasmas und erlaubte einen direkten Vergleich der Probanden.

3.4 Detektionssysteme für die Bestimmung lipophiler Substanzen

In den Abschnitten 3.4.1 bis 3.4.4 werden Detektionssysteme für die Flüssigchromatographie beschrieben, die neben den Routineverfahren, wie UV-Absorptions-, Fluoreszenz- und Brechungsindex-Detektion, in den letzten Jahren an Bedeutung gewannen. Der Verdampfungs-Lichtstredetektor und das API-ES-Massenspektrometer zählen zu den universell einsetzbaren Detektionssystemen. Die coulometrische Detektion basiert auf elektrochemischen Grundlagen und setzt die Redoxfähigkeit der zu bestimmenden Substanzen voraus. Diese spezifische Eigenschaft gewährleistet den empfindlichen Nachweis einzelner Verbindungsklassen. Das LC-Transform-Interface verbindet die Chromatographie mit der IR-Spektroskopie. Die Grenzen sowie die Vor- und Nachteile der verwendeten Detektionsverfahren werden im folgenden Text erläutert.

3.4.1 Verdampfungs-Lichtstredetektor

Der Verdampfungs-Lichtstredetektor ermöglicht die Detektion gelöster Substanzen, die einen geringeren Dampfdruck als die mobile Phase besitzen [114,115]. Er wird auch als Massendetektor bezeichnet, da keine molekülspezifischen Eigenschaften für die Detektion ausschlaggebend sind [65].

Das Funktionsprinzip gliedert sich in Vernebelung des Eluenten, Verdampfung der mobilen Phase und Detektion des Analyten [114,116]. Die Detektion der Partikel kann mit monochromatischer oder polychromatischer Strahlung erfolgen [117,118]. In der Abbildung 3-5 sind die grundlegenden Verfahrensschritte eines ELSD schematisch dargestellt.

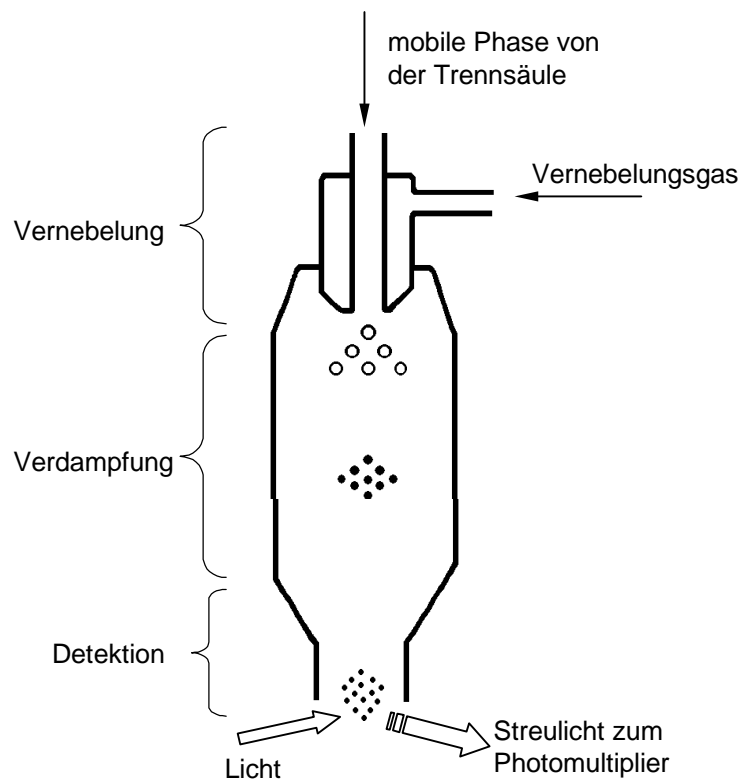


Abbildung 3-5.

Schema der Verfahrensschritte eines Verdampfungs-Lichtstreu-Detektors [114].

Die mobile Phase wird nach Verlassen der chromatographischen Trennsäule mit Hilfe eines Gases (meist Stickstoff) zu einem Aerosol versprüht. Dabei entstehen Tropfen, die sich anhand der Normalverteilung beschreiben lassen [119]:

$$(3-1) \quad \frac{dn}{dX} = \frac{\delta \cdot X_m}{\sqrt{\pi} X (X_m - X)} e^{-[\delta \cdot \ln(\frac{\alpha X}{X_m - X}) + \frac{3}{2\delta}]^2}$$

X : Tropfendurchmesser
 X_m : maximaler Tropfendurchmesser
 α, δ : Verteilungsparameter

Der maximale Tropfendurchmesser lässt sich durch die folgende Gleichung ausdrücken.

$$(3-2) \quad X_m = D_0 \left[1 + \alpha e^{(1/4\delta^2)} \right]$$

D_0 : mittlerer Tropfendurchmesser

Die Tropfengröße ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittelgemisches sowie von der relativen Geschwindigkeit des Gases und der mobilen Phase. Von Nukiyama und Tanasawa wurde eine empirische Gleichung aufgestellt, die es ermöglicht, den mittleren Tropfendurchmesser D_0 im Aerosol zu kalkulieren [116,120,121]:

$$(3-3) \quad D_0 = \frac{585 \cdot \sqrt{\sigma_l}}{(v_g - v_l) \cdot \sqrt{\rho_l}} + 597 \cdot \left(\frac{\mu_l}{\sqrt{\sigma_l \cdot \rho_l}} \right)^{0.45} \cdot \left(\frac{1000 \cdot Q_l}{Q_g} \right)^{1.5}$$

σ_l : Oberflächenspannung

ρ_l : Dichte

μ_l : Viskosität

$(v_g - v_l)$: Differenz der Fließgeschwindigkeiten aus Vernebelungsgas und mobiler Phase

Q_l/Q_g : Verhältnis der Flussraten (flüssig/gasförmig)

Der mittlere Tropfendurchmesser wird durch eine Funktion der Oberflächenspannung σ , der Viskosität μ und der Dichte ρ beschrieben, wobei der Index l für flüssig (liquid) und Index g für gasförmig (gaseous) steht. Als Richtlinien für die Gültigkeit der Gleichung sind die Tropfengröße (15 - 90 μm), die Dichte der mobilen Phase (0.7 - 1.2 g/ml), die Oberflächenspannung des Eluenten (19 - 73 dyn/cm) und die Viskosität des Lösungsmittelgemisches (0.0003 - 0.5 P) ausschlaggebend [122].

Nach der Vernebelung des Eluenten wird im Verdampferrohr („drift tube“) das Solvens verdampft, um feste Partikel des Analyten für die Detektion zu erhalten. Die Verdampfungstemperatur kann von 30° bis 100°C in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der mobilen Phase variieren. Niedrige Verdampfungstemperaturen fördern die Entstehung größerer Partikel. Zu hohe Temperaturen können zu einer partiellen Sublimation des Analyten und zum Empfindlichkeitsverlust führen. Die Verteilung im Aerosol nach Verdampfung des Eluenten kann als Bezug des Tropfendurchmesser X zum Partikeldurchmesser X_p dargestellt werden [116,120,123]:

$$(3-4) \quad X_p = X \cdot \left(\frac{c}{\rho} \right)^{1/3}$$

c: gelöste Konzentration im Eluenten

ρ: Dichte des Analyten

Mit Partikelgrößen von 0.1 bis 10 µm erreicht man eine maximale Intensität an gestreutem Licht. Voraussetzung hierfür ist, dass der einfallende Lichtstrahl im sichtbaren Wellenlängenbereich liegt.

Die zu analysierenden Substanzen (Tröpfchen- oder Partikelnebel) verlassen das Verdampferrohr und gelangen in eine optische Zelle, wobei sie einen Lichtstrahl durchqueren. Das gestreute Licht wird mittels Photomultiplier oder Photodiode gemessen [114].

Die Lichtstreuung lässt sich als komplexen Prozess beschreiben. Die Wechselwirkungen des Lichts mit dem Partikel sind von seiner Größe, Gestalt und Oberflächeneigenschaften abhängig. Das Phänomen der Lichtstreuung kann durch die Mechanismen Rayleigh-Streuung, Mie-Streuung, Lichtbrechung und Reflexion beschrieben werden. Als Rayleigh-Streuung wird die elastische Streuung an Molekülen bezeichnet; die Frequenz der gestreuten Strahlung ist gleich der Frequenz der einfallenden Strahlung. Die Mie-Streuung beschreibt die Lichtstreuung an Partikeln, deren typische Dimension größer ist als die Wellenlänge des Lichtes. Im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung ist die Mie-Streuung unabhängig von der Wellenlänge. Sie besitzt eine Bevorzugung der Richtung (Vorwärts- oder Rückwärtsstreuung), wobei mit wachsendem Durchmesser des Partikels die Vorwärtsstreuung stärker zunimmt als die Rückwärtsstreuung. Unter Lichtbrechung versteht man die Richtungsänderung, die ein Lichtstrahl erfährt, wenn er im Winkel in ein optisch anderes Medium eintritt. Die Reflexion erklärt, warum elektromagnetische Strahlung beim Auftreffen auf die Grenzfläche zweier Medien, mehr oder weniger stark in das erste Medium zurückgeworfen wird [6]. Welcher dieser Mechanismen eintritt, ist abhängig vom Verhältnis der Partikelgröße d zu der Wellenlänge λ des emittierten Lichtes. Ist das Verhältnis kleiner 0.1 tritt überwiegend Rayleigh-Streuung auf. Liegt das Verhältnis zwischen 0.1 und 2 verzeichnet man Mie-Streuung. Oberhalb des Wertes 2 behauptet sich

Lichtbrechung durch die Partikel und Reflexion an ihrer Oberfläche. Das Maximum wird bei einem Verhältnis von 3.5 erreicht. Über 3.5 nimmt die Empfindlichkeit wieder ab, da sich das Verhältnis Oberfläche des Partikels zu Volumen verkleinert [116].

Der Einfluss des Streuwinkels – des Winkels, unter dem der messende Photomultiplier oder die Photodiode in Relation zum einfallenden Licht positioniert wird – wurde untersucht und kein idealer Winkel festgestellt [114]. Weitere Studien zum Einfluss des Streuwinkels belegen, dass der Winkel zwischen 20° und 160° liegen soll. Er soll kleiner als 180° sein, um Transmission zu vermeiden und größer als 90° um ein Maximum an Streulicht zu erzeugen [116].

Der Response des Detektors ist abhängig von den Partikeleigenschaften, die den Lichtstreumechanismus beeinflussen. Über einen großen Bereich der Probenkonzentration des Analyten kann die folgende Näherung für die Abhängigkeit der gemessenen Signalfläche A von der Masse m des Analyten aufgestellt werden [114,116]:

$$(3-5) \quad A = a \cdot m^b$$

Die Koeffizienten a und b sind von der Tröpfchen-/Partikelgröße, von der Konzentration und Art der Partikel, von den Flussraten des Gases und der mobilen Phase und der Verdampfungstemperatur abhängig. Der Wert für b variiert beim ELSD zwischen 0.9 und 1.8 und stimmt mit dem theoretisch errechneten Werten (0.66 bis 2.0) überein. Bei dem ELSD Modell SEDEX[®] 55 der Firma S.E.D.E.R.E. werden niedrige b -Werte für wässrige und wässrig-organische Eluenten, hohe b -Werte für nicht-wässrige Eluenten beobachtet. Die Gleichung 3-5 drückt eine nicht-lineare (exponentielle) Abhängigkeit der Signalfläche A von der Masse m des Analyten aus. Logarithmiert man die Gleichung 3-5, so erhält man die lineare Beziehung zwischen $\log A$ und $\log m$:

$$(3-6) \quad \log A = b \cdot \log m + \log a$$

Diese Beziehung wird für Quantifizierungen und Kalibrierfunktionen benutzt. Der Verdampfungs-Lichtstredetektor weist für Verbindungen ähnlicher Struktur einen fast äquivalenten Response auf. Für quantitative Analysen ist es jedoch erforderlich, für jede Verbindung eine Kalibrierfunktion zu erstellen.

Der ELSD wird mit steigender Tendenz in der Flüssigchromatographie, in der HPLC sowie in der überkritischen Fluidchromatographie als Detektor eingesetzt. Das Funktionsprinzip des Detektors limitiert den Nachweis leicht verdampfbarer Substanzen. Vergleiche mit DAD, RI-Detektor und Massenspektrometer verdeutlichen die Vorteile des ELSD. HPLC typische Solventien mit und ohne UV-Absorption können als mobile Phase für die chromatographische Trennung eingesetzt werden. Der ELSD detektiert in der optischen Zelle alle Analyte, die während des Verdampfungsprozesses entstehen. Für die chromatographische Trennung ist eine isokratische Arbeitsweise sowie eine Gradientenelution möglich. Die Kombination der HPLC mit der Massenspektrometrie stellt einen höheren apparativen Aufwand und Kosten im Vergleich zur Anwendung der HPLC-ELSD dar. Im Gegensatz zur massenselektiven Detektion liefert der ELSD keine zusätzlichen Strukturinformationen über den Analyten. Für die Quantifizierung sind Referenzsubstanzen erforderlich [114].

Die mobile Phase soll während der Verdampfung keine Ablagerungen in der Heizzone und in der optischen Zelle hinterlassen. Gut geeignet sind Solventien mit niedrigem Trockenrückstand. Für die Veränderung des pH-Wertes der mobilen Phase sind nur flüchtige Verbindungen wie Ammoniak, Essigsäure und Trifluoressigsäure anzuwenden. Gelöste anorganische Salze, Säuren und Basen erzeugen detektierbare Partikel und ergeben zusätzliche unerwünschte Signale im Chromatogramm.

Gradientenbetrieb führt zu einer geringfügigen Basislinienänderung, da sich die Verdampfungstemperatur der veränderten Zusammensetzung der mobilen Phase bei diesem Modell der SEDEX[®]-Reihe nicht anpasst. Neuere Modelle lassen eine Programmierung, wie z. B. die Erhöhung der Verdampfungstemperatur sowie die Veränderung des Empfindlichkeitsbereiches, zu. Drastische Änderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase innerhalb kurzer Zeit führen zu einer Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses.

3.4.2 Universelle Kopplung von Chromatographie und IR-Spektroskopie

Die Leistungsfähigkeit der HPLC erlaubt es, komplexe Substanzgemische in ihre Einzelbestandteile zu zerlegen. Die meisten Detektoren liefern keine oder nur wenige Strukturinformationen. Die IR-Spektroskopie ist für die Identifizierung von Substanzen aufgrund der verwertbaren Strukturinformationen gut geeignet [124].

Bei der online Kopplung der HPLC mit der IR-Spektroskopie verursachen einige Eluenten, wie Acetonitril, Methanol, 2-Propanol und Tetrahydrofuran, starke IR-Absorptionen, was die Substanzidentifizierung erschwert. Um diese Problematik zu umgehen, wird mit dem LC-Transform[®] Model 410 der Firma LabConnection der Analyt vom Eluenten getrennt. Das Prinzip beruht auf der Verdampfung der mobilen Phase und dem Sammeln des Analyten auf einer Oberfläche; im vorliegenden Fall auf einer Scheibe aus Germanium.

Das LC-Transform System verwendet eine pneumatische, lineare Kapillardüse, um die mobile Phase von den Analyten abzutrennen. Die Kapillare ist von einer Heizkammer umgeben. Das vorgeheizte Vernebelungsgas strömt in die Kammer an der Kapillare vorbei und gibt dabei thermische Energie ab, wodurch die mobile Phase erwärmt wird. Das Spray wird fokussiert und verlässt die Kapillare an der Spitze des Sprühkopfes. Die im Spray befindlichen Analyten schlagen sich auf der rotierenden Scheibe nieder, während der Eluent verdampft. Die resultierenden Spots sollen einen Durchmesser zwischen 0.5 und 1 mm aufweisen und werden auf einer Germanium-Scheibe gesammelt. Germanium wird aufgrund seiner IR-Transparenz als Sammelsystem verwendet, da im Anschluss an die Fraktionierung die Detektion mittels IR-Spektroskopie erfolgt. In Abhängigkeit von den chromatographischen Bedingungen arbeitet das System bei hohem Wassergehalt des Eluenten mit Flussraten bis 0.3 ml/min. Eluenten, die sich aus organischen Lösungsmitteln mit niedrigen Siedepunkten zusammensetzen, können mit Flussraten bis 1 ml/min gefahren werden [125]. In 3-6 ist das Funktionsprinzip des LC-Transform[®] schematisch abgebildet.

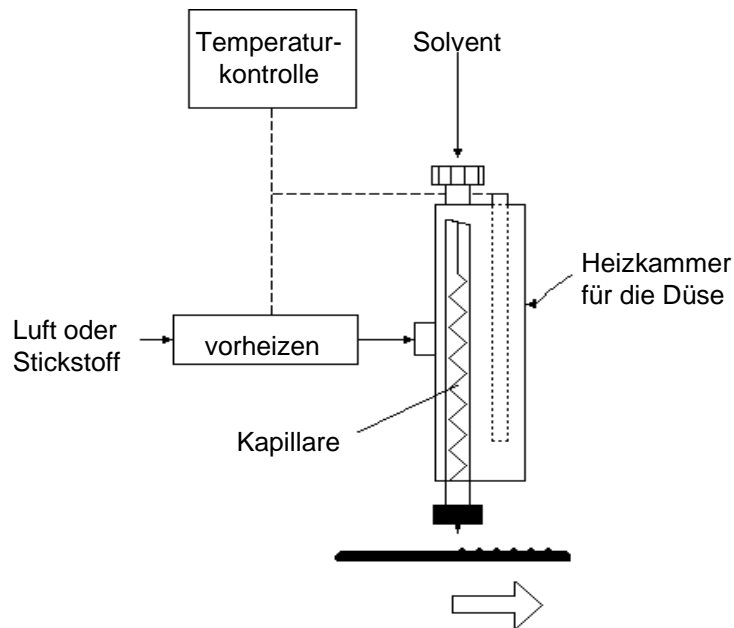


Abbildung 3-6.

Schematische Darstellung des Sprüh- und Sammelsystems des LC-Transform[®] Model 410 [125].

Zu dem LC-Transform[®] Model 410 gehört weiterhin ein Optik-Modul. Dieses Modul ist ein symmetrisches 7 Oberflächen-Reflexions-System, das in FTIR-Spektrometer (*Fourier Transformation Infrared*) eingesetzt werden kann. Die Spiegeloptik reduziert den einfallenden IR-Strahl auf ca. 2 mm Durchmesser und trifft auf die beschichtete Scheibe, wo von den Substanzflecken (Spots) Transmissionsspektren aufgenommen werden. Durch eine externe Rotationssteuerung kann die Germanium-Scheibe abgescannt werden. Man erhält die spektroskopischen Daten der entsprechenden Verbindungen oder eine kontinuierliche Spektrenserie über den gesamten chromatographischen Lauf. Nicht zu unterschätzen ist die Mindestmenge von ca. 5 µg pro Spot, um ein auswertbares IR-Spektrum zu erhalten [124].

Außer dem Einsatz des Optik-Moduls ist es möglich infrarotspektroskopische Messungen mit dem IR-Mikroskop durchzuführen. Das Mikroskop ist mit dem FTIR-Spektrometer gekoppelt. Es erlaubt die Positionierung und Maskierung geringer Probenmengen mit sichtbarem Licht und die Messung derselben im Durchlicht (Transmission) und Auflicht (Reflexion) in einer Einheit. Der unter Beobachtung definierte

Messfleck wird infrarotspektroskopisch untersucht. Die Beobachtung geschieht über ein 10x Binokular, das ein ähnlich einfaches Arbeiten wie mit einem Lichtmikroskop gestattet. Einzelne, ausgesuchte Spots lassen sich so leichter untersuchen [126].

Da das Funktionsprinzip des LC Transform[®] Interface dem des ELSD ähnlich ist, können leichtflüchtige und thermolabile Verbindungen nicht auf der Germanium-Scheibe gesammelt werden. Schwierigkeiten bereiten ebenso Flüssigkeiten, die sich auf der Oberfläche als Tropfen abscheiden und dabei verlaufen. Kristalline Substanzen sind gut geeignet für diese Art der Detektion. Für die Verdampfung der mobilen Phase können Temperaturen von 60° bis 120°C eingestellt werden. Bei Gradientenelutionen ist für das LC Transform[®] Interface ein entsprechender Temperaturgradient zu entwickeln. Bei hohen Verdampfungstemperaturen erwärmt sich die rotierende Scheibe sehr stark und muss gekühlt werden. Der Einsatz von anorganischen Salzen, Säuren und Basen als Modifier in der mobilen Phase bringt zusätzliche Signale mit sich. Sind die zu untersuchenden Substanzen sehr ähnlich, wie z. B. die Triglyceride, werden aufgrund der fast identischen spektroskopischen Daten kaum Unterschiede in der Struktur sichtbar.

3.4.3 Coulometrischer Detektor

Die coulometrische Detektion zählt zu den elektroanalytischen Techniken und basiert auf Vorgängen, die bei der Übertragung von elektrischer Ladung ablaufen. Bei elektroanalytischen Verfahren unterscheidet man zwischen Messprinzipien, die auf einer Eigenschaft der gesamten Lösung oder die auf Phänomenen an der Grenzfläche Elektrode/Lösung beruhen. Das Prinzip Grenzfläche Elektrode/Lösung unterteilt sich zusätzlich in Verfahren, die mit oder ohne Stoffumsatz ablaufen. Die Coulometrie gehört zu den Verfahren, die auf den Eigenschaften der Grenzfläche Elektrode/Lösung mit Stoffumsatz beruhen [127].

Coulometrische Verfahren messen die Ladungsmenge, die bei der Überführung des Analyten in eine andere Oxidationsstufe entstehen [10]. Die physikalisch-chemischen Grundlagen bilden die Faraday'schen Gesetze, die den Zusammenhang zwischen der umgesetzten Stoffmenge m und der geflossenen Ladungsmenge Q darstellen.

Die direkte Proportionalität zwischen beiden physikalischen Größen ist nur dann gewährleistet, wenn der Elektrolysevorgang quantitativ abläuft und keine Nebenreaktionen auftreten. Substanzen mit gleicher Ladung werden im Verhältnis ihrer Ionenäquivalente abgeschieden. Verknüpft man beide Gesetze, erhält man die Beziehung zwischen der geflossenen Ladung Q und der Masse m des elektrolytisch reagierenden Stoffes [128]:

$$(3-7) \quad m = \frac{M \cdot Q}{z \cdot F} \quad \text{oder:} \quad Q = I \cdot t = \frac{m}{M} zF$$

*m: Menge des umgesetzten Stoffes
M: molare Stoffmenge der Substanz
Q: verbrauchte Ladungsmenge in [C]
F: Faraday-Konstante (96485 C/mol)
z: Anzahl der elektrochemisch beteiligten Elektronen*

Bei coulometrischen Methoden liegt das Potential der Arbeitselektrode im Bereich des Diffusionsgrenzstromes des Analyten, so dass dessen Konzentration direkt an der Elektrodenoberfläche 0 ist. Gemäß dem ersten Fick'schen Gesetz ist der Stofftransport zur Elektrode und somit der elektrolytische Stoffumsatz proportional zur Konzentration c des Analyten in der Lösung. Die zeitliche Änderung der Konzentration muss proportional zur Konzentration sein [127]:

$$(3-8) \quad \frac{dc}{dt} = -k \cdot c$$

Integriert man von 0 bis zur Zeit t ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen der Anfangskonzentration c_0 und der Konzentration c_t zum Zeitpunkt t [127]:

$$(3-9) \quad c_t = c_0 \cdot e^{-kt}$$

Die Abhängigkeit des Stromflusses über die Zeit verläuft exponentiell. Da der Stromfluss proportional zum Stofftransport ist, kann ein analoger Zusammenhang zwischen dem Anfangsstrom I_0 und dem Strom I_t zum Zeitpunkt t formuliert werden [128]:

$$(3-10) \quad I_t = I_0 \cdot e^{-kt}$$

Die Konstante k hängt unter anderem vom Diffusionskoeffizienten der elektroaktiven Spezies D , vom Volumen der Lösung V , von der Diffusionsschichtdicke δ und der Oberfläche der Elektrode A ab [128]:

$$(3-11) \quad k = \frac{D \cdot A}{\delta \cdot V}$$

Zur Ermittlung der Ladung müsste bei Verfolgung der Strom-Zeit-Abhängigkeit bis zum vollständigen Abklingen auf den Strom 0 gewartet werden. Üblicherweise wird daher die logarithmische Abhängigkeit der Strom-Zeit-Kurve ausgewertet, aus der sich die Kalibrationskonstante k als Anstieg ermitteln lässt [128].

An der Elektrodenoberfläche kann die elektrochemische Umsetzung eines Analyten in drei Schritten beschrieben werden:

- Transport des Analyten aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche durch Migration (Wanderung im elektrischen Feld), Diffusion oder Konvektion;
- Durchtrittsreaktion, d. h. Übergang von Elektronen durch die Phasengrenzfläche Elektrode/Lösung;
- Abtransport der Produkte der elektrochemischen Reaktion von der Elektrodenoberfläche.

Elektroanalytische Verfahren hängen vorrangig vom Stofftransport der Analyten zur Elektrode ab; sofern der Durchtritt der Elektronen durch die Grenzfläche nicht gehemmt ist. Der Transport des Analyten stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Reaktion dar. Die Migration, eine Form des Transportes, wird durch Zugabe eines elektrochemisch inaktiven Elektrolyten (Leitsalz) im Überschuss unterdrückt. Das Leitsalz übernimmt in der Lösung den gesamten Stromtransport. Bei flüssigchromatographischen Methoden wird die Analysenlösung nicht gerührt und Diffusion bleibt als einziger Transportmechanismus übrig. Die Diffusionsvorgänge

liefern den wichtigsten Beitrag zum Stofftransport. Der Stromfluss wird durch die Diffusionseigenschaften der Analyte stark beeinflusst [127].

Der verwendete elektrochemische Detektor - der Coulochem[®] II der Firma ESA - ist ein Multielektroden-Detektor, der für die Detektion elektroaktiver Verbindungen im Eluenten von flüssigchromatographischen Systemen entwickelt wurde. Die Elektroden sind aus porösem Graphit hergestellt, um mit den üblichen mobilen Phasen der HPLC kompatibel zu sein [127,129]. Die Abbildung 3-7 zeigt einen Querschnitt durch die elektrochemischen Zellen. Die elektrochemischen Zellen bestehen aus je einer Arbeitselektrode, einer Bezugselektrode und einer Gegenelektrode. Ein Potentiostat gewährleistet die Potentialkonstanz der Arbeitselektrode gegenüber der Bezugselektrode.

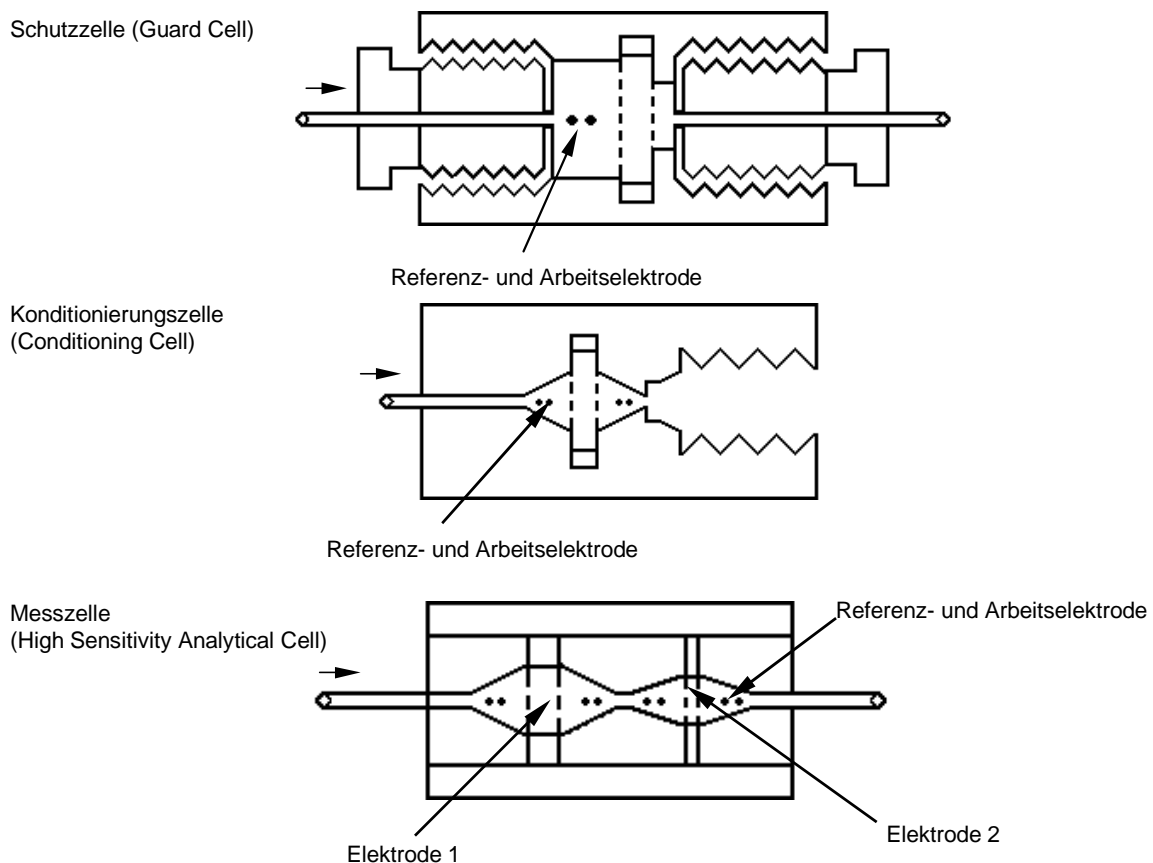


Abbildung 3-7.

Querschnitt durch die 3 elektrochemischen Zellen des Coulochem[®] II der Fa. ESA [129].

Die Aufgabe der Schutzzelle (Guard Cell) besteht in der Oxidation bzw. Reduktion elektroaktiver Spezies in der mobilen Phase, wie gelöstem Sauerstoff oder Metallionen aus dem Eluenten. Sie wird zwischen Pumpe und Injektor bzw. Autosampler mit Filtereinheiten eingebaut. Die Konditionierungszelle (Conditioning Cell) kann als dritte Elektrode für zusätzliche Selektivität verwendet werden. Die Messzelle (High Sensitivity Analytical Cell) verfügt über 2 Elektroden, wobei an der zweiten Elektrode entsprechend den zu untersuchenden Verbindungen eine positive oder negative Spannung angelegt wird. Die Elektrode 2 weist bei diesem Modell eine kleinere Oberfläche im Vergleich zur Elektrode 1 auf und ermöglicht eine empfindlichere Detektion. Diese beiden Zellen werden nach der chromatographischen Trennsäule in das System miteingebunden [129]. Durch die angelegte Spannung in der Messzelle werden alle Analyten, die die Zelle passieren, oxidiert oder reduziert. Dies führt bei hoher Matrixbelastung der Probe zu einer Verschmutzung der Elektrodenoberfläche, die irreversibel ist.

3.4.4 API-ES-Massenspektrometer (Atmospheric Pressure Ionisation – Electrospray)

Ein Massenspektrometer ist ein Apparat, der aus einer Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, diese nach Masse (m) und Ladung (z) trennt und schließlich ein Massenspektrum liefert [130]. Die entstehenden Massenspektren liefern Informationen über Einzelsubstanzen und Gemische. Bei Einzelsubstanzen erlauben sie Rückschlüsse auf die Struktur und bei Gemischen über deren qualitative und quantitative Zusammensetzung. Im Massenspektrum wird die Intensität als Maß für die Häufigkeit eines bestimmten Ions in Abhängigkeit vom Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) wiedergegeben [131].

Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle mit einem System zur Beschleunigung der Ionen, dem Trenn- oder Analysatorsystem und einem Detektor in Verbindung mit der Registrier- und Auswerteeinrichtung. Das verwendete API-ES-Massenspektrometer verfügt über einen Quadrupol als Trenn- bzw. Analysatorsystem. Das Einlasssystem des Massenspektrometers ermöglicht die Erzeugung der Ionen aus flüssigen Proben bei Atmosphärendruck. Bei

diesem Verfahren wird die in Lösung vorhandene Probe in einem starken elektrostatischen Feld versprüht und eine rasche und feine Zerstäubung der Flüssigkeit erreicht [132]. Die geladenen Ionen werden in die Kapillare hineingezogen und aufgrund eines Potentialgefälles in die Niederdruck-Region der Ionenoptik gelenkt. Am Ausgang der Kapillare existiert eine Fragmentierungszone, wo ein Ion auf unselektive Art in kleinere Ionen zerbrochen werden kann. Die Skimmer und der Octopol fokussieren die Ionen und transportieren sie zum Quadrupol. Dieser trennt die Ionen entsprechend ihres (m/z)-Verhältnisses auf und der sich anschließende Detektor zeichnet die getrennten Ionen nach Massenzahl und Häufigkeit in Form eines Massenspektrums auf [133]. Die Abbildung 3-8 zeigt den Aufbau des verwendeten massenselektiven Detektors der HP Serie 1100 der Firma Agilent Technology.

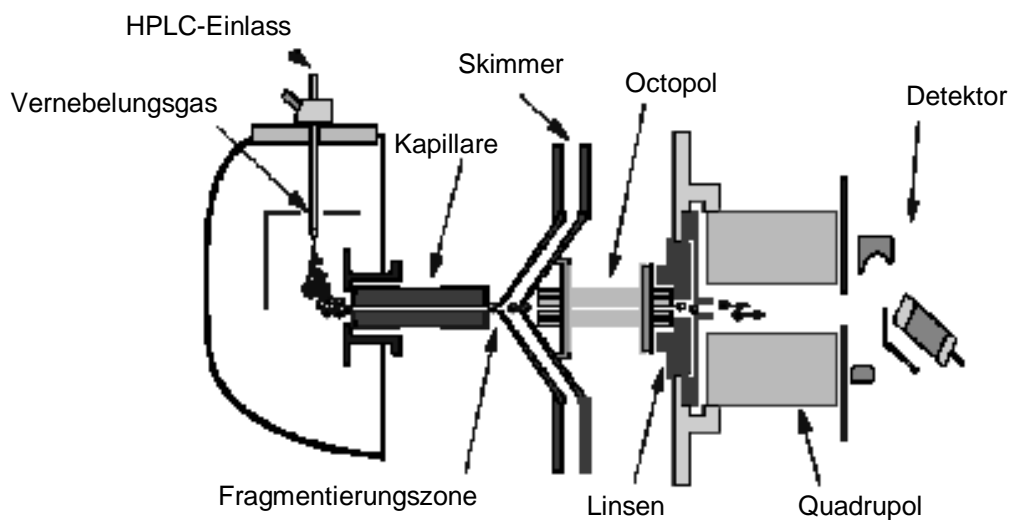


Abbildung 3-8.
Schematischer Aufbau der HP Serie 1100 [133].

Die Elektrospray-Ionisierung ist eine weiche, schonende Ionisierungstechnik, wo vereinfacht folgende Schritte ablaufen. Die gelöste Probe wird im elektrostatischen Feld versprüht und es bilden sich geladene Tröpfchen (1-3 μm Durchmesser). Das im Gegenstrom zugeführte Trockengas (Drying Gas) führt zum Lösungsmittelverlust der Tröpfchen und ist verbunden mit einer Zunahme der Oberflächenladung. Kleine hochgeladene Mikrotröpfchen spalten sich durch Coulomb-Explosionen ab. Die Überschussladungen sind auf der Oberfläche durch Coulomb-Abstoßung gleichmä-

ßig verteilt. Die Ladungsdichte nimmt mit abnehmendem Tröpfchendurchmesser zu. Die entstehenden Mikrotröpfchen können auch so klein sein, dass sie nur noch ein Analyt-Molekül plus viele Lösungsmittelmoleküle enthalten.

Bei der Elektrospray-Ionisierung erfolgt eine sehr effiziente Ionenbildung aus den gelösten Analyt-Molekülen. Es wird abgeschätzt, dass die ESI-Ionisierungswahrscheinlichkeit zwischen 0.01 und 0.1 liegt, dies ist ein sehr hoher Wert im Vergleich zu einer Ionisierungswahrscheinlichkeit von etwa $1 \cdot 10^{-4}$ bei der Elektronenstoß-Ionisation (EI). Die ESI-Nachweisgrenzen liegen bei Verwendung empfindlicher Techniken, wie beim Selected Ion Monitoring (SIM) für viele polare Verbindungen im fmol-Bereich. Die Bildung von Cluster-Ionen sowie von Fragment-Ionen lassen sich durch geeignete Quellen- und Interface-Bedingungen vollständig verhindern, so dass bei der Elektrospray-Ionisierung unterschiedlich geladene Molekül-Ionen entstehen. Die zu detektierenden Fragment-Ionen sind abhängig von den zu untersuchenden Verbindungen. Bei der Elektrospray-Ionisierung kommt das Fehlen der Fragment-Ionen dadurch zustande, dass die Probenmoleküle in der ESI-Quelle und dem anschließenden Interface unter Atmosphärendruck geringer thermischer Belastung ausgesetzt sind (ca. 300°C). Wichtig ist zusätzlich, dass den Probenmolekülen beim Desolvatisierungsprozess von den verdampfenden Lösungsmittelmolekülen thermische Energie entzogen wird. Die durch Elektrospray gebildeten freien Ionen werden auch als „kalte“ Ionen bezeichnet. Im Vergleich mit MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionisation*) und FAB (*fast atom bombardment*) ist ESI eindeutig eine schonendere Ionisierungsmethode [17,19]. In 3-9 ist die Ionenbildung der Elektrospray-Ionisierung schematisch abgebildet.

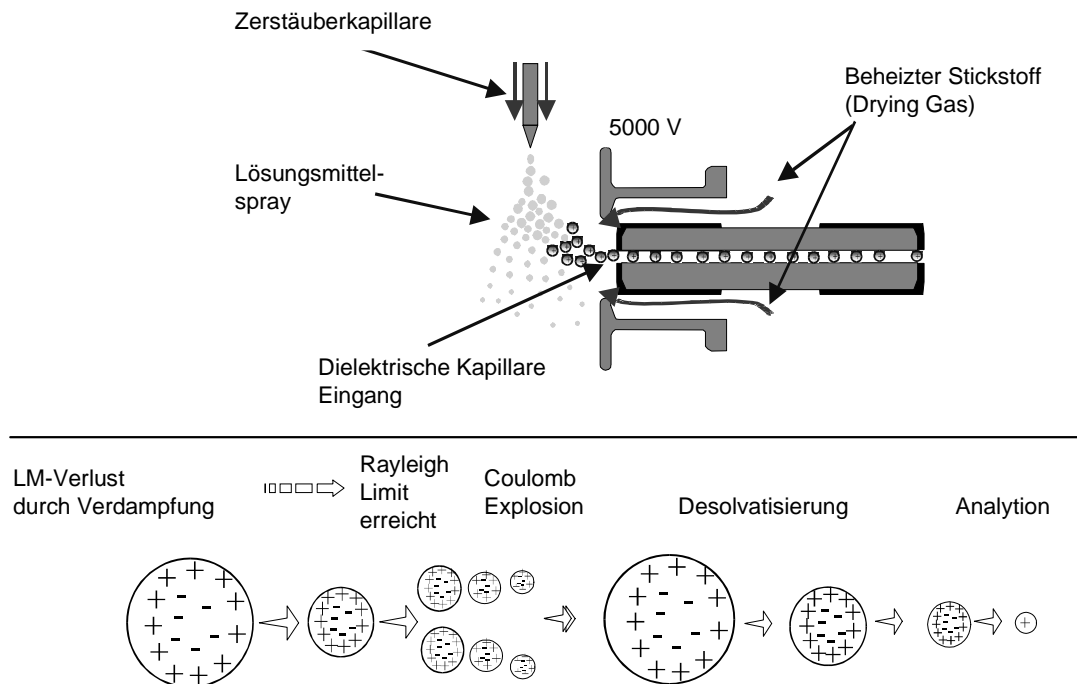


Abbildung 3-9.

Ionenbildung aus geladenen Aerosol-Tröpfchen bei der Elektrospray-Ionisierung [133].

Für die Ionisierung der Analyte sind in der Ionenquelle verschiedene Parameter einzustellen, die von der Zusammensetzung der mobilen Phase, der Flussrate und der Probe abhängen. Für die Methodenentwicklung ist die Optimierung der Parameter, wie Zerstäuberdruck, Trockengasfluss und -temperatur erforderlich. Werden die Spray-Bedingungen z. B. mit einem hohen Gasfluss eingestellt, so dass sich sehr schnell kleine Tröpfchen bilden, dann findet eine Verschiebung der Ladungsverteilung zu höheren Ladungszuständen, also kleineren m/z -Werten statt. Die Erhöhung des Gasflusses verkürzt die Lebensdauer der größeren und beschleunigt die Bildung sehr kleiner Tröpfchen. Aus den kleineren Tröpfchen werden aufgrund der höheren Oberflächenladung vorzugsweise Ionen mit höheren Ladungszuständen emittiert.

Quadrupol-Analysatoren sind die in Verbindung mit der ESI am häufigsten eingesetzten Massenanalysatoren. Der Quadrupol-Filter besteht aus vier parallel angeordneten Metallstäben, die an eine Gleichspannungsquelle (*direct current*) angeschlossen sind. An einem Paar liegt eine positive und am anderen Paar eine negative Gleichspannung U an. Die Gleichspannung wird zusätzlich von einer Wechsellspannung

nung (*alternating current*), $V_0 \cos \omega t$, überlagert. Die Frequenz $\omega/2\pi$ der Wechselspannung (MHz Bereich) verstärkt oder unterdrückt nacheinander das elektrische Feld und ist um 180° zwischen beiden Paaren phasenverschoben. Die Ionen beginnen in einer Ebene senkrecht zur Längsrichtung der Stäbe zu oszillieren und durchqueren den Quadrupolfilter. Beim Durchlaufen der Ionen in Längsrichtung werden Spannung und Frequenz so geändert, dass jeweils Ionen gleicher Masse auf einer bestimmten Bahn den Empfänger erreichen [18,128].

Die Stabilität der Flugbahn wird durch die Parameter A und Q bestimmt. A ist abhängig vom Potential der Gleichspannung und Q vom Wechselspannungspotential [134].

$$(3-12) \quad A = \frac{8eU}{mr_0^2\omega^2}$$

$$(3-13) \quad Q = \frac{4eV_0}{mr_0^2\omega^2}$$

m : Masse des Ions
 r_0 : Radius des Quadrupolfeldes

Aufgrund der Kompatibilität der heutigen ESI-Quellen in den verschiedenen Varianten kann ESI mit praktisch allen chromatographischen Techniken online gekoppelt werden. Eine Einschränkung besteht allerdings hinsichtlich der Zusammensetzung des Laufmittels. Inkompatibel ist ESI mit Puffersystemen, die eine hohe Konzentration an anorganischen Salzen beinhalten und beim Versprühen von Analyt-Molekülen aus vollständig aprotischen Lösungsmitteln. Um Überladungen in der Ionenquelle zu vermeiden, sollen kleine Flussraten verwendet werden. Für die Trennung werden chromatographische Säulen mit 2 mm Innendurchmesser und eine Flussrate von 0.2 ml/min oder 0.3 ml/min verwendet. Voraussetzung für die Detektion von Analyten ist ihre Ionisierung. Bei Substanzen, die sich schlecht ionisieren lassen, wie die Triglyceride, ist die Zugabe einer Ionisierungshilfe notwendig. In diesen Fällen wird Ammoniumacetat oder Natriumacetat in mikromolaren Mengen der mobilen Phase zugegeben. Im Massenspektrum können im positiven Ionisierungsmodus Ammonium-Addukte bzw. Natrium-Addukte als Quasi-Molekular-Ionen detektiert werden. Als Lösungsmittel für die LC/MS eignen sich besonders Methanol, *tert*-Butyl-methyl-ether,

Wasser und Acetonitril. Ein hoher Anteil (> 20%) an *tert*-Butyl-methyl-ether in der mobilen Phase wirkt sich negativ auf die Ionisierung aus. Aceton als Bestandteil des Eluenten unterdrückt die Ionisierung der Analyte. Das Lösungsmittel THF bildet Peroxide, die zusätzliche Signale im Massenspektrum erzeugen.

3.5 Photochemie

Die photochemischen Untersuchungen, die mit Ubichinon-50 durchgeführt wurden, sind aufgrund der Veränderung der Ausgangskonzentration dieser Verbindung in kosmetischen Formulierungen während der Stabilitätsprüfung in Betracht gezogen worden. Die Abnahme der Ausgangskonzentration bei lichtbedingter Lagerung sowie die durchgeführte Literaturrecherche verdeutlichten, dass sich diese Verbindung in Gegenwart von elektromagnetischer Strahlung verändert.

Absorbiert ein Atom oder Molekül elektromagnetische Strahlung führt dies zur Entstehung von elektronisch angeregten Atomen bzw. Molekülen. Diese gehen verschiedene Reaktionen ein, um vom energetisch höheren Zustand in den Grundzustand zu gelangen. Die überschüssige Energie kann in Form von Lumineszenz, Wärmestrahlung, Dissoziation, Ionisation, Isomerisierung, intramolekularer Reaktion sowie inter- oder intramolekularem Energietransfer abgegeben werden [135]. Bei photochemischen Umsetzungen entstehen vielfach die Isomere der Edukte. Bei den Isomerisierungen lassen sich die ablaufenden Reaktionen in Valenz-, Stellungs- und Stereo-Isomerisierungen unterteilen. Gut untersucht sind photochemische *cis-trans*-Isomerisierungen, die unter Rotation um eine C=C- (bzw. C=N- oder N=N-) Doppelbindung verlaufen. Im allgemeinen ist die *trans*-Form energieärmer (thermodynamisch stabiler) als die *cis*-Form. Um *trans*- in *cis*-Formen umzulagern, ist eine Isomerisierungsenergie erforderlich, die durch Wärme oder UV-Licht zugeführt wird [136].

Die Chinone unterziehen sich einer Vielzahl von photochemischen Reaktionen, wie Wasserstoffabstaltung, Oxetanbildung mit Alkenen, Cyclobutanbildung mit Ringdoppelbindungen, Cycloadditionen und Dimerisierungen [136].

3.5.1 Experimentelles

Das einfachste photochemische System besteht aus einem Strahler („Lampe“ oder auch Tageslicht) und der zu bestrahlenden Substanz. Für Teilgebiete der Photochemie sind Xenon-Lampen interessant, da ihre spektrale Energieverteilung der Global-

strahlung (Sonnen- und Himmelsstrahlung) ähnlich ist oder dieser mit einfachen Filterkombinationen angepasst werden kann. Die eingesetzte Bestrahlungsapparatur Suntest CPS+ der Firma Atlas verfügt über eine eingebaute Xenon-Lampe, um die Spektralverteilung des Sonnenlichts zu simulieren. Die Durchführung von Photodegradationsstudien ausgewählter kosmetischer Inhaltsstoffe mit simuliertem Sonnenlicht wird möglich [138].

Eine Apparatur für präparative photochemische Umsetzungen in flüssiger Phase sollte folgende Forderungen erfüllen:

1. eine optimale Ausnutzung der Lichtquelle;
2. eine intensive Umwälzung der zu bestrahlenden Lösung, wenn diese eine geringe Transmission hat. In diesem Fall wird die einfallende Strahlung in einer dünnen Oberflächenschicht der Lösung total absorbiert, wobei hohe lokale Konzentrationen der photochemischen Zwischenprodukte entstehen und unerwünschte Nebenreaktionen begünstigt werden. Außerdem wird ein großer Teil der Lösung von der Strahlung abgeschirmt;
3. und eine ausreichende Kühlung der zu bestrahlenden Lösung [137].

Die Bestrahlungsapparatur Suntest CPS+ ist so konstruiert, dass die Lichtquelle optimal ausgenutzt wird. Der Probenraum ist zu diesem Zweck mit einem Reflektor ausgekleidet und eine Kühlung der zu bestrahlenden Proben wird ebenfalls gewährt.

Die Abbildung 3-10 zeigt die Spektralverteilung der Xenon-Lampe des Suntest CPS+ der Firma Atlas im ultravioletten Bereich bei verschiedenen Bestrahlungsintensitäten [138].

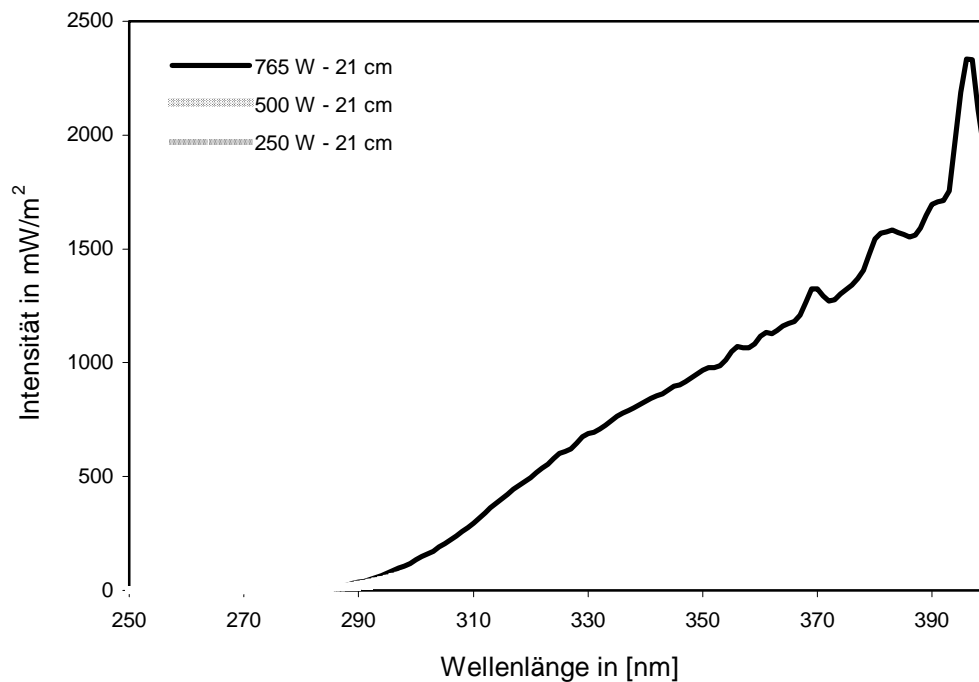


Abbildung 3-10.

Auftragung der Wellenlänge (250 - 400 nm) gegen die Intensität der emittierten Strahlung der Xenon-Lampe in mW/m².

3.5.2 Literaturbeschriebene photochemische Studien von Ubichinon-50

Die Veränderung von Ubichinon-50 durch Lichteinfluss wird in verschiedenen Studien belegt [139-144].

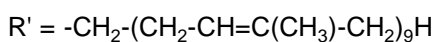
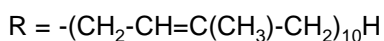
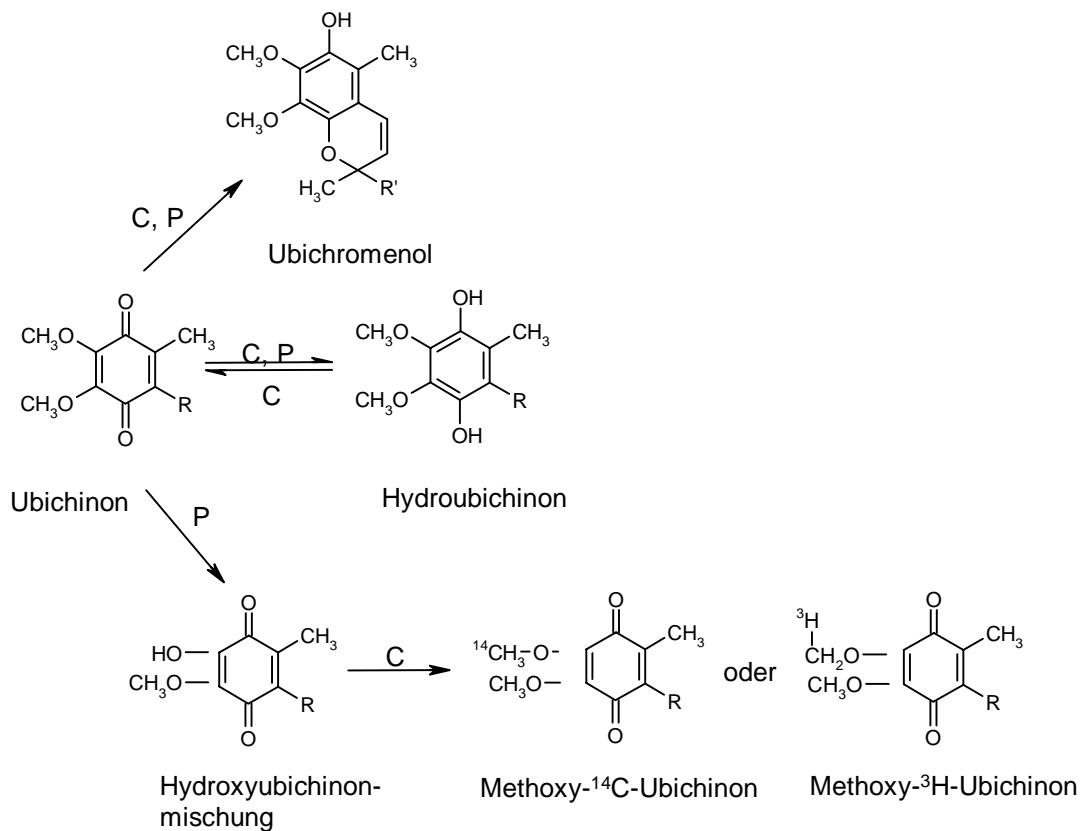
Die Stabilität und Photostabilität von Ubichinon-50 bei verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten wurde von Matsuda und Masahara [139], Kommuru et al. [140] und Lutka und Pawlaczyk [141] untersucht. Matsuda und Masahara bestrahlten festes Ubichinon-50 bei normalen und erhöhten Temperaturen und bestimmten die Farbänderung der kristallinen Proben colorimetrisch und mittels Absorptionsmessungen. Aufgrund der Farbreaktion von Ubichinon-50 ist es möglich, qualitativ die Photostabilität von pharmazeutischen Formulierungen abzuschätzen [139]. Kommuru et al. untersuchten den Einfluss von Antioxidantien auf die Stabilität von Ubichinon-50, da ohne Stabilisatoren ein hohes Maß an Photodegradation zwischen 45° und 55°C beobachtet wurde. Die Mischungen von Ascorbinsäure (5 %) und EDTA

(0.1 %) in Kombination mit Ubichinon-50 erzielten einen besseren Schutz als die verwendeten phenolischen Antioxidantien BHA, BHT und PG [140]. Lutka und Pawlaczyk untersuchten neben dem Photoabbau auch die Stabilität bei der Lagerung von Ubichinon-50. Die Verbindung wurde bei 50°C über 3 Monate im Dunkeln gelagert und erwies sich als stabil [141].

Neben den Stabilsierungsversuchen von Kommuru et al. [140] führten Lutka und Pawlaczyk [141] weitere Studien durch, die klären sollten, ob Ubichinon-50 mit seinen physikalischen Mischungen oder Einschlussverbindungen mit Cyclodextrinen eine Veränderung bei Lichteinfluss erfährt. Als Cyclodextrine wurden das γ -Cyclodextrin (γ -CD) und das Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) verwendet. Die Änderung der Ubichinon-50 Konzentration während der Bestrahlung (monochromatisch und polychromatisch) und Lagerung (50° bis 100°C) erfolgte mit UV- und IR-Spektroskopie. Mit polychromatischem Licht ist ein schnellerer Abbau von Ubichinon-50 und den hergestellten Verbindungen im Vergleich zum monochromatischen Licht zu verzeichnen. Die Ubichinon-Cyclodextrin-Komplexe verbessern die Stabilität von Ubichinon-50, da für einen Abbau die 2-3fache Energie benötigt wird. Weitere stabilisierende Effekte wurden von Matsuda und Teraoka [142] bei photodegradativen Untersuchungen an mikroverkapseltem Ubichinon-50 mit den lipophilen Vitaminen Tocopherol, Tocopherylacetat und Phytonadion beschrieben. Durch die Zugabe von Tocopherylacetat wurde keine ausreichende Hemmung der photodegradativen Aktivität von Ubichinon-50 beobachtet. Wogegen durch die Zugabe von Phytonadion oder Tocopherol eine Stabilisierung erreicht wurde. Die analytischen Methoden Differentialthermoanalyse, HPLC mit UV-Absorptions-Detektion, Lichtabsorptions- und Transmissionsmessungen sowie die Elektronenmikroskopie kamen zum Einsatz.

Die Publikationen [139-142] beschrieben nur die Ergebnisse des Photoabbaus von Ubichinon-50. Auf eine Charakterisierung oder Identifizierung von möglichen Abbauprodukten wurde verzichtet. Die Reaktionskinetik des Photoabbaus von Ubichinon-50 verläuft erster Ordnung. Die Aktivierungsenergie lässt sich mittels der Arrheniusgleichung berechnen und die Reaktionskonstante erster Ordnung wurde aus den Änderungen der Intensität verschiedener charakteristischer IR-Banden (2970 cm^{-1} , 2860 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} und 1610 cm^{-1}) ermittelt [141].

Cheng und Casida [143] ermöglichten die Charakterisierung photochemischer Abbauprodukte aufgrund der Verfügbarkeit von Methoxy-markierten Ubichinonen (^{14}C - oder ^3H -Methoxy-Ubichinon-50). Die markierten Verbindungen erlauben die quantitative Durchführung photochemischer Reaktionen unter Berücksichtigung des Einflusses von Luft-, Sauerstoff- oder Stickstoffatmosphäre in alkoholischer Lösung. Bei Bestrahlung von Ubichinon-50 in alkoholischer Lösung verändert sich das Molekül zu einem 2- und 3-Hydroxyubichinon durch O-Demethylierung, zu einem Hydroubichinon durch Reduktion und zu einem Ubichromenol-Derivat durch Cyclisierung. Die Abbildung 3-11 zeigt mögliche chemische und photochemische Reaktionsmechanismen, die Aufschluss über die Photodegradation geben.



C = Chemische Reaktion

P = Photochemische Reaktion

Abbildung 3-11.

Chemische und Photochemische Reaktionsmöglichkeiten von der Ubichinon-50 [143].

Für die Charakterisierung und Identifizierung der verschiedenen Verbindungen wurde die UV- und IR-Spektroskopie eingesetzt. Die Trennung und Reinigung der Photolyseprodukte erfolgte durch TLC. Nach Extraktion und Kristallisation der getrennten Photolyseprodukte wurde zusätzlich eine Schmelzpunktbestimmung durchgeführt. In Abhängigkeit von der verwendeten Atmosphäre findet man nach der Bestrahlung eine unterschiedliche Zusammensetzung der Photolyseprodukte [143].

Für die Untersuchung von Ubichinon-Radikalen setzten Burie et al. [144] die FTIR-Spektroskopie ein. Eine essentielle Rolle im Radikalbildungsprozess spielt die isoprenoide Seitenkette. Beide Carbonylfunktionen wurden mit ^{18}O - und ^{13}C -markiert, um die Radikalbildung zu erforschen. Ultraviolette Bestrahlung bei niedrigen Temperaturen führte zur Bildung eines protonierten Semichinon-Radikals. Auf der Grundlage spektroskopischer Daten (FTIR- und Raman-Spektroskopie) ist die C-O Deformationsschwingung des protonierten Semichinon-Radikals für Ubichinone, Naphtochinone und Plastochinone bei 1518 cm^{-1} , 1536 cm^{-1} und bei 1504 cm^{-1} beobachtbar [144]. Die Bildung des Semichinon-Radikals ist wichtig für die Reduktion vom Ubichinon zum Hydroubichinon, da Hydroubichinon- und Ubichromenol-Derivate wahrscheinlich über einen allgemeinen Übergangszustand geformt werden [143]. Die Reduktion vom Ubichinon zum Hydroubichinon spielt in der mitochondrialen Atmungskette eine entscheidende Rolle, da Ubichinon-50 als Sammelstelle für Reduktionsäquivalente und als Elektronenüberträger fungiert [35].

4 Entwicklung flüssigchromatographischer Methoden für die Bestimmung neutraler Lipide

Zu den neutralen Lipiden zählen Acylglycerine (Neutralfette), Ester, Fettsäuren, Alkohole, Sterole und Sterylester. Die Entwicklung von chromatographischen Methoden unterstützen Einzel-Standards, Standard-Gemische und kosmetische Rohstoffe. Die allgemeinen Daten der verwendeten Standards werden im Kapitel 9 beschrieben.

4.1 Charakterisierung von Acylglycerinen

Die konventionelle Art und Weise zur Bestimmung von Acylglycerinen in kosmetischen Mitteln besteht in der präparativen, flüssig-chromatographischen Vortrennung (Kartusche oder Säule) des kosmetischen Mittels und anschließender IR-spektroskopischer Aufnahmen der einzelnen Fraktionen. IR-Spektren können einen qualitativen und halbquantitativen Aufschluss über Inhaltsstoffe von kosmetischen Mitteln geben. Die quantitative Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe ist schwierig, da die Fraktionen meist eine Vielzahl von Einzelsubstanzen enthalten. Eine weitere Möglichkeit für die Quantifizierung von Acylglycerinen ist die Gaschromatographie. Da es sich bei den Triglyceriden um nichtflüchtige Verbindungen handelt, ist es erforderlich, diese durch Hydrolyse und Methylierung in flüchtige Derivate zu überführen.

Die Entwicklung von HPLC-Methoden soll eine direkte quantitative Bestimmung von Acylglycerinen in kosmetischen Formulierungen ohne intensive Probenvorbereitung ermöglichen.

4.1.1 Kopplung von HPLC mit ELSD

Der Einsatz der HPLC-DAD-Technik ist limitiert aufgrund der geringen UV-Absorption der Acylglycerine, die meist unter 210 nm liegt. Die Kopplung der HPLC mit dem Verdampfungs-Lichtstreuendetektor ist für Substanzen geeignet, die einen geringeren Dampfdruck als die mobile Phase aufweisen, wie die Acylglycerine. Sie sind bei Raumtemperatur feste oder flüssige Verbindungen. In der Literatur [12,67,93,118]

sind unterschiedliche Trennmechanismen für die Charakterisierung von Triglyceriden mit HPLC-ELSD dargestellt.

Die Triglyceride stellen einen bedeutenden Teil der Acylglycerine dar. Durch die Kombination der veresterten Fettsäuren in den Triglyceriden existiert eine Vielzahl von Verbindungen. Neben Triglyceriden, die dreimal die gleiche Fettsäure (homogen) enthalten, gibt es gemischte (heterogen) Triglyceride. Die verwendeten Standards sind tabellarisch im Kapitel 9.4.1 aufgeführt. Die Stammlösungen der Standards wurden in Abhängigkeit von der Polarität in Aceton bzw. in einem Hexan/Ethanol-Gemisch hergestellt.

Für die Trennung der Triglyceride wird eine Reversed-Phase Trennphase (RP) als stationäre Phase verwendet. Das RP-System ist im Gegensatz zum üblichen Normal-Phase-Adsorptions-System (NP) unpolar und die mobile Phase polar. Die Trennsäule LiChrospher-100 RP-18 wurde aufgrund ihrer chemisch gebundenen Octadecyl-Gruppen ausgewählt. Die mobile Phase setzt sich aus Acetonitril und Aceton zusammen. Der Anteil von Aceton nimmt während des chromatographischen Laufes zu. Die Elutionskraft der mobilen Phase wird größer. Die Flussrate der mobilen Phase beträgt 1 ml/min. Nach der chromatographischen Trennung werden die Substanzen mit dem Verdampfungs-Lichtstredetektor detektiert. Aceton und Acetonitril sind niedrig siedende Lösungsmittel und gewährleisten die Einstellung einer niedrigen Verdampfungstemperatur am Detektor. Die Geräteparameter sowie die Flussrate der mobilen Phase wurden optimiert, um eine maximale Signalintensität zu erreichen. Dieses Maximum wird bei einer Verdampfungstemperatur von 35°C und einem Druck des Vernebelungsgases von 1.5 bar erreicht, wenn die Förderrate der mobilen Phase 1 ml/min beträgt. Für die Bestimmung unterschiedlicher Substanzkonzentrationen kann zwischen den Bereichen (Gain) 1 und 12 gewählt werden. Diese Bereiche sind nicht proportional zu einander. Für die Methodenentwicklung wurde Gain 10 gewählt. In diesem Bereich ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Rauschpegel) gering und die Substanzen sind im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 1 mg/ml detektierbar. Die experimentellen Daten der HPLC-ELSD-Methode sind im Abschnitt 9.1.1 niedergelegt. Der Response des Detektors ist abhängig von den zu detektierenden Substanzen und wurde im Kapitel 3.4.1 erläutert. Die Signalfläche A

wird zur Masse m der Analyten durch eine nicht-lineare (exponentielle) Abhängigkeit ausgedrückt. Aus diesem Grund ist für die Kalibrierung eine logarithmische Auftragung der Konzentration ($\log c$) gegen die Signalfäche ($\log A$) notwendig. Die entstehenden Kalibrierfunktionen der Verbindungen im Diagramm sind linear. Mit Hilfe der linearen Regression lassen sich Geradengleichungen berechnen.

Die Elution beruht auf stattfindenden Wechselwirkungen zwischen den zu trennenden Substanzen, der stationären sowie mobilen Phase. Unpolare Substanzen werden bei der RP-Chromatographie stärker zurückgehalten als polare. Die Abbildung 4-1 zeigt die Trennung des Standard-Mix 1, das sich anteilig aus je 20 % (w/w) Tricaprylin, Tricaprin, Trilaurin, Trimyristin und Tripalmitin zusammensetzt. Die einsäurigen Triglyceride eluieren mit zunehmender Anzahl der Kohlenstoffatome in den Fettsäureketten.

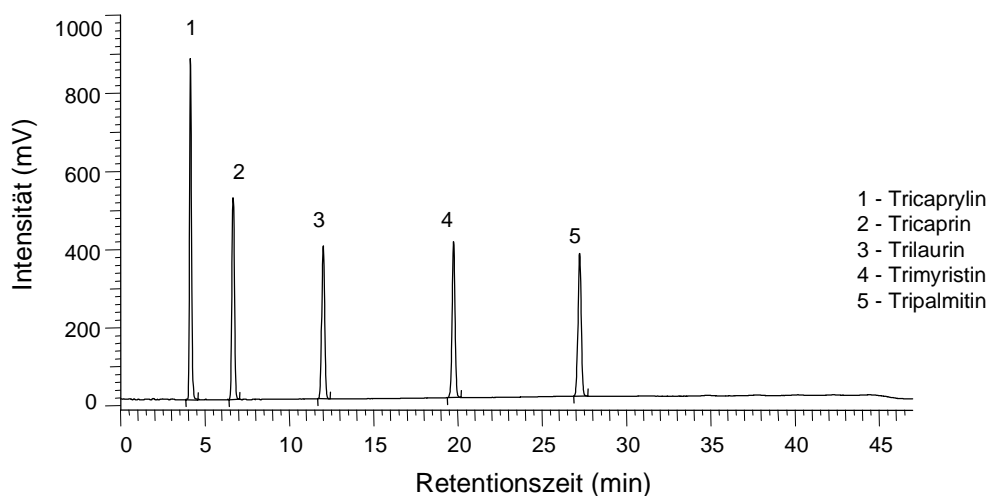


Abbildung 4-1.

Chromatographische Trennung der Standard-Mischung mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.487 mg/ml.

Im Kapitel 9.2.1 sind die Bruttorententionszeiten, die Totzeit und die Konzentration mit entsprechender Signalfäche der Standards tabellarisch aufgeführt.

Mit zunehmender Anzahl der Doppelbindung im Molekül steigt die Polarität der Verbindung. Unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen eluieren zuerst die Substanzen, die die höchste Anzahl an Doppelbindungen im Molekül aufweisen.

Der chromatographische Lauf des Standard-Mix 3, bestehend aus je 25 % (w/w) Tristearin, Triolein, Trilinolein und Trilinolenin, zeigt das erwartete Elutionsprofil und ist in 4-2 abgebildet.

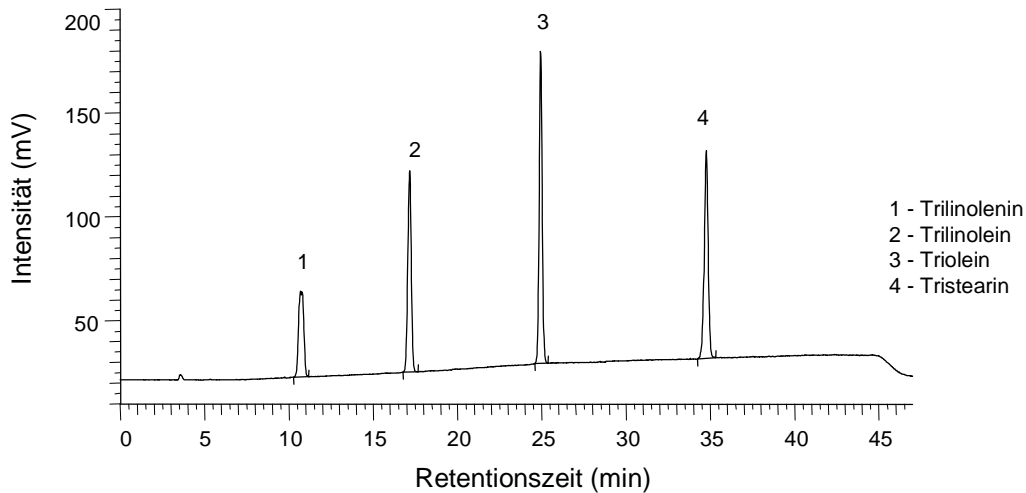
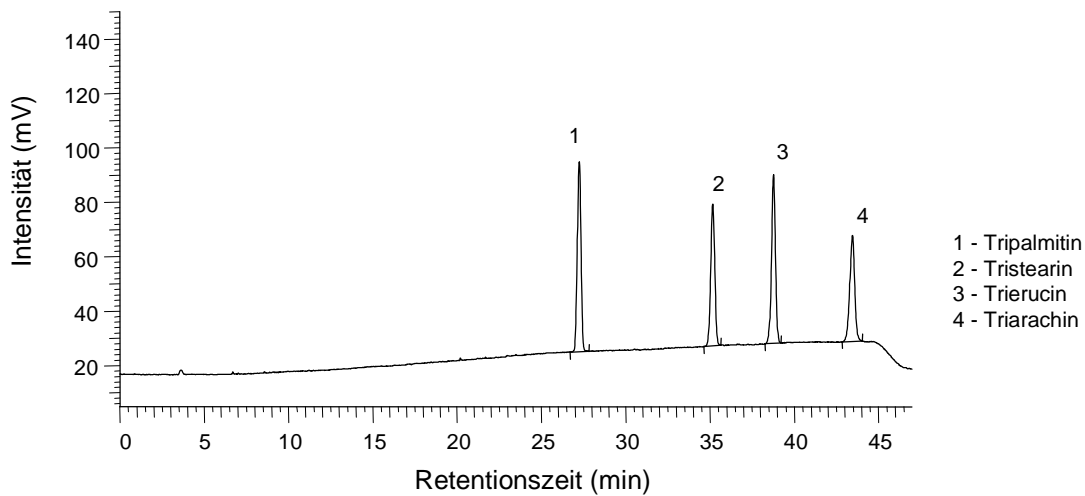


Abbildung 4-2.

Chromatographische Trennung der Triglycerid-Mischung mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.465 mg/ml.

Eine Triglycerid-Mischung, die aus gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren mit mehr als 16 Kohlenstoffatomen pro Fettsäure besteht, wurde ausgewählt, um die Grenzen des Elutionssystems zu ermitteln. Der Gradientenverlauf ermöglicht die Elution von Triglyceriden, die mit Fettsäuren verestert sind, die bis zu 22 C-Atome pro Fettsäure enthalten. Bei einer Kettenlänge von 22 C-Atomen pro Fettsäure muss jede Fettsäure eine Doppelbindung enthalten, um von der Säule eluiert zu werden. Das Triglycerid Tribehenin setzt sich aus drei gesättigten Fettsäuren mit je 22 C-Atomen zusammen. Diese Verbindung wird auf der Säule zurückgehalten. Die Summe der C-Atome der gesättigten Fettsäuren darf die Zahl 60 nicht überschreiten, wenn eine Elution erfolgen soll. Die Abbildung 4-3 verdeutlicht das chromatographische Verhalten anhand des Standard-Mixes 2, das sich anteilig aus je 20 % (w/w) Tripalmitin, Tristearin, Triarachin, Tribehenin und Trierucin zusammensetzt. Für solche Komponenten, wie Tribehenin muss die Elutionskraft der mobilen Phase verstärkt und/oder eine RP-Trennphase eingesetzt werden, die über eine polarere Oberfläche verfügt als die LiChrospher 100 RP-18, 5 μm . Beispiele hierfür wären kürzere Alkylketten chemisch gebunden auf Kieselgeloberflächen.

**Abbildung 4-3.**

Chromatographische Trennung der Triglycerid-Mischung mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.481 mg/ml.

Neben den Standard-Mischungen wurden Einzel-Standards chromatographisch untersucht, um den Zusammenhang zwischen der Polarität der Verbindungen und dem Elutionsverhalten zu verdeutlichen. Die Polarität der Triglyceride ist abhängig von der Anzahl der C-Atome der veresterten Fettsäuren, der Anzahl der Doppelbindungen und dem Vorhandensein von funktionellen Gruppen. Als Beispiele lassen sich die *cis,cis,cis*-9,12,15-Octadecatriensäure (Linolensäure) und die 12-Hydroxy-*cis*-9-octadecensäure (Ricinolsäure) nennen, die im Vergleich zu Octadecansäure (Stearinsäure) polarer sind und zu niedrigen Retentionszeiten eluieren.

Die Standards wurden chromatographisch untersucht und sind im Kapitel 9.3.1 abgebildet. Aus den Standards wurden 8 ausgewählt und ein Gemisch erstellt. Die Konzentrationen der Verbindungen in der Mischung schwankten zwischen 0.075 mg/ml für 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol und 0.192 mg/ml für 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol. Die Gesamtkonzentration der Lösung belief sich auf 0.8958 mg/ml. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Die Abbildung 4-4 zeigt diese Mischung.

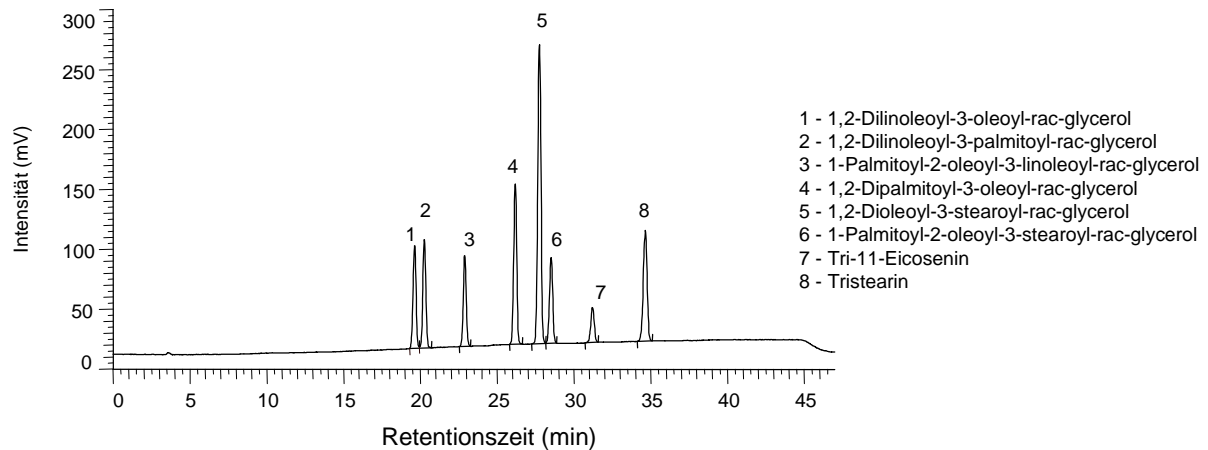


Abbildung 4-4.

Chromatographische Trennung der Triglycerid-Mischung mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm).

Die Triglyceride 1 und 2 sowie 5 und 6 eluieren in Folge. Die Verbindungen sind basisliniengetrennt. Die Substanzen 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol und 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol sowie 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol unterscheiden sich jeweils in einer veresterten Fettsäure. Statt der Ölsäure ist in Verbindung 2 und 6 die Palmitinsäure mit Glycerin verestert. Die Ölsäure weist eine Doppelbindung mehr auf, hat dafür aber eine um 2 CH_2 -Einheiten längere Kohlenstoffkette als die Palmitinsäure. Die Ölsäure ist polarer als die Palmitinsäure und eluiert vor der Palmitinsäure. Bei Triglyceriden, die sich nur in einer veresterten Fettsäure unterscheiden, eluiert immer die Substanz früher, die eine Doppelbindung mehr im Molekül aufweist, auch wenn die C-Kette um 2 CH_2 -Einheiten länger ist.

Für die Untersuchung der Trennleistung der stationären Phase wurde die abgebildete Standard-Mischung mit verschiedenen Konzentrationen auf die Säule gegeben. Bei den ersten 5 Injektionen lagen die aufgegebenen Substanzmengen zwischen 0.75 μg und 1.92 μg je Einzelsubstanz. Die Gesamtmenge der Triglycerid-Mischung betrug 8.958 μg (0.8958 mg/ml). Die erhaltenen Chromatogramme weisen ein optimales Trennergebnis auch nach der 5. Injektion auf. Bei den folgenden 3 Injektionen wurde die Konzentration der Substanzen verdoppelt; die Gesamtmenge betrug 17.916 μg (1.7916 mg/ml). Die erhaltenen Chromatogramme zeigen eine Intensitätserhöhung und eine Peakverbreiterung der Signale. Die Signale der Substanzen

1 und 2 sind nicht mehr basisliniengetrennt. Bei den letzten 3 Injektionen wird die Konzentration im Vergleich zur Ersten verfünffacht. Die aufgegebene Gesamtmenge betrug 44.79 µg (4.479 mg/ml). Diese Menge führte zu einer Überladung der stationären Phase und die Chromatogramme zeigen neben einer Intensitätserhöhung, eine Peakverbreiterung und eine Verdopplung der Signale. Die Signale sind nicht mehr basisliniengetrennt; teilweise bilden mehrere Peaks ein Signal. Eine Quantifizierung ist nicht mehr möglich. Die Trennleistung der Trennphase verringert sich bei der Aufgabe einer Gesamtmenge von mehr als 15 µg (1.5 mg/ml) Substanzgemisch pro Injektion. Eine optimale Trennleistung der Trennphase LiChropsher 100 RP-18 wurde bis 12 µg (1.2 mg/ml) Substanzaufgabe pro Injektion für ein Gemisch aus 8 Verbindungen erreicht. Zwischen 12 und 35 µg (1.2 - 3.5 mg/ml) Substanzmenge pro Injektion für das verwendete Gemisch verringerte sich die Auflösung einzelner Signale wie von Signal 1 und 2 sowie 5 und 6. Gibt man über 35 µg (3.5 mg/ml) Substanz auf die Säule auf, ist diese überladen.

Das Elutionsprofil für Standard-Triglyceride unter den gewählten chromatographischen Bedingungen stellt sich wie folgt dar:

Tricaprylin < Tricaprin < Trilinolenin < Trilaurin < 1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol < Trilinolein < 1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol < Tripalmitolein < Trimyristin < 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol < 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol < 1-Lauroyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol = 1,2-Dimyristoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < Triolein < 1,2-Dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol < 1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < Tripalmitin < 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol < 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol < Tri-11-Eicosenin < Tristearin < Trierucin < Triarachin.

Für die Elutionsfolge der Triglyceride ist die Summe der C-Atome der Fettsäuren und die Anzahl der Doppelbindungen ausschlaggebend. Zählt man die C-Atome und die Doppelbindungen zusammen, ergibt sich in Zahlen ausgedrückt folgendes Elutionsprofil:

24:0 < 30:0 < 54:9 < 36:0 < 38:0 < 54:6 < 40:0 < 48:3 < 42:0 < 54:5 < 52:4 < 46:1 =
46:1 < 52:3 < 54:3 < 52:2 < 50:1 < 48:0 < 54:2 < 52:1 < 60:3 < 54:0 < 66:3 < 60:0.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Triglyceride ist abhängig von den Oberflächeneigenschaften, der Gestalt und Größe der zu detektierenden Analyte. Verbindungen mit hohem Molekulargewicht und niedrigem Dampfdruck lassen sich besser detektieren als kleine, leicht verdampfbare Substanzen. Alle untersuchten Triglyceride ließen sich im Empfindlichkeitsbereich 10 mit einer Konzentration von 0.05 mg/ml bis 0.5 mg/ml bei einem Injektionsvolumen von 10 µl detektieren. Dies entspricht 0.5 µg bis 5.0 µg aufgegebene Substanz auf die stationäre Phase.

4.1.2 Kopplung von LC mit MS

Die Kopplung von Flüssigchromatographie mit ESI-Massenspektrometrie führt zu zusätzlichen Strukturinformationen der zu detektierenden Substanzen. Voraussetzung für eine massenselektive Detektion ist die Ionisierbarkeit der Analyte. Für die LC/MS ist nur dann eine Basislinientrennung der Signale notwendig, wenn es sich um massengleiche Verbindungen handelt. Die Substanzen werden anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) bestimmt. Die für das HPLC-ELSD-System eingesetzten chromatographischen Bedingungen sind nicht auf das LC/MS übertragbar. Die verwendete mobile Phase, bestehend aus Acetonitril und Aceton, unterdrückt die Ionenbildung in der Ionenquelle des Massenspektrometers.

In der LC/MS werden zunehmend „microbore“ Säulen eingesetzt. Diese miniaturisierten Säulen besitzen einen Innendurchmesser von maximal 2 mm und eine Länge von 30 mm bis 125 mm und reduzieren die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase auf 0.1 bis 0.3 ml/min. Die niedrigen Flussraten verhindern eine Überladung in der Ionenquelle und ermöglichen die optimale Ionisierung der Moleküle. Die Analysenzeit verringert sich bei gleichbleibender Trennleistung und Lösungsmittel werden eingespart. Für die Trennung der Standards werden 2 RP-Phasen getestet; die GROM-SIL Octyl-5 CP, 5 µm mit 125*2 mm und die LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm mit 125*2 mm. Bei beiden stationären Phasen handelt es sich um „endcapped“ Phasen. Neben den C8-Phasen wurden Säulen mit C18- und C4-Material getestet.

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Methanol und *tert*-Butyl-methyl-ether eingesetzt. Dem Methanol wurde in micromolaren Mengen Ammoniumacetat bzw. Natriumacetat zugegeben, um die Ionisierbarkeit der zu untersuchenden Triglyceride zu verbessern. Das Massenspektrum zeigte im positiven Modus als Quasi-Molekularionen die Ammonium- bzw. die Natrium-Addukte je nach Wahl der Ionisierungshilfe. Natrium- und Kalium-Addukte sind in geringen Mengen im Massenspektrum immer existent, da Natrium- und Kalium-Ionen in allen Lösungsmitteln in Spuren vorkommen. Soll die Bildung von Ammonium-Addukten unterdrückt werden, setzt man Natrium-Ionen dem Eluenten zu. Mit negativer Ionisierung waren die Triglyceride nicht nachweisbar. Die Flussrate lag bei 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ oder 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Für die Methodentwicklung wurde die isokratische Arbeitsweise mit einem Methanolanteil von 95 % und 92 % bevorzugt. Wählt man den Anteil von *tert*-Butyl-methyl-ether im Eluenten zu hoch, unterdrückt dieses Lösungsmittel die Ionisierbarkeit der Triglyceride in der Ionenquelle. Die Empfindlichkeit verschlechtert sich, da nicht genügend Moleküle in Ionen überführt werden können. Für eine C18-Phase und einen Eluenten, der sich hauptsächlich aus Methanol zusammensetzt, ist die Elutionskraft zu gering und die Wechselwirkungen zwischen Substanzen und stationärer Phase zu stark, um die Triglyceride zu eluieren. Die C4-Phase und der Eluent ermöglichen keine ausreichenden Wechselwirkungen für eine Trennung und die Triglyceride verlassen die Säule ohne Zeitverzögerung.

Die Parameter für die Ionenquelle, wie Vernebelungsdruck, Trockengas, Fragmentorspannung und Kapillarspannung werden mit Hilfe von Probeaufgabetechniken ohne chromatographische Trennung im FIA-Modus (*flow injection analysis*) optimiert. Mit einer Standardlösung wurden die einzelnen Parameter nacheinander vom Minimum zum Maximum und wieder zurück gescannt. Für die Standard-Mischungen wird der Massenbereich von $m/z = 400$ bis $m/z = 1200$ gewählt, da die molaren Massen der Standards in diesem Bereich liegen. Wählt man einen Massenbereich zur Datenaufnahme aus, erhält man ein TIC-Chromatogramm (*total ion current*). Der Totalionenstrom wird in willkürlichen Einheiten angegeben. Er ist ein Maß für die Ionenausbeute und damit indirekt auch für den Dampfdruck in der Quelle. Aus dem TIC lassen sich die Massenspuren für die Substanzen darstellen. Beim Arbeiten im SIM Mode wählt man eine oder mehrere Massen aus, die vom Gerät aufgezeichnet

werden. Das Arbeiten im SIM Mode ermöglicht eine niedrigere Nachweisgrenze für die Triglyceride als im Scan Mode. Die einzelnen Parameter der Methode sind im Kapitel 9.1.3 niedergelegt.

Die Trennungsmechanismen der verwendeten RP Phasen sind identisch zu den bei der HPLC-ELSD-Methode beschriebenen. Zuerst eluieren die polaren Substanzen dann die unpolaren. Die Oberflächeneigenschaften der beiden C8-Phasen sind herstellerabhängig und unterscheiden sich. Die Abbildung 4-5 stellt das TIC-Chromatogramm des Standard-Mix 1 dar. Die Triglyceride Tricaprylin, Tricaprin, Trilaurin, Trimyristin und Tripalmitin eluieren mit zunehmender C-Kette der veresterten Fettsäuren. Die chromatographischen Daten der Standards, wie Retentionszeit und Konzentration mit zugehöriger Signalfäche sind im Kapitel 9.2 tabellarisch aufgeführt.

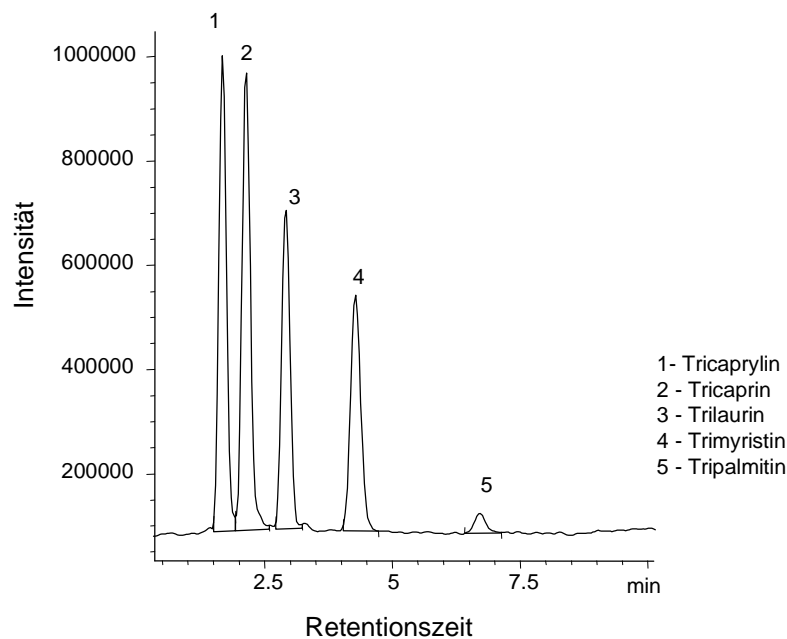


Abbildung 4-5.

Chromatographische Trennung der Standard-Mischung mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm), Konzentration = 0.974 mg/ml.

Mit Hilfe des Scan Mode ist zu jeder Zeit im Chromatogramm ein Massenspektrum erhältlich. Im Massenspektrum werden die m/z-Zahlen der Quasi-Molekular- und Fragment-Ionen der zu analysierenden Verbindungen dargestellt. Die Triglyceride zei-

gen als Quasi-Molekular-Ion das Ammonium-Addukt $[M+NH_4]^+$ oder das Natrium-Addukt $[M+Na]^+$ je nach Wahl der Ionisierungshilfe. In Abhängigkeit von der angelegten Fragmentorspannung entstehen Fragmente, die unter anderem auf Dimere des Moleküls schließen lassen. Das MS von Tricaprylin und Tricaprin zeigt neben dem Quasi-Molekular-Ion $[M+NH_4]^+$ das Dimere $[2M+Na]^+$ als Fragment-Ion. Die Massenspektren der Abbildung 4-6 beinhalten Informationen zu den Quasi-Molekular- und Fragment-Ionen.

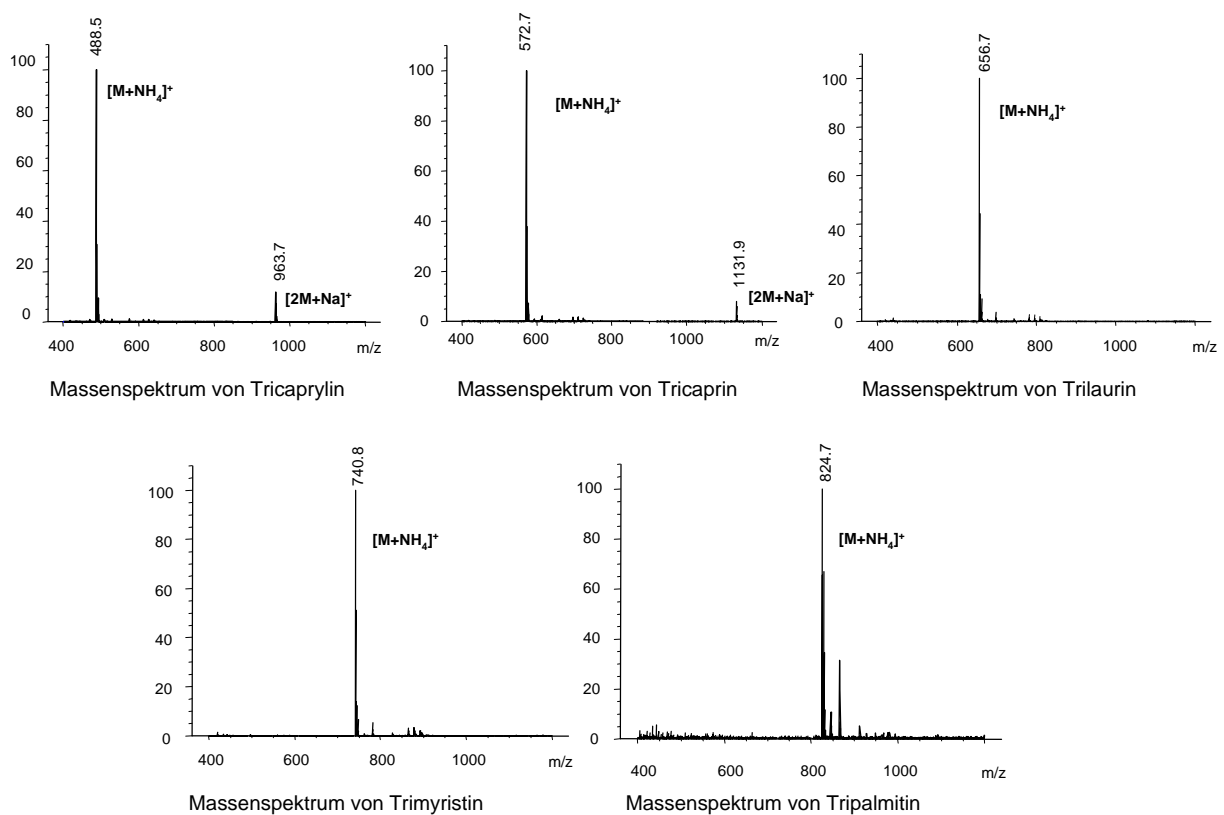


Abbildung 4-6.
Massenspektren der Standard-Triglyceride.

Die Triglyceride des Standard-Mix 3 eluierten mit abnehmender Polarität; zuerst das Trilinolenin, dann Trilinolein und Triolein. Das Tristearin kann durch die geringere Elutionskraft der mobilen Phase im Vergleich zur HPLC-ELSD-Methode nicht eluiert werden. Die Substanz verblieb auf der Säule. Verbindungen, die die gleiche oder eine geringere Polarität als Tristearin besitzen, sind unter den gegebenen Bedingun-

gen nicht chromatographierbar. Das TIC-Chromatogramm in 4-7 zeigt die Trennung der ungesättigten Triglyceride.

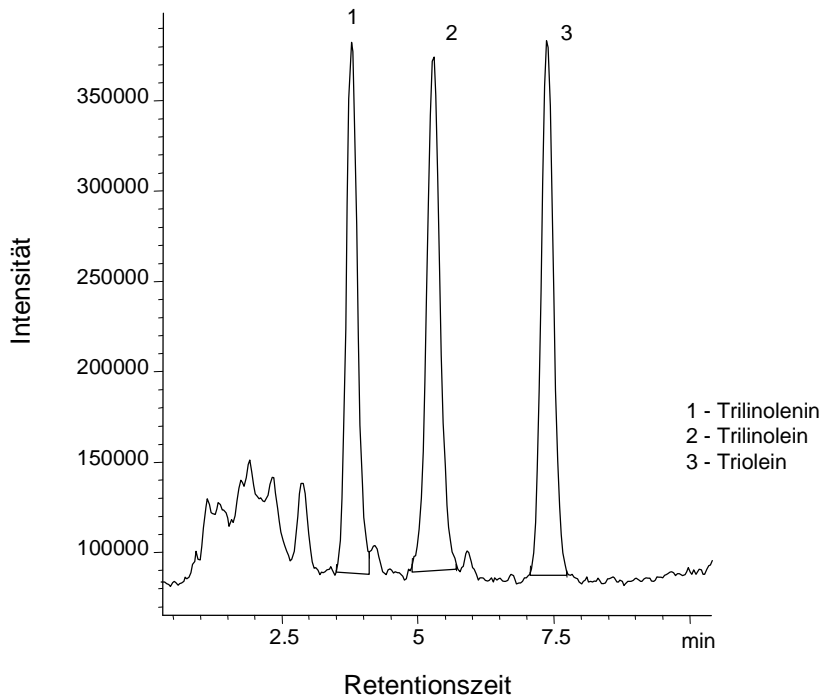


Abbildung 4-7.

Chromatographische Trennung der Standard-Mischung mit der Trennsäule Lichrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm), Konzentration = 0.093 mg/ml.

Aus den Signalen sind die dazugehörigen Massenspektren extrahierbar. Die Abbildung 4-8 zeigt die Massenspektren für die ungesättigten Triglyceride Trilinolenin, Trilinolein und Triolein.

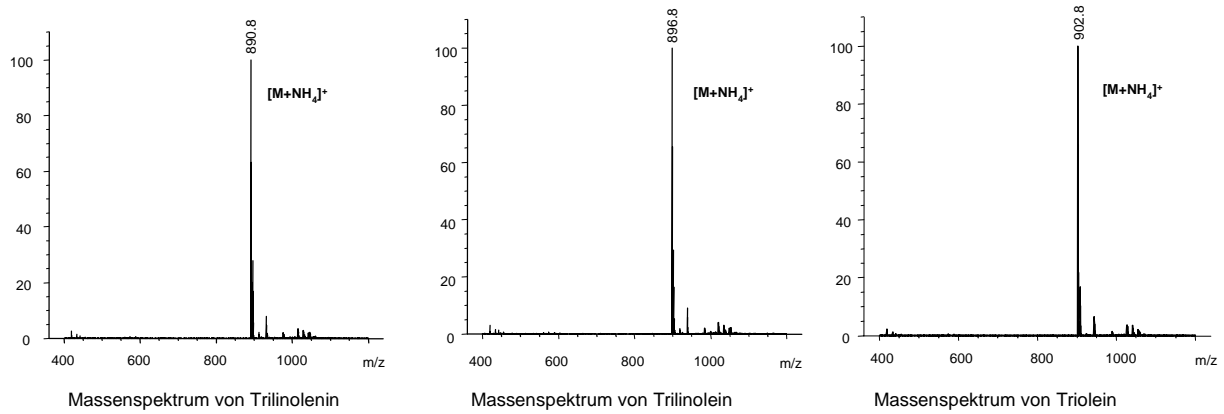


Abbildung 4-8.
Massenspektren der Standard-Triglyceride.

Im Kapitel 9.2 sind alle Standards mit Retentionszeiten, Konzentrationen und Peakflächen aufgeführt, die auf der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped getrennt wurden.

Aus den ermittelten Retentionsdaten ergibt sich folgendes Elutionsprofil für die Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm):

Tricaprylin < Tricaprin < Trilaurin < 1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol < 1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol < Trilinolenin < Trimyristin < Tripalmitolein < 1,2-Dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol < 1-Lauroyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol = 1,2-Dimyristoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < Trilinolein < 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol < 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol < Tripalmitin < 1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < Triolein < 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol < 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol < Tri-11-Eicosenin.

Summiert man über die C-Atome der veresterten Fettsäuren und die Doppelbindungen, ergibt sich in Zahlen ausgedrückt folgendes Elutionsprofil:

24:0 < 30:0 < 36:0 < 38:0 < 40:0 < 54:9 < 42:0 < 48:3 < 44:0 < 46:1 = 46:1 < 54:6 < 52:4 < 54:5 < 52:3 < 48:0 < 50:1 < 54:3 < 52:1 < 54:2 < 60:3.

Die stationäre Phase GROM-SIL Octyl-5 CP, 5 µm (125*2 mm) weist andere Eigenschaften auf und führt zu einem geänderten Elutionsprofil:

Tricaprylin < Tricaprin < Trilaurin < 1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol < Trilinolenin < 1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol < Trimyristin < Tripalmitolein < Trilinolein < 1-Lauroyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol = 1,2-Dimyristoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol < 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < 1,2-Dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol < 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol < Triolein < 1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol < 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol < 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol.

Durch Summation der Fettsäuren und der Doppelbindungen in den Triglyceriden zeigt sich ein von der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm (125*2 mm) abweichende Elutionsfolge:

24:0 < 30:0 < 36:0 < 38:0 < 54:9 < 40:0 < 42:0 < 48:3 < 54:6 < 46:1 = 46:1 < 52:4 < 54:5 < 44:0 < 52:3 < 54:3 < 50:1 < 54:2 < 52:1.

Die verwendeten stationären Phasen zeigen Unterschiede. Die Wechselwirkungen, die auf der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP stattfinden, bewirkten eine frühere Elution der Triglyceride mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zur anderen C8-Phase. Triglyceride, die überwiegend gesättigte Fettsäuren enthielten, führten zu unsymmetrischen, tailenden Signalen. Das Triglycerid Tripalmitin und unpolare Verbindungen eluierten nicht mehr von der stationären Phase. Die Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped ermöglichte die Elution von Tripalmitin und Tri-11-eicosenin. Weitere unpolare Triglyceride verblieben auf der analytischen Säule. Die Triglyceride, die sich überwiegend aus gesättigten Fettsäuren zusammensetzen, ergeben im Vergleich zur Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP symmetrische Signale.

Die Abbildung 4-9 zeigt die TIC-Chromatogramme der Standard-Mischungen 1 und 3. Jeder Standard-Mix wurde mit beiden „endcapped“ Phasen chromatographisch untersucht.

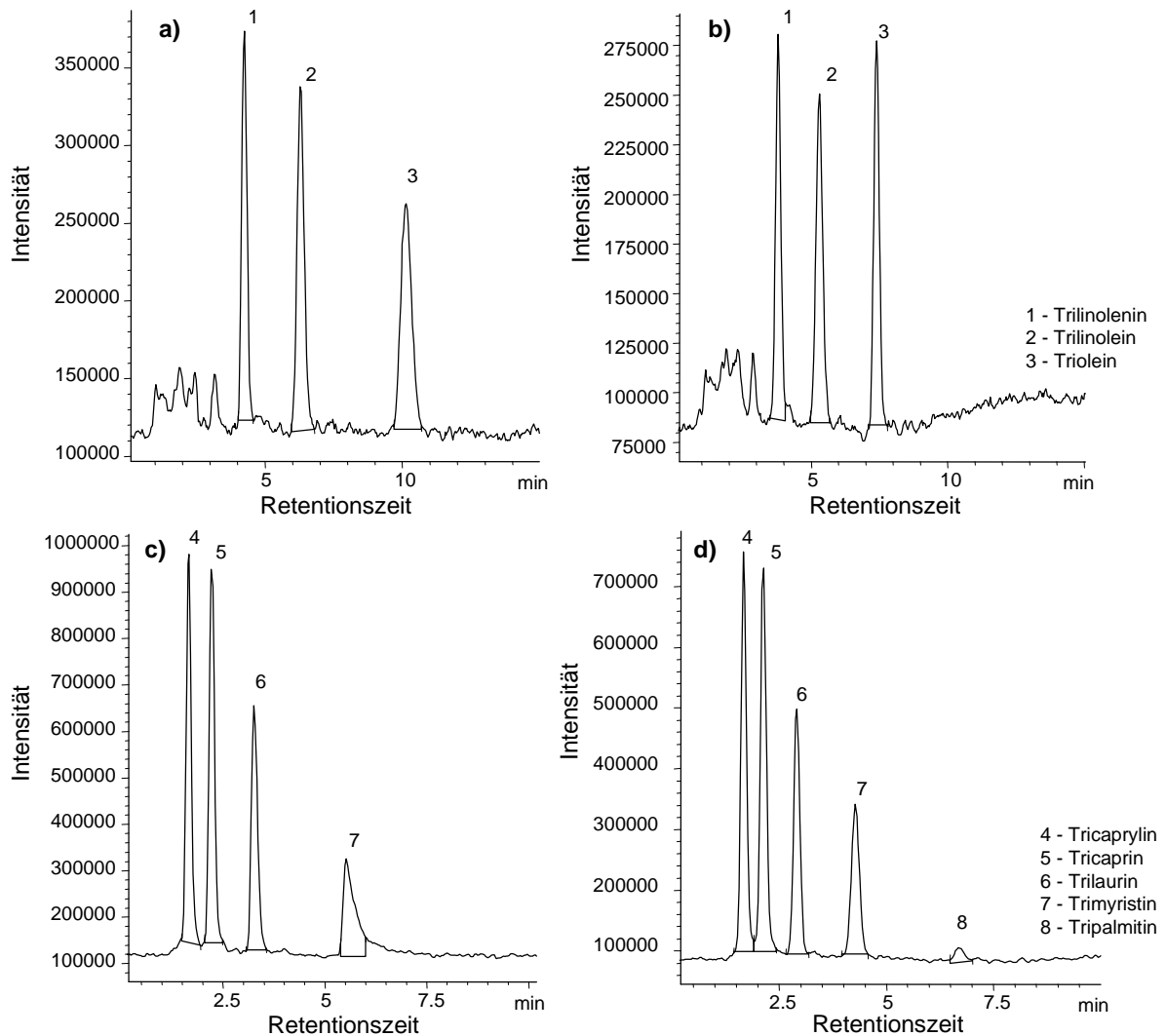


Abbildung 4-9.

Vergleich der stationären Phasen mit Standard-Mischungen: a), c) Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP und b), d) Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped. Es wurden identische Standardkonzentrationen chromatographisch untersucht.

Die Vorteile zur HPLC-ELSD-Methode sind die Gewinnung von Strukturinformationen und die Verkürzung der Analysenzeiten. Das Acetonitril/Aceton-Gemisch der HPLC-ELSD-Methode weist eine höhere Elutionskraft für unpolare Substanzen im Vergleich zum Methanol/*tert*-Butyl-methyl-ether-Gemisch auf. Die Gradientenelution der HPLC-ELSD-Methode bietet einen weiteren Elutionsbereich für die Triglyceride an. Bei der HPLC-ELSD-Methode sind die Signale basisliniengetrennt, was für die LC/MS nicht zwingend erforderlich ist.

Zum quantitativen Nachweis gilt für die Massenspektrometrie ebenfalls die Erstellung von Kalibrierfunktionen für die zu untersuchenden Verbindungen. Polare Moleküle lassen sich in der Ionenquelle leichter ionisieren als Unpolare. Im Scan Mode wurden Triglyceride in Konzentrationen von 4 µg/ml bis 80 µg/ml mit 5 µl Injektionsvolumen chromatographisch untersucht. Das entspricht absoluten Mengen von 0.02 µg bis 0.40 µg. Im SIM Mode sind die Triglyceride unter 1 ng absolut nachweisbar.

4.1.3 Kalibrierungsstrategien

In der HPLC werden die Elutionskurven direkt aufgezeichnet und man erhält ein sogenanntes Differential-Chromatogramm. Aus dem gewonnenen Messwert (y -Wert), den man allgemein als „Signalgröße“ bezeichnet, lässt sich ein Konzentrationswert (x -Wert) berechnen. Bei der Signalgröße handelt es sich um Peakflächen oder Peakhöhen. Die Fläche, die sich unter einer Elutionskurve befindet ist proportional der Substanzmenge. Im Idealfall entsprechen die Signale einer Gauss-Kurve [145,148].

Für die quantitative Chromatographie existieren einige Regeln, die beachtet werden sollen. Zum einen sollen diejenigen Signale, die quantifiziert werden, basisliniengetreunt und symmetrisch sein. Für kleine Peaks kann die Quantifizierung über die Peakhöhe richtiger sein als über die Peakfläche. Dafür müssen konstante Kapazitätsfaktoren garantiert werden [146]. Bei ideal getrennten Signalen ist die Peakfläche sowie auch die Peakhöhe proportional zur Probenmenge. Diese Linearität ist natürlich nur in gewissen Grenzbereichen möglich. Über einer gewissen Konzentration wird die reale Signalhöhe von der idealen Signalhöhe abweichen; die Messgrenze ist erreicht bzw. überschritten [147].

Für die Berechnung der Konzentration einer Substanz in einer unbekannt Probe ist eine Kalibrierung mit einer Standardsubstanz erforderlich. Bei den Kalibrierungen der HPLC-ELSD- und LC/MS-Methode wird mit äußerem Standard gearbeitet. Dazu injiziert man die Standardlösung des zu bestimmenden Stoffes mit definierter, wachsender Probenmenge. Die erhaltene Signalgröße y wird dann als abhängige Größe der Konzentration x gegenübergestellt. Mit Hilfe linearer oder quadratischer Regres-

sion ist ein gültiges mathematisches Modell für die Abhängigkeiten der Größen y und x zu entwickeln (Geradengleichung) [148].

Für die Kalibrierung mit äußerem Standard wurden für beide chromatographischen Methoden Standardlösungen chromatographisch untersucht. Die Kalibrierlösungen wurden aus der Stammlösung des jeweiligen Triglycerides durch unabhängige Verdünnungsschritte hergestellt. Es wurden zwischen 5 und 10 Verdünnungen pro Stammlösung hergestellt (1:100, 1:50, 1:25, 1:20, 1:12.5, 1:10, 1:5, 1:2) und jeweils doppelt injiziert. Die erhaltenen Messwerte (y) werden in Abhängigkeit von der Konzentration (x) der Kalibrierlösungen aufgetragen. Um die gemessenen Werte optimal zu verbinden, wird mit Hilfe der linearen Regression eine „Ausgleichsgerade“ berechnet. Die gerade Kennlinie kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$(4-1) \quad y = m \cdot x + b$$

y : abhängige Größe, Messwert (Peakfläche)

x : unabhängige Größe, Konzentration

m : Steigung der Geraden

b : Ordinatenabschnitt

Sind die beiden Parameter m und b der Geradengleichung bekannt, kann von jedem Signalwert (y_i , Peakfläche) die dazugehörige Konzentration (x_i) berechnet werden. Der Parameter m , die Steigung der Geraden, ist ein Maß für die Empfindlichkeit E des Verfahrens. Je größer die Steigung der Geraden ist, um so höher ist die Empfindlichkeit des Verfahrens.

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit des chromatographischen Systems wurden einige Kalibrierlösungen 10mal vermessen. Die Reproduzierbarkeit (Präzision) eines Verfahrens wird als Standardabweichung s angegeben: als Quadratwurzel aus den mittleren Fehlerquadraten.

$$(4-2) \quad s = + \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Je kleiner die Standardabweichung ist, um so größer ist die Präzision [10]. Die Präzision beschreibt die zufälligen Fehler der Methode. Die Richtigkeit des analytischen Ergebnisses gibt an, wie wenig das Analysenresultat vom wahren Wert abweicht. Sie ist ein Maß für die systematischen Fehler der Methode. Die Richtigkeit ist wichtiger als die Präzision.

Für den Verdampfungs-Lichtstredetektor gilt die exponentielle Abhängigkeit der Signalfläche A zu der Masse m des Analyten (s. Gleichung 3-5 und 3-6). Durch Logarithmieren der Gleichung 3-5 erhält man Gleichung 3-6 und eine lineare Beziehung zwischen $\log A$ und $\log c$. Beim LC/MS-System entsteht beim Auftragen der Konzentration c der Analyte gegen die Peakfläche A in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine lineare Funktion.

Wichtig für die Beschreibung einer analytischen Methode ist die Angabe der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Die Nachweisgrenze x_{NG} ist eine Entscheidungsgrenze. Bei der Mehrfachmessung von Proben, deren Analyt mit einer Konzentration der Nachweisgrenze x_{NG} auftritt, wird in durchschnittlich der Hälfte der Fälle das Ergebnis negativ sein. Die Nachweisgrenze x_{NG} ist kein Absolutwert im streng wissenschaftlichen Sinn. Die Bestimmungsgrenze x_{BG} ist eine quantitative Grenze. Sie ist jene Konzentration, bei der der Analyt in einer Probe mit einer vorher festgelegten Ergebnisunsicherheit quantifiziert werden kann. Die Ergebnisunsicherheit stellt das Verhältnis der jeweiligen Grenzkonzentration zu 95 % des Vertrauensbereiches dar [148].

4.2 Charakterisierung weiterer neutraler Lipide

Außer den Acylglycerinen wurden weitere neutrale Lipide, wie Alkohole, Ester, Cholesterol und Cholesterylester, mit der HPLC-ELSD-Methode chromatographisch untersucht, um den direkten Nachweis dieser Verbindungen zu ermöglichen.

Ein neutrales Lipid-Gemisch, bestehend aus Ölsäure, Ölsäuremethylester, Cholesterol, Cholesteryloleat und Triolein, wurde auf 4 verschiedenen RP-Phasen chromatographisch getrennt. Ein Vergleich der stationären Phasen wurde durch die Berechnung der Kapazitätsfaktoren k' der Verbindungen, der Trennstufenzahl N_{th} und der Bodenhöhe $HETP$ gewährleistet. Die chromatographischen Bedingungen sind im Kapitel 9.1.5 aufgeführt.

4.2.1 Cholesterol, Cholesterylester, Alkohole und Ester

Neben den Triglyceriden wurde das chromatographische Verhalten von Cholesterol, Cholesterylestern, langkettigen Alkoholen und Estern mit Einzel-Standards und kosmetischen Rohstoffen untersucht. Bei den Rohstoffen handelt sich um technisch hergestellte Verbindungen. Neben den Hauptbestandteilen können zusätzliche Verbindungen der homologen Reihe in einem technischen Gemisch vorkommen. Als Rohstoffe wurden Myristylalkohol (Tetradecan-1-ol), Cetylalkohol (Hexadecan-1-ol), Cetearylalkohol, Octyldodecanol (2-Octyldecan-1-ol), Behenylalkohol (Docosan-1-ol), Myristyl Myristate (Myristinsäure-myristylester), Cetyl Palmitate (Palmitinsäure-palmitylester) und Decyl Oleate (Ölsäure-decylester) untersucht. Cetearylalkohol ist eine Mischung aus Cetyl- (Hexadecan-1-ol) und Stearylalkohol (Octadecan-1-ol). Bei Octyldodecanol handelt es sich um einen verzweigten aliphatischen Alkohol. Die langkettigen Alkohole werden als Hilfsemulgatoren in O/W-Emulsionen in Kombination mit hydrophilen Emulgatoren eingesetzt. Cholesterol dient zur Stabilisierung von Emulsionen und wird als Emulgator in W/O-Emulsionen verwendet. Die Ester werden als Fettkomponente in kosmetische Mittel eingearbeitet. Als Standards wurden Arachidylalkohol (Eicosan-1-ol), Behenylalkohol und Cholesterylpalmitat untersucht. Die Stammlösungen der Rohstoffe und Standards wurden mit Aceton hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden 1:100, 1:50, 1:20, 1:10 und 1:5 Verdünnungen herge-

stellt und analysiert. Die stationäre Phase, der Eluent, die Flussrate sowie die Detektoreinstellungen sind mit denen in 4.1.1 identisch.

Die Abbildung 4-10 stellt chromatographisch untersuchte Rohstoffalkohole dar. Mit der HPLC-ELSD-Methode eluieren die Alkohole mit zunehmender Kettenlänge. Die Rohstoffe Myristylalkohol, Cetylalkohol und Octyldodecanol bestehen zu 99.5 % aus der gewünschten Verbindung und enthalten in Spuren Verbindungen der homologen Reihe. Cetarylalkohol setzt sich aus Cetylalkohol und Stearylalkohol im Verhältnis 1:2.85 zusammen. Der Rohstoff Behenylalkohol enthält zu 88.5 % Behenylalkohol; des Weiteren 10.8 % Arachidylalkohol und 0.7 % Stearylalkohol. Die prozentuale Gehaltsangabe erfolgte über die Abschätzung der Peakflächen.

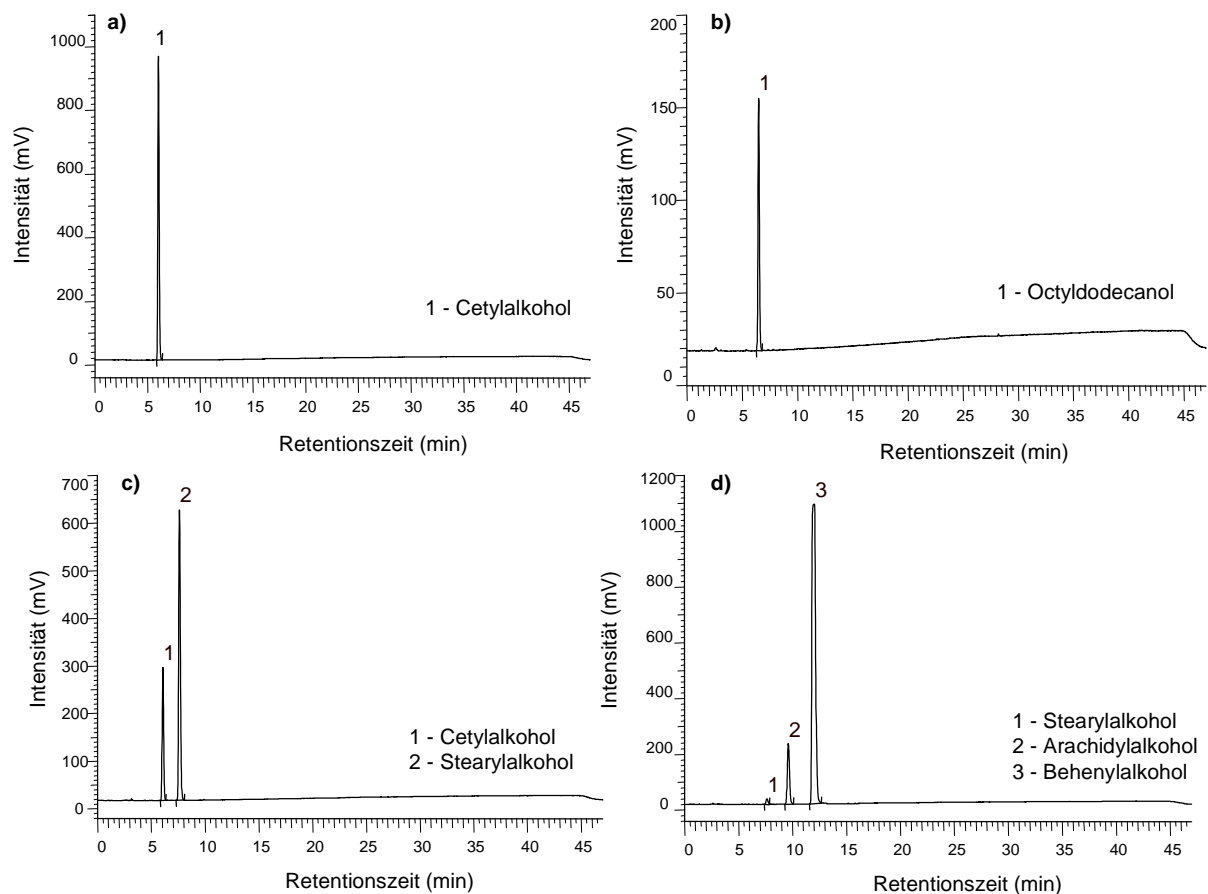


Abbildung 4-10.

Chromatographische Trennung kosmetischer Rohstoffe mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm): a) Cetylalcohol ($c = 0.28 \text{ mg/ml}$, $t_B = 6.06 \text{ min}$), b) Octyldodecanol ($c = 0.079 \text{ mg/ml}$, $t_B = 6.48 \text{ min}$), c) Cetearylalcohol ($c_{\text{gesamt}} = 0.291 \text{ mg/ml}$, $t_{B1} = 6.06 \text{ min}$, $t_{B2} = 7.62 \text{ min}$), d) Behenylalcohol ($c_{\text{gesamt}} = 0.367 \text{ mg/ml}$, $t_{B1} = 7.61 \text{ min}$, $t_{B2} = 9.60 \text{ min}$, $t_{B3} = 12.04 \text{ min}$).

Myristylalcohol eluiert mit einer Bruttoretentionszeit von 4.92 Minuten. Das Injektionsvolumen betrug 20 μl . Das Chromatogramm von Myristylalcohol ist im Kapitel 10.3.3 dargestellt. Die Standardsubstanzen Arachidylalcohol und Behenylalcohol eluierten mit einer Bruttoretentionszeit von 9.49 und 11.81 Minuten. Das Chromatogramm einer Mischung ist im Kapitel 9.3 abgebildet.

Cholesterol (5-Cholesten-3 β -ol) und die Ester Cholesterylpalmitat und -oleat wurden denselben chromatographischen Bedingungen unterzogen, wie die Alkohole und Triglyceride. Cholesterol eluiert mit einer Bruttoretentionszeit von 18.04 Minuten, Cholesterylpalmitat mit $t_B = 30.63 \text{ Minuten}$ und Cholesteryloleat mit $t_B = 28.84 \text{ Minuten}$. Die Chromatogramme von Cholesterol und Cholesterylpalmitat sind im Kapitel

9.3 dargestellt. Cholesteryloleat ist Bestandteil des neutralen Lipid-Gemisches. Die chromatographischen Daten von Cholesteryloleat wurden durch Trennung und Detektion des Lipid-Gemisches gewonnen.

Die Rohstoffe Myristyl Myristate, Decyl Oleate und Cetyl Palmitate wurden auf der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm) mit einem Gradienten aus Acetonitril und Aceton getrennt und mit dem Verdampfungs-Lichtstreuendetektor detektiert. Die Rohstoffe Myristyl Myristate und Decyl Oleate bestehen zu 97 % aus der jeweiligen Substanz. Die Ausnahme bildet Cetyl Palmitate, das sich in 4 Substanzen auftrennen lässt. Cetyl Palmitate setzt sich aus etwa 37.0 % Palmitinsäure-Laurylester, 23.2 % Stearinsäure-Laurylester, 19.6 % Palmitinsäure-Palmitylester und 20.2 % Palmitinsäure-Stearylester zusammen. Die Abstände zwischen den einzelnen Signalen sind gleich groß. Der Rohstoff Cetyl Palmitate wurde mit GC-MS untersucht, um die 4 Verbindungen des Gemisches anhand der abgespaltenen Fettsäure benennen zu können. Die Elutionsfolge für die langkettigen Alkohole, Ester sowie Cholesterol und Cholesterylester richtet sich nach der Summe der Kohlenstoffatome und der im Molekül vorhandenen Doppelbindungen. Myristinsäure-Myristylester und Ölsäure-Decylester setzen sich aus je 28 C-Atomen zusammen. Da die Ölsäure eine Doppelbindung enthält, eluiert diese Substanz aufgrund ihrer höheren Polarität früher. Myristinsäure-Myristylester eluiert mit einer Bruttoretentionszeit von 14.69 Minuten, Ölsäure-Decylester mit $t_{\text{B}} = 11.11$ Minuten. Die Bruttoretentionszeiten der Verbindungen des Cetyl Palmitates betragen: $t_{\text{B}1} = 14.00$ Minuten, $t_{\text{B}2} = 16.88$ Minuten, $t_{\text{B}3} = 19.85$ Minuten und $t_{\text{B}4} = 22.71$ Minuten. Die Chromatogramme der Rohstoffe befinden sich im Kapitel 9.3.

Die Bestimmungsgrenze für die Alkohole und Ester nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab. Myristylalkohol war im Gain 10 ab 0.2 mg/ml detektierbar. Die Bestimmungsgrenze von Cetyl- und Cetearylalkohol lag bei 0.05 mg/ml, für Octyldodecanol bei 0.04 mg/ml und für Behenylalkohol betrug sie 0.02 mg/ml bei einem Injektionsvolumen von 20 μl . Für die Standardsubstanzen Arachidylalkohol und Behenylalkohol wurde eine Bestimmungsgrenze von 0.016 mg/ml ermittelt. Cholesterol wurde ab einer Konzentration von 0.05 mg/ml, Cholesterylpalmitat und -oleat ab 0.02 mg/ml

detektiert. Die Bestimmungsgrenze für die Ester Myristyl Myristate, Decyl Oleate und Cetyl Palmitate betrug 0.025 mg/ml.

Das Detektionssignal kann in jedem Empfindlichkeitsbereich eine maximale Intensität von 1100 mV erreichen. Wird dieser y -Wert überschritten, nimmt nur noch die Breite des Signals zu und nicht mehr die Höhe. Eine Proportionalität zwischen der Peakfläche bzw. Peakhöhe und der Konzentration wird nicht mehr gewährleistet. Die Messgrenze ist überschritten. Die ideale Chromatographie weicht von der Realen ab und ein anderer Empfindlichkeitsbereich muss gewählt werden.

4.2.2 Einfluss stationärer Phasen

Das chromatographische Verhalten eines neutralen Lipid-Gemisches wurde auf 4 verschiedenen stationären Phasen untersucht. Zu den ausgewählten stationären Phasen gehören 3 RP-18 Trennphasen verschiedener Hersteller und eine RP-8 Trennphase. Der Eluent setzt sich aus Aceton und Acetonitril zusammen. Der Gradientenverlauf unterscheidet sich geringfügig für die einzelnen stationären Phasen. Die methodischen Einzelheiten sind im Abschnitt 9.1.5 dargelegt. Die Detektion erfolgte mit dem Verdampfungs-Lichtstreuendetektor.

Der Standard-Mix setzt sich anteilig aus je 20 % (w/w) Ölsäure, Ölsäuremethylester, Cholesterol, Cholesteryloleat und Triolein zusammen. Die Konzentration der Stammlösung betrug 1 mg/ml je Substanz und wurde für die flüssigchromatographische Trennung 1:5 verdünnt und 20 μ l auf die Säule aufgegeben. Die Abbildung 4-10 zeigt den Einfluss der stationären Phasen auf das Elutionsverhalten.

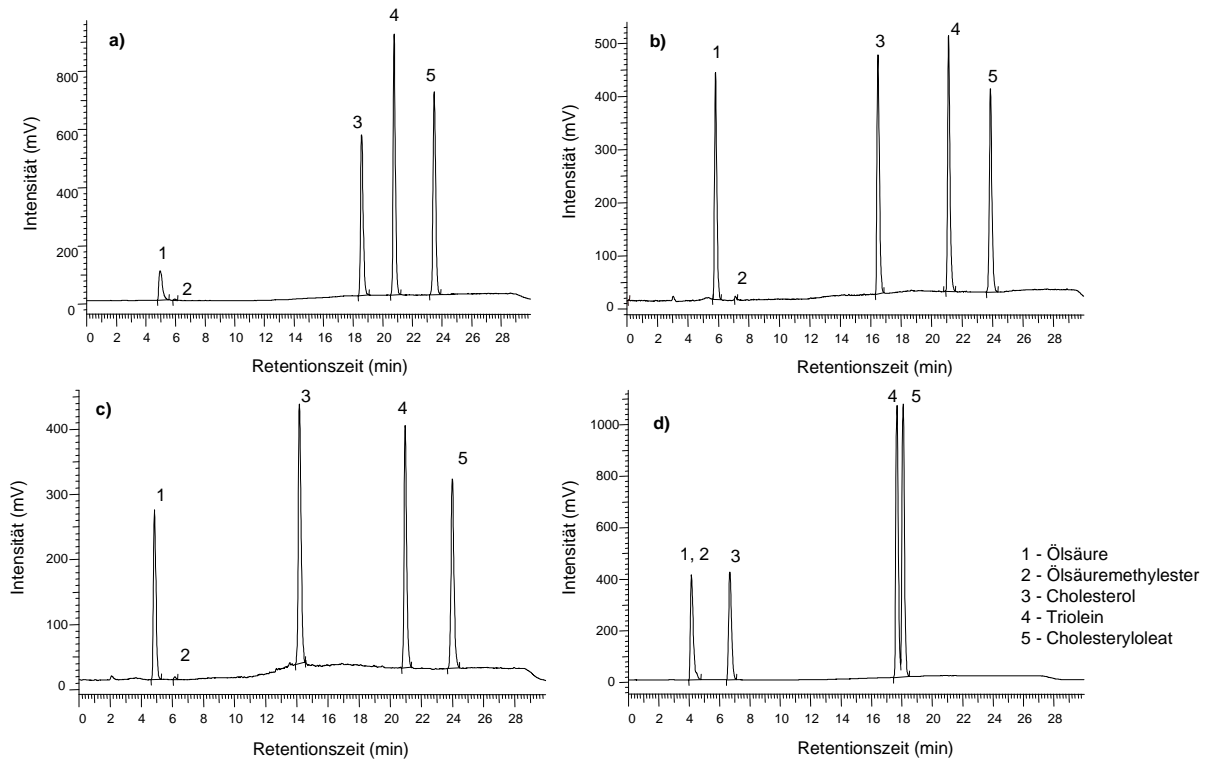


Abbildung 4-11.

Vergleich der stationären Phasen mit Standard-Gemisch: a) LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (250*4 mm), b) 5 µm Hypersil BDS C18 (250*4 mm), c) Reprosil-Pur 120 ODS 3, 5 µm (150*4 mm), d) Lichrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm (250*4 mm). Es wurden identische Konzentrationen analysiert.

Um die Chromatogramme untereinander vergleichen zu können, reicht die Angabe der Retentionszeit nicht mehr aus. Eine Größe, die den Vergleich von unterschiedlich langen Säulen ermöglicht, ist der Kapazitätsfaktor k' . Der Kapazitätsfaktor k' ist als Quotient aus Nettoretentionszeit und Totzeit definiert.

$$(4-3) \quad k' = \frac{t_B - t_T}{t_T}$$

t_B : Bruttoretentionszeit (in s)
 t_T : Totzeit (in s)

Für die weitere Charakterisierung der stationären Phasen eignen sich die theoretische Trennstufenzahl N_{th} und die Bodenhöhe $HETP$ (*height equivalent of a theoretical plate*) als mathematische Grundlagen. Die theoretische Trennstufenzahl N_{th} beschreibt, wie häufig der Stoffaustausch zwischen mobiler und stationärer Phase in einer Säule stattfindet. Sie lässt sich mit der Gleichung 4-4 berechnen:

$$(4-4) \quad N_{th} = 5,54 \cdot \left(\frac{t_B}{b_{0,5}} \right)^2$$

$b_{0,5}$: Breite des Peaks in halber Höhe (in s)

Je größer die Trennstufenzahl N_{th} ist, um so besser ist das Trennungsvermögen der Säule. N_{th} ist eine Leistungsangabe für die stationäre Phase in einem HPLC-System.

Jeder Trennstufe wird ein Längenstück der Säule zugeordnet. Dieses Längenstück wird als die Bodenhöhe *HETP* bezeichnet und nach folgender Gleichung berechnet:

$$(4-5) \quad HETP = \frac{\text{Säulenlänge}}{N_{th}}$$

Die 3 RP-18 Phasen der verschiedenen Hersteller lassen sich über die *HETP* vergleichen.

Die Chromatogramme der 3 RP-18 Trennphasen zeigen ein fast identisches Elutionsprofil für das neutrale Lipidgemisch. Die RP-8 Trennphase macht die Unterschiede im Elutionsverhalten aufgrund der veränderten Selektivität der stationären Phase deutlich. In der Tabelle 4-1 sind die ermittelten Kapazitätsfaktoren, die Trennstufenzahl und die Bodenhöhe niedergeschrieben.

Tabelle 4-1.

Berechnete Kapazitätsfaktoren, Trennstufenzahlen und Bodenhöhen für die 4 RP-Trennphasen. Die Zahlenindizes geben die Verbindung an: 1 – Ölsäure, 3 – Cholesterol, 4 – Triolein, 5 – Cholesteryloleat.

	LiChrospher 100 RP-18	Reprosil-Pur 120 ODS 3	Hypersil BDS C18	LiChrospher 100 RP-8 endcapped
Kapazitäts- faktor k'	1 = 1.00	1 = 1.43	1 = 1.33	1 = 0.73
	3 = 6.43	3 = 6.09	3 = 5.59	3 = 1.78
	4 = 7.31	4 = 9.48	4 = 7.45	4 = 6.37
	5 = 8.39	5 = 10.99	5 = 8.54	5 = 6.54
Trennstufen zahl N_{th}	1 = 1539	1 = 3271	1 = 4691	1 = 2385
	3 = 47761	3 = 27809	3 = 37615	3 = 6180
	4 = 59748	4 = 60846	4 = 61779	4 = 43342
	5 = 76357	5 = 79710	5 = 78848	5 = 45324
Bodenhöhe HETP [in mm]	1 = 0.1620	1 = 0.0460	1 = 0.0530	1 = 0.1050
	3 = 0.0052	3 = 0.0050	3 = 0.0066	3 = 0.0410
	4 = 0.0042	4 = 0.0025	4 = 0.0041	4 = 0.0058
	5 = 0.0033	5 = 0.0019	5 = 0.0032	5 = 0.0055

Aufgrund der geringen Signalintensität für Ölsäuremethylester wurden für diese Verbindung keine chromatographischen Kennzahlen berechnet. Die Abbildung 4-11 zeigt, dass das Signal für Ölsäuremethylester immer die geringste Signalfläche aufweist, obwohl alle Verbindungen des Gemisches in der gleichen Konzentration vorliegen. Ölsäuremethylester ist eine leichtflüchtige Verbindung und sublimiert teilweise während des Verdampfungsprozesses im Detektor. Dadurch ist nur ein geringer prozentualer Anteil in der Detektionskammer detektierbar.

Die errechneten Trennstufenzahlen N_{th} für die 3 RP-18 Trennphasen sind größer als die für die RP-8 Trennphase. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für dieses neutrale Lipid-Gemisch die RP-18 Trennphasen als stationäre Phasen besser geeignet sind. Die Unterschiede zwischen den einzelnen RP-18 Trennphasen sind gering und der Einsatz dieser Trennphasen führte zum optimalen Trennerfolg.

Der neutrale Lipid-Mix wurde zusätzlich den gleichen chromatographischen Bedingungen unterzogen, wie die Triglyceride, Alkohole, Ester, Cholesterol und Cholesterylester. Die veränderte Gradientenelution führt zu einer Verschiebung der Brutto-retentionszeiten für Cholesterol, Triolein und Cholesteryloleat und zu einer Peak-

verbreiterung. Es ändern sich dementsprechend die Trennstufenzahlen N_{th} und die Bodenhöhe $HETP$ zu Ungunsten von Cholesterol, Triolein und Cholesteryloleat. Die Retentionszeiten, Peakhalbwertsbreiten und die errechneten chromatographischen Kennzahlen sind in der Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tabelle 4-2

Bruttoretentionszeiten, Peakhalbwertsbreiten, Kapazitätsfaktoren, Trennstufenzahlen und Bodenhöhen für die Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm). Die Totzeit des chromatographischen System beträgt 150 s.

	Ölsäure	Cholesterol	Triolein	Cholesteryloleat
Bruttoretentionszeit in [s]	264.6	1035.0	1510.2	1732.8
Peakhalbwertsbreite in [s]	30.0	25.0	20.0	30.0
Kapazitätsfaktor k'	0.43	5.90	9.10	10.55
Trennstufenzahl N_{th}	431	9495	31579	18482
Bodenhöhe $HETP$ in [mm]	0.580	0.026	0.008	0.014

Der veränderte Gradient hat einen negativen Einfluss auf die Trennleistung des chromatographischen Systems. Für den Lipid-Mix ist die kürzere Gradientenelution vorzuziehen, da hier die höheren Trennstufenzahlen erreicht werden.

Die Verbindungen des Lipid-Mix waren im Empfindlichkeitsbereich 10 des ELSD mit Ausnahme von Ölsäuremethylester von 0.05 mg/ml bis 0.5 mg/ml detektierbar. Die Bestimmungsgrenze von Ölsäuremethylester lag bei 0.1 mg/ml.

5 Flüssigchromatographische Trennung neutraler Lipide

Für die Charakterisierung und Identifizierung von Fetten, Ölen und Wachsen in kosmetischen Formulierungen wurden flüssigchromatographische Methoden mit Hilfe von Standardsubstanzen entwickelt. Die eingesetzten Fette, Öle und Wachse sollen differenzierbar sowie quantifizierbar in verschiedenen kosmetischen Produkten sein. Verschiedene flüssigchromatographische Methoden werden in diesem Kapitel miteinander verglichen.

5.1 Fette, Öle und Wachse

Vor dem Einsatz des HPLC-ELSD-Systems wurden die Fette, Öle und Wachse mit IR-Spektroskopie differenziert und halbquantitativ bestimmt. Diese Methode ist für eine genaue Differenzierung weniger geeignet, da die Öle in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich sind. Typische IR-Schwingungsbanden für Triglyceride sind die CH-, CH₂- und CH₃-Valenzschwingungen bei 2850 cm⁻¹, 2920 cm⁻¹ und 3005 cm⁻¹, die C=O-Valenzschwingung bei 1740 cm⁻¹, C-H-, C-C- und C-O- Deformationsschwingungen bei 1460 cm⁻¹, 1375 cm⁻¹, 1160 cm⁻¹, 1095 cm⁻¹ und 720 cm⁻¹. Zusätzliche Schwingungen, wie die OH-Valenzschwingungsbande, treten z. B. bei Rizinusöl auf und ermöglichen eine IR-spektroskopische Unterscheidung zu anderen Fetten und Ölen. Die Entwicklung von flüssigchromatographischen Trennungen dienen der Verbesserung der Charakterisierung der Fette, Öle und Wachse. Sie ermöglichen den direkten und quantitativen Nachweis dieser Stoffklasse in kosmetischen Mitteln.

Informationen zur Zusammensetzung der Fette, Öle und Wachse sowie die Kriterien für deren Einteilung sind bereits in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 niedergelegt. Für die Differenzierung der kosmetischen Rohstoffe wurden 32 native pflanzliche Öle und Fette, 1 tierisches Öl, 6 technisch veränderte pflanzliche Öle, 3 native Wachse und 1 synthetisches Wachs untersucht. Die Angaben zu den untersuchten Rohstoffen wie Handelsname, INCI-Nomenklatur und Hersteller/Lieferant sind im Kapitel 9.4 aufgeführt.

5.1.1 Differenzierung von Fetten, Ölen und Wachsen mittels HPLC-ELSD

Im Kapitel 4 wurde die Entwicklung einer flüssigchromatographischen Methode für den Nachweis von Acylglycerinen beschrieben, welche als Grundlage für die Differenzierung von Fetten, Ölen und Wachsen fungiert. Die natürlichen Fette und Öle setzen sich aus Triglyceriden zusammen. Natürlich vorkommende Wachse bestehen aus Estern. Zuerst wurde ein Oliven-Öl-Standard chromatographisch untersucht. Daran schlossen sich häufig in kosmetische Mittel eingearbeitete pflanzliche Fette, Öle und Wachse an. Hierzu zählen Mandelöl, Jojobaöl, Rizinusöl, Sojaöl, Sonnenblumenöl und Traubenkernöl. Für die Erstellung einer Rohstoffübersicht wurden weitere kosmetisch relevante Fette, Öle und Wachse untersucht.

Als stationäre Phasen wurden für die HPLC-ELSD-Methode 2 RP-18 Trennphasen verwendet: die LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (250*4 mm) und die LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm). Diese analytischen Säulen zeigten keine Unterschiede im Elutionsverhalten der untersuchten Substanzgemische.

Der Oliven-Öl-Standard wurde untersucht und mit den Herstellerangaben verglichen. In 5-1 ist das Chromatogramm des Standards abgebildet. Den Angaben zufolge setzt sich der Standard anteilig zusammen aus: 2 % Trilinolein, 4 % 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol, 60 % Triolein, 30 % 1,2-Dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol und 4 % 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol. Die 50 mg des Standards wurden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit Aceton aufgefüllt. Eine 1:10 Verdünnung der Stammlösung wurde chromatographisch untersucht und die erhaltenen Signale integriert. Die Integration der Signale und die anschließende prozentuale Berechnung der Signalflächen ergab eine abweichende Zusammensetzung: 0.2 % Trilinolein, 0.8 % 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol, 60 % Triolein, 38.2 % 1,2-Dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol und 0.8 % 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol. Injiziert man eine Konzentration < 0.5 mg/ml, dann sind die Triglyceride 1, 2 und 5 unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr detektierbar.

Die Elutionsfolge der Triglyceride ist abhängig von der Kettenlänge der veresterten Fettsäuren und der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül. Im Kapitel 4 sind die

Auswirkungen der auftretenden Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und den Triglyceriden erläutert.

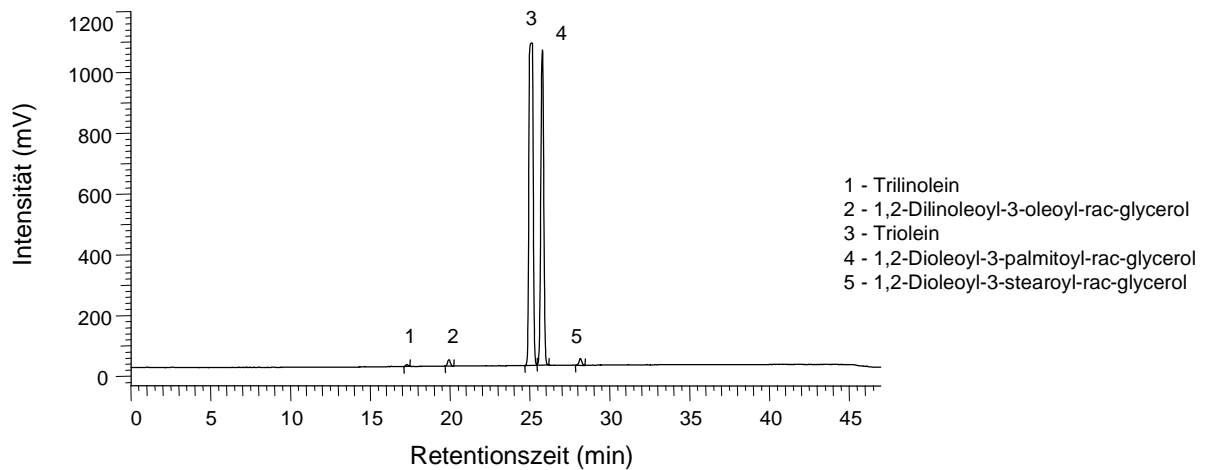


Abbildung 5-1.

Chromatographische Trennung des Oliven Öl Standards mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, Konzentration = 0.5 mg/ml.

In den folgenden Abbildungen sind die chromatographischen Trennungen einiger pflanzlicher Fette, Öle und Wachse dargestellt. Auswahlkriterien für die angeführten Beispiele ist die Zusammensetzung der Triglyceride. Die Einteilung der Fette und Öle ist in Kapitel 3.2.2 erläutert. Sie bildete die Grundlage der folgenden Beispielauswahl. Aus der Gruppe der laurinsäurereichen Triglyceride ist die Trennung von Kokosnussöl, aus der Pflanzenbutter-Gruppe die Trennung von Kakaobutter, aus der Gruppe der ölsäurereichen Triglyceride die Trennung von Mandelöl, aus der Gruppe der linolsäurereichen Triglyceride die Trennung Sonnenblumenöl und aus der Gruppe der linolensäurereichen Triglyceride die Trennung von Sojaöl dargestellt. Als Öl mit oxidierten Fettsäuren wurde Rizinusöl und als flüssiges Wachs Jojobaöl ausgewählt und abgebildet.

Als Beispiele der Laurinsäure-Gruppe wurden Babassuöl, Kokosnussöl und Palmkernöl untersucht. Von allen drei Ölen wurde jeweils eine Stammlösung mit Aceton hergestellt. Die Verdünnungen aus den Stammlösungen wurden in das HPLC-ELSD-System injiziert. Die Abbildung 5-2 zeigt das Chromatogramm des Kokosnussöls. Babassuöl und Palmkernöl sind im Kapitel 9.3.4 dargestellt. Kokosnussöl trennt sich

flüssigchromatographisch in 12 Signale auf. Addiert man die Anzahl der C-Atome der veresterten Fettsäuren und die der Doppelbindungen, erhält man Zahlenkombinationen. Diese geben einen einfachen und schnellen Überblick über das Elutionsprofil der Triglyceride der HPLC-ELSD-Methode:

28:0 < 30:0 < 32:0 < 34:0 < 36:0 < 38:0 < 42:1 < 40:0 < 44:1 < 42:0 < 46:1 < 44:0.

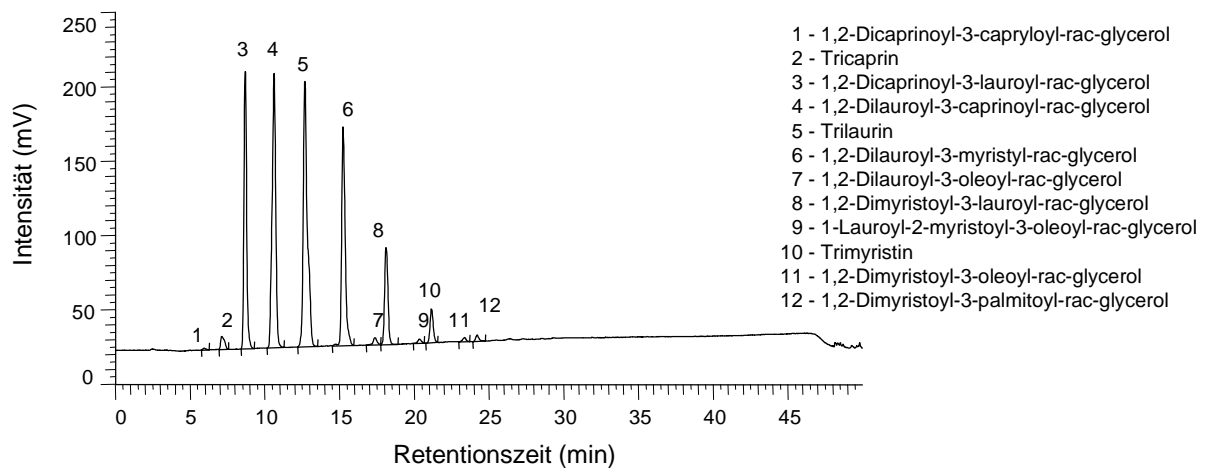


Abbildung 5-2.

Chromatographische Trennung von Kokosnussöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Konzentration = 0.917 mg/ml.

Die Verbindungen 1,2-Dilauroyl-3-caprinoyl-rac-glycerol und Trilaurin sind die Triglyceride, die zusammen mit über 50 % den Hauptteil des Öls bestimmen.

Zur Pflanzenbutter-Gruppe zählen Kakaobutter, Shea Butter und Shorea Butter. Die Chromatogramme von Shea und Shorea Butter sind im Kapitel 9 abgebildet. Die Stammlösungen dieser Rohstoffe wurden mit Dichlormethan hergestellt, da sich beide nicht vollständig in Aceton lösen. Kakaobutter wurde in Aceton gelöst. Die Abbildung 5-3 zeigt das Chromatogramm von Kakaobutter, die sich in 6 Signale auftrennen lässt. Die Verbindungen 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol und 1,2-Distearoyl-3-oleoyl-rac-glycerol ergeben zusammen über 80 % und bilden den größten Anteil der Kakaobutter. Die Elutionsfolge der Triglyceride in Form von Zahlen ausgedrückt, ergibt folgendes Profil:

50:2 < 52:2 < 50:1 < 54:2 < 52:1 < 54:1.

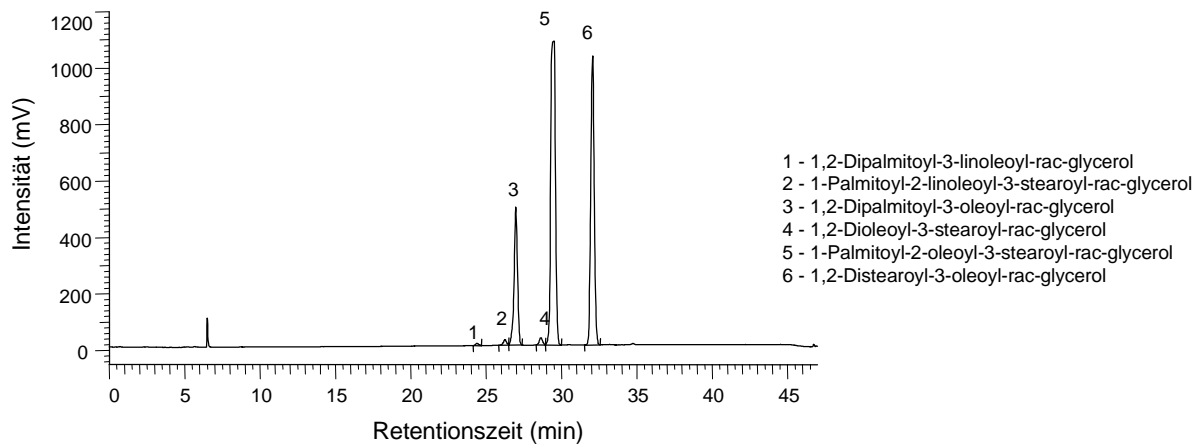


Abbildung 5-3.

Chromatographische Trennung von Kakaobutter mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Konzentration = 1.140 mg/ml.

Als Beispiele der Ölsäure-Gruppe wurden Aprikosenkernöl, Avocadoöl, Canolaöl, Camelliaöl, Erdnussöl, Haselnussöl, Mandelöl, Mangokernöl, Olivenöl, Palmöl und Sesamöl untersucht. Alle Rohstoffe lösen sich in Aceton. In 5-4 ist das Chromatogramm von Mandelöl abgebildet. Die Chromatogramme der weiteren Rohstoffe sind im Kapitel 9 dargestellt. Das Mandelöl trennt sich flüssigchromatographisch in 8 Signale auf. Den Signalen wurden die Triglyceride in Elutionsfolge folgende Zahlenkombinationen zugeordnet:

54:6 < 54:5 < 52:4 < 54:4 < 52:3 < 54:3 < 52:2 < 54:2.

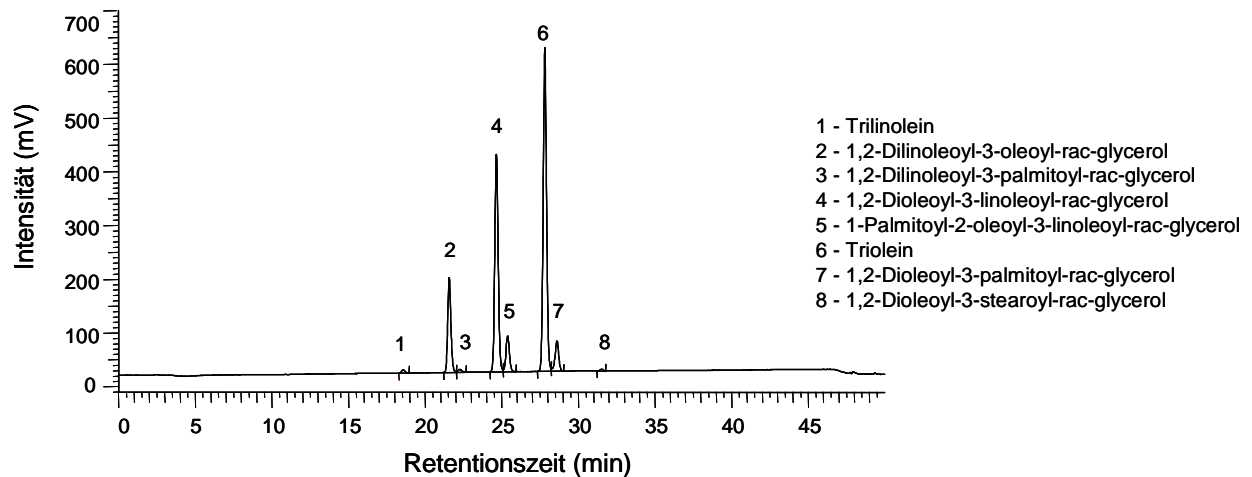


Abbildung 5-4.

Chromatographische Trennung des Mandelöls mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Standardkonzentration = 0.821 mg/ml.

Der Hauptanteil des Mandelöls wird mit mehr als 70 % von den Glyceriden Triolein und 1,2-Dioleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol bestimmt.

Zur Linolsäure-Gruppe gehören Baumwollsamöl, Kürbiskernöl, Maiskeimöl, Mohnöl, Nachtkerzenöl, Safloröl, Sonnenblumenöl und Traubenkernöl. Diese Öle sind alle in Aceton löslich. Das bekannteste Öl dieser Gruppe – das Sonnenblumenöl – ist in 5-5 abgebildet. Die Chromatogramme der anderen Rohstoffe sind im Kapitel 9 dargestellt. Sonnenblumenöl lässt sich chromatographisch in 10 Signale auftrennen. In Zahlen ausgedrückt, stellt sich das Elutionsprofil wie folgt dar:

54:6 < 54:5 < 52:4 < 54:4 < 52:3 < 54:3 < 52:2 < 54:2 < 52:1 < 54:1.

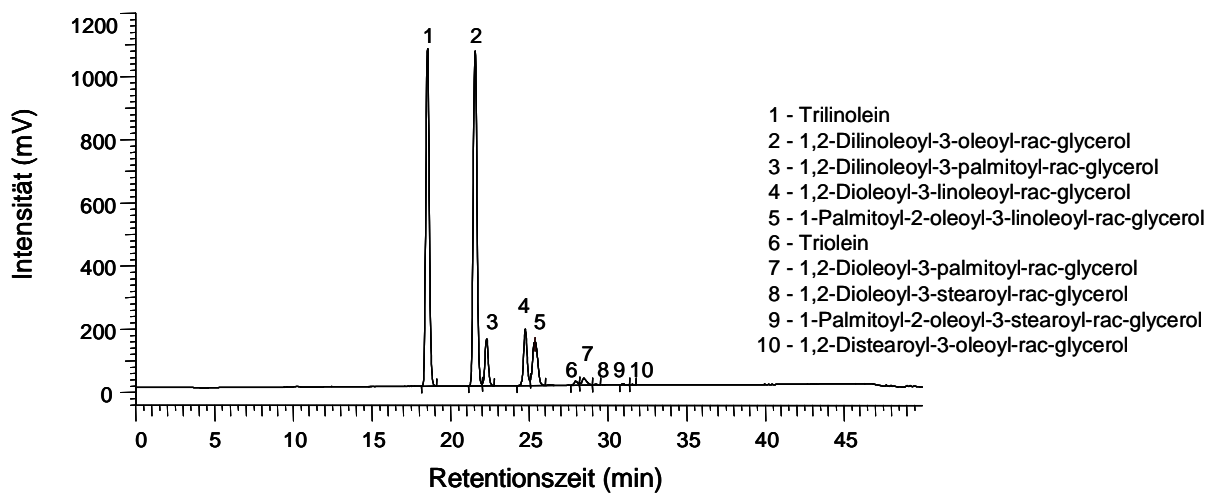


Abbildung 5-5.

Chromatographische Trennung des Sonnenblumenöls mit der Trennsäule LiChrosper 100 RP-18 endcapped, Konzentration = 1.351 mg/ml.

Die Signale 4 und 6 können für 2 verschiedene Triglyceride stehen, die aufgrund der gleichen molekularen Masse sowie der Summe der Doppelbindungen und Kohlenstoffatome der Fettsäuren die gleiche Polarität aufweisen, jedoch über eine andere Fettsäureverteilung verfügen. Die Triglyceride, die für die Signale 1 und 2 stehen, bestimmen mit über 75 % die Zusammensetzung des Sonnenblumenöls.

Das Sojaöl wurde als Beispiel aus der Linolensäure-Gruppe ausgewählt. Neben dem Sojaöl gehören der Gruppe ebenfalls Borretschöl, Calendulaöl, Hagebuttenkernöl, Johannisbeeröl, Johannisbeersamenöl und Leinöl an. Borretschöl sowie Johannisbeersamenöl enthalten anstatt der Linolensäure hauptsächlich γ -Linolensäure. Das HPLC-Chromatogramm des Sojaöls ist in Abbildung 5-6 dargestellt. Die anderen Beispiel-Chromatogramme sind im Kapitel 9 abgebildet. Sojaöl trennt sich flüssigchromatographisch in 11 Signale auf. Die Signale 2 und 4 bilden mit über 50 % den Hauptteil des Sojaöls. Die Darstellung der Triglyceride in Zahlen gibt einen schnellen und einfachen Überblick über die Elutionsfolge, die für Sojaöl wie folgt aussieht:

54:7 < 54:6 < 52:5 < 54:5 < 52:4 < 54:4 < 52:3 < 50:2 < 54:3 < 52:2 < 52:1.

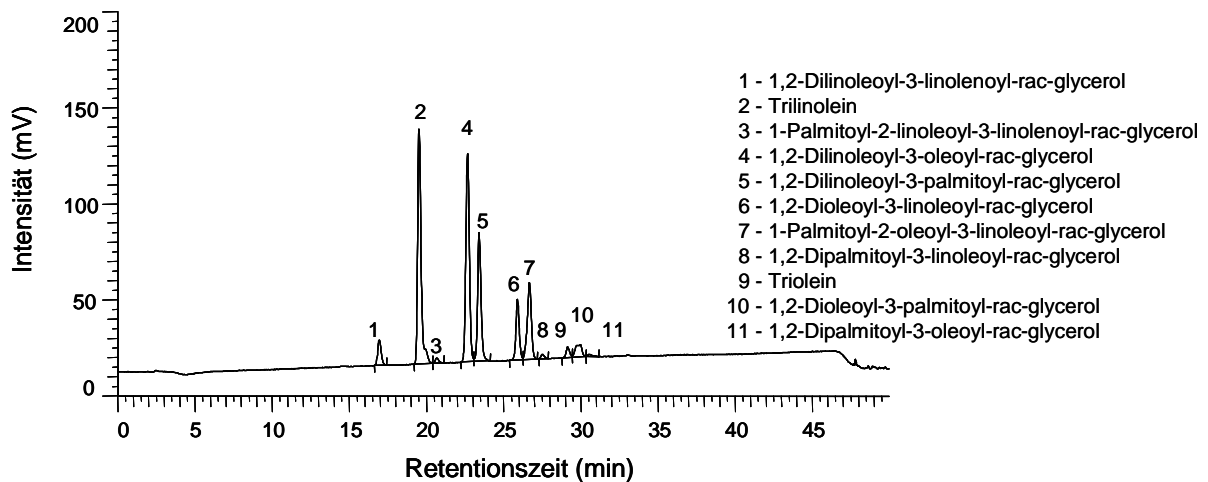


Abbildung 5-6.

Chromatographische Trennung des Sojaöls mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Konzentration = 0.726 mg/ml.

Jojobaöl gehört zur Klasse der flüssigen Wachse und setzt sich aus 4 Wachsestern einfach ungesättigter Alkohole und einfach ungesättigter Fettsäuren unterschiedlicher Konzentration zusammen. Neben der Klasse der flüssigen Wachse existieren die festen Wachse. Zu den festen Wachsen zählen unter anderem die Bienenwaxe. Natürliches Bienenwachs besteht aus ca. 70 Estern von C₁₆- bis C₃₆-Säuren und C₂₄- bis C₃₆-Alkoholen. Es wurden 2 Chargen natürliches und eine Charge synthetisches Bienenwachs chromatographisch untersucht. Die verschiedenen Chromatogramme sind im Kapitel 9 dargestellt. Die untersuchten Bienenwachsrohstoffe wurden in Chloroform gelöst. Die Stammlösung von Jojobaöl wurde mit Aceton hergestellt.

Die chromatographische Trennung von Jojobaöl ist in 5-7 dargestellt. Mit 66.2 % stellt die Verbindung Gadolinsäure-Erucylester die Hauptverbindung des Jojobaöls dar. Gadolinsäure-Gadolinylester ist mit 28.7 %, Erucasäure-Erucylester mit 3.5 % und Ölsäure-Gadolinylester mit 1.5 % im Jojobaöl enthalten. Gadolinsäure ist der Trivialname für cis-9-Eicosensäure und dementsprechend Gadolinylalkohol der Trivialname für cis-9-Eicosenol. Der Abstand zwischen den einzelnen Signalen ist immer äquidistant. Für die Wachsester des Jojobaöls wurde die Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäure und des Alkohols sowie die Anzahl der Doppelbindungen summiert und wie für die Triglyceride in Form von Zahlenkombinationen dargestellt:

38:2 < 40:2 < 42:2 < 44:2.

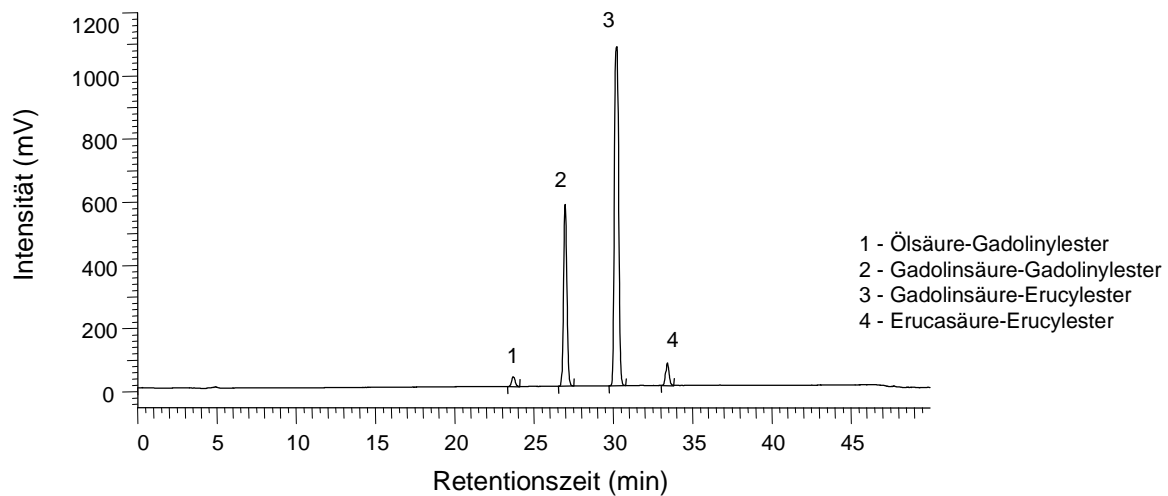


Abbildung 5-7.

Chromatographische Trennung von Jojobaöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, Konzentration = 0.995 mg/ml.

Das Rizinusöl gehört zur Gruppe der Öle mit oxidierten Fettsäuren, da Ricinolsäure (*12-Hydroxy-cis-9-Octadecensäure*) Hauptbestandteil der Triglyceride ist. Die Hydroxyfunktion der Fettsäure verändert die Polarität der Verbindung und führt zu einer Elution bei niedrigen Retentionszeiten. Die Abbildung 5-8 stellt die chromatographische Trennung des Rizinusöls in 6 Triglyceride dar. Die Leitsubstanz des Rizinusöls ist mit 91.4 % das Triricinolein. Bei der Darstellung der Zahlenkombination für die Triglyceride muss für Rizinusöl die Anzahl der zusätzlichen Hydroxyfunktionen mit berücksichtigt werden. Deshalb ergibt sich folgende Darstellung:

54(3-OH):3 < 54(2-OH):5 < 54(2-OH):4 < 54(2-OH):3 < 52(2-OH):2 < 54(2-OH):2.

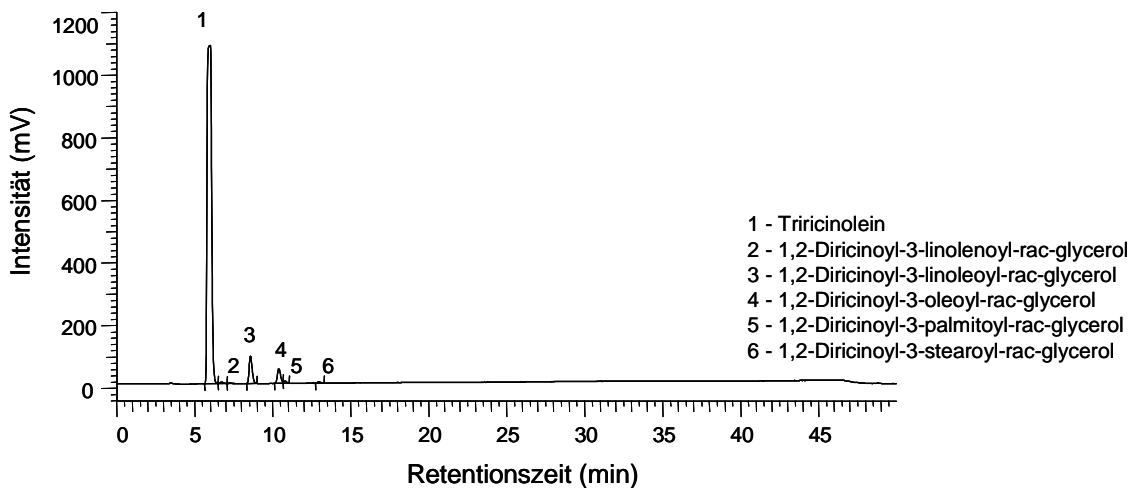


Abbildung 5-8.

Chromatographische Trennung von Rizinusöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Konzentration = 0.826 mg/ml.

Für die quantitative Bestimmung von Rizinusöl in kosmetischen Formulierungen wurde der Gradient der mobilen Phase verändert, um eine Verschiebung zu höheren Retentionszeiten und eine Matrixabtrennung zu gewährleisten. Die Abbildung 5-9 zeigt die Verschiebung der Retentionszeiten von Rizinusöl aufgrund des veränderten Gradientenverlaufs. Die chromatographischen Bedingungen sind im Kapitel 9.1.2 angegeben.

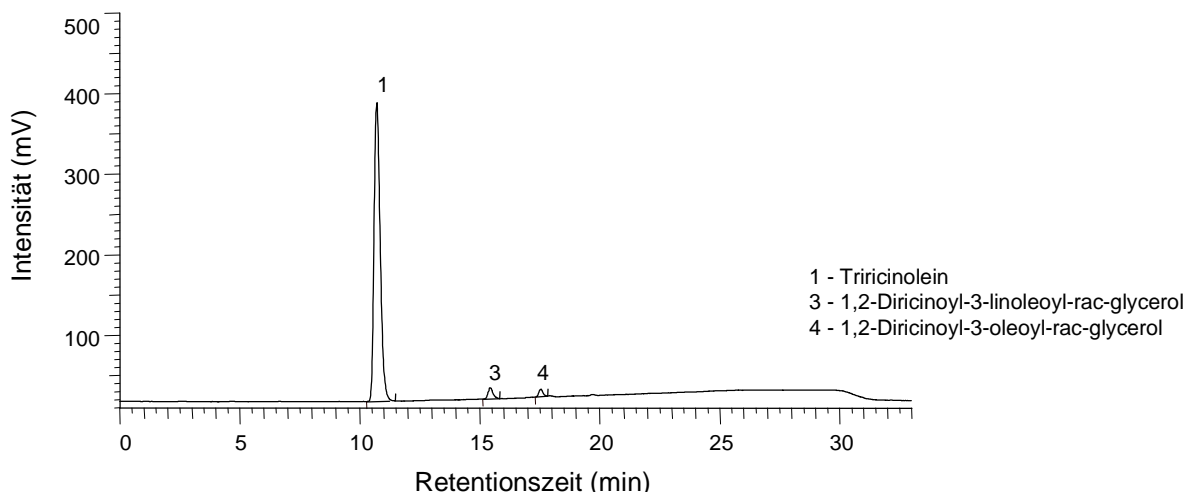


Abbildung 5-9.

Chromatographische Trennung von Rizinusöl mit veränderter mobiler Phase und der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, Konzentration = 0.2765 mg/ml.

Die Signale 2, 5 und 6 werden aufgrund der geringen Konzentration der injizierten Lösung nicht erfasst. Neben Rizinusöl wird technisch verändertes – hydriertes – Rizinusöl in kosmetischen Mitteln eingesetzt. Durch die Hydrierung werden die ungesättigten Fettsäuren in gesättigte überführt und somit die Haltbarkeit des Öls verbessert. In 5-10 ist das Chromatogramm von hydriertem Rizinusöl abgebildet.

Die Hydrierung verändert die chemischen Eigenschaften des Rizinusöls. Das hydrierte Rizinusöl löst sich nicht mehr in Aceton. Die Stammlösung wurde mit Dichlormethan hergestellt. Die oxidierten Fettsäuren der Triglyceride bleiben bei der Hydrierung erhalten. Aus der 12-Hydroxy-cis-9-Octadecensäure entsteht die 12-Hydroxy-Octadecensäure. Die Veränderung der veresterten Fettsäuren führt zu einer Verstärkung der Wechselwirkung mit der stationären Phase und zu einer späteren Elution. Das hydrierte Rizinusöl setzt sich nur noch aus 3 gesättigten Triglyceriden zusammen. Das Tri(hydroxy)stearin bildet mit 85.9 % die Leitsubstanz des Öls. Weitere hydrierte Öle, die in kosmetischen Mitteln eingesetzt werden, sind Palmkernöl und Rapsöl. Die Chromatogramme der beiden technisch veränderten pflanzlichen Öle sind im Kapitel 9 abgebildet. Die Elutionsreihenfolge stellt sich wie folgt dar:

52(2-OH):0 < 54(3-OH):0 < 54(2-OH):0.

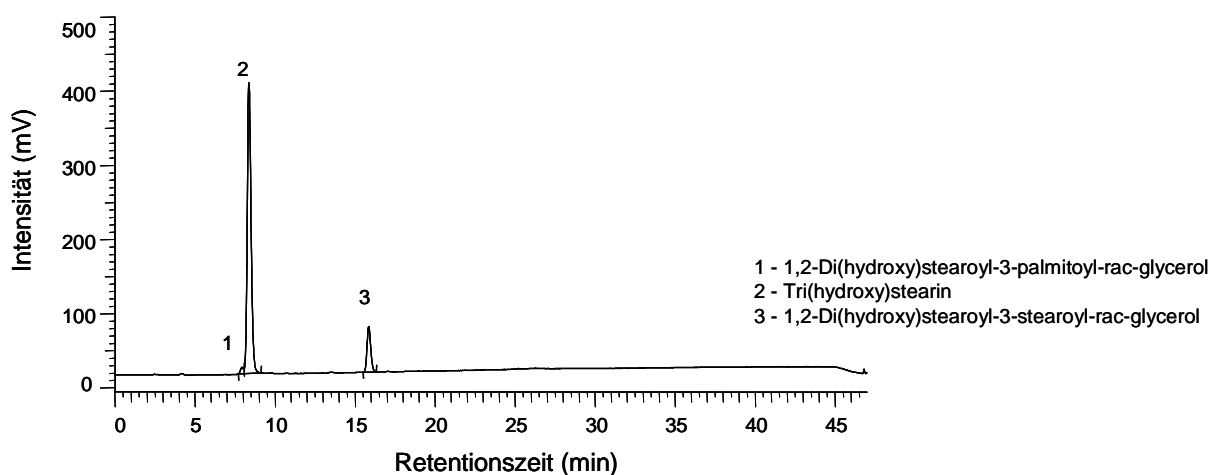


Abbildung 5-10.

Chromatographische Trennung von hydriertem Rizinusöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, Konzentration = 0.791 mg/ml.

Einige Fette, Öle und Wachse sind in der Zusammensetzung der Triglyceride identisch, wie Mandelöl und Aprikosenkernöl. Diese Öle unterscheiden sich nur in der prozentualen Verteilung der Triglyceride und sind mit HPLC-ELSD-Methode differenzierbar. Beispiele mit gleicher Triglyceridzusammensetzung sind ebenso Johannisbeeröl und Johannisbeersamenöl. Eine Differenzierung der beiden in einer kosmetischen Formulierung ist mit HPLC-ELSD nicht möglich. Fast identisch sind die technisch veränderten Rohstoffe des Canolaöls – Canolaöl petitioned und Canolaöl unsaponifiables. Nach Herstellerangaben handelt es sich bei Canolaöl petitioned um ein partiell hydriertes, des-odoriertes Pflanzenöl und bei Canolaöl unsaponifiables um ein raffiniertes, fraktioniertes und desodoriertes Öl. Diese beiden technisch hergestellten Öle unterscheiden sich im Chromatogramm nur in der prozentualen Verteilung eines Signales.

In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Fette, Öle und Wachse werden Chromatogramme erhalten, die nicht nur basisliniengetrennte Signale enthalten. Für die Kalibrierung der Gemische wurde ein Signal pro Rohstoff ausgewählt. Der ausgewählte Peak soll symmetrisch und basisliniengetrennt sein. Normalerweise wird das Triglycerid für die Kalibrierung verwendet, das den größten Anteil im Öl ausmacht.

Die pflanzlichen Fette und Öle unterliegen in ihrer Zusammensetzung jahreszeitlichen und standortabhängigen Schwankungen. Diese spiegeln sich in einer veränderbaren prozentualen Zusammensetzung wider. Vergleiche mit Literaturdaten [88] zeigen keine 100 %ige Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen.

Triglyceride, die ein und dieselbe molekulare Masse und gleiche Polarität aufweisen, lassen sich mit den gegebenen chromatographischen Bedingungen nicht voneinander trennen. Um solche Triglyceride identifizieren zu können, sind massenspektrometrische Untersuchungen erforderlich.

Mandelöl wurde chromatographisch untersucht und in den Empfindlichkeitsbereichen 9, 10, 11 und 12 des ELSD detektiert. Die Konzentration des Gemisches wurde in

Bezug zum Leittriglycerid Triolein gesetzt. Im Gain 12 lässt sich Mandelöl von 0.05 mg/ml bis 0.40 mg/ml im linearen Bereich (innerhalb der Messgrenze) detektieren. Bei Konzentrationen > 0.40 mg/ml verlässt die Kalibrierfunktion den linearen Bereich. Im Gain 11 wird Mandelöl von 0.07 mg/ml bis 0.50 mg/ml, im Gain 10 von 0.09 mg/ml bis 0.92 mg/ml und im Empfindlichkeitsbereich 9 von 0.10 mg/ml bis 1.15 mg/ml detektiert. Die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennungen ist wiederholbar und der Variationskoeffizient für die HPLC-ELSD-Methode liegt zwischen 5 und 7 %.

5.1.2 Charakterisierung von Fetten, Ölen und Wachsen mittels LC/MS

Im Kapitel 4.1.2 ist die LC/MS-Methode zur Charakterisierung und Identifizierung der Acylglycerine beschrieben. Die LC/MS-Methode liefert zusätzliche Strukturinformationen und wird für die Differenzierung der Fette, Öle und Wachse in kosmetischen Formulierungen verwendet. Die Ergebnisse wurden mit denen der HPLC-ELSD-Methode verglichen.

Für das LC/MS-System wurden 2 RP-8 Trennphasen verwendet, die LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm (125*2 mm) und die GROM-SIL Octyl-5 CP, 5 µm (125*2 mm). Die Phasen zeigen Unterschiede im Elutionsverhalten für die Standard-Acylglycerine. Auf diese Unterschiede wurde bereits in Kapitel 4.1.2 eingegangen. Die Trennung der Fette, Öle und Wachse ermöglichte die Bestimmung einzelner Triglyceride anhand ihrer Massen. Des Weiteren wurde eine Charakterisierung der Rohstoffe gewährleistet. Für die Trennung der Triglyceride mit der Trennphase LiChrospher 100 RP-8 endcapped setzte sich die mobile Phase aus 95 % Methanol und 5 % *tert*-Butyl-methylether (v/v) zusammen. Für die Trennung mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP bestand der Eluent aus 92 % Methanol und 8 % *tert*-Butyl-methyl-ether (v/v). Als Ionisierungshilfe wurde in micromolaren Mengen dem Methanol Ammoniumacetat zugegeben. Die Flussrate betrug 300 µl/min. Aufgrund der vergleichsweise schonenden Ionisierung bilden sich Quasi-Molekular-Ionen. Die Quasi-Molekular-Ionen lagen als Protonen-Addukte $[M+H]^+$, Ammonium-Addukte $[M+NH_4]^+$, Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ und Kalium-Addukte $[M+K]^+$ vor. Die Fragmentorspannung

betrug 70 V. Im Massenbereich von $m/z = 400$ bis $m/z = 1200$ wurden die Fette, Öle und Wachse aufgenommen.

Für die Herstellung der Stammlösungen wurde ein Gemisch aus 1 ml *tert*-Butylmethyl-ether und 9 ml Methanol (v/v) verwendet, da sich die mobile Phase aus diesen Lösungsmitteln zusammensetzt.

Die folgenden Abbildungen stellen eine Auswahl der chromatographisch untersuchten pflanzlichen Fette, Öle und Wachse dar. Wie in Kapitel 5.1.1 wurden als Beispiele Kokosnussöl, Kakaobutter, Mandelöl, Sonnenblumenöl, Sojaöl, Rizinusöl und Jojobaöl ausgewählt und die TIC-Chromatogramme im laufenden Text dargestellt. Alle weiteren chromatographisch untersuchten Fette und Öle sind im Kapitel 9.3.5 abgebildet. Aus dem TIC-Chromatogramm des jeweiligen Rohstoffes lassen sich die Massenspuren der Triglyceride extrahieren und darstellen. Ein Signal im Chromatogramm weist meist auf mehr als eine Massenspur hin, da keine komplette Basislinitrennung des Substanzgemisches erforderlich ist.

In 5-11 ist das TIC-Chromatogramm von Kokosnussöl abgebildet. Die microbore Säule LiChrospher 100 RP-8 endcapped trennt das Gemisch in 7 Signale. Aus dem Totalionenstrom lassen sich die Massenspuren von 13 Triglyceriden extrahieren. Ein Signal enthält mehrere m/z -Verhältnisse, da Triglyceride mit ähnlicher Polarität gleiches Retentionsverhalten aufweisen. Bei den detektierten Quasi-Molekular-Ionen handelt es sich hauptsächlich um die Ammonium-Addukte der Triglyceride $[M+NH_4]^+$. Aus den Signalen lassen sich die Massenspuren für folgende Triglyceride extrahieren:

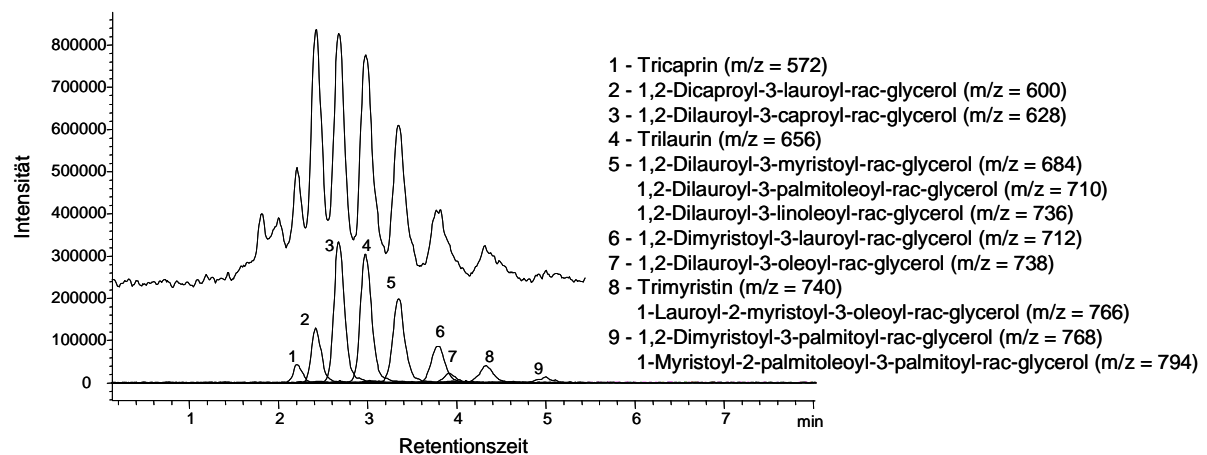


Abbildung 5-11.

Chromatographische Trennung des Kokosnussöls mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.0668 mg/ml.

Den 13 m/z-Verhältnissen lassen sich 14 Triglyceride zuordnen, da 1-Lauroyl-2-myristoyl-3-oleoyl-rac-glycerol und 1,2-Dimyristoyl-3-palmitoleyl-rac-glycerol die gleiche molekulare Masse aufweisen. Triglyceride mit gleicher molekulare Masse haben auch das gleiche Retentionsverhalten. Die Bestimmung der veresterten Fettsäuren wird durch MS/MS-Fragmentierungsexperimente ermöglicht, da hier durch die Isolierung einzelner Massen und gezielte Fragmentierungen die veresterten Fettsäuren im Glycerid nachgewiesen werden können. In Zahlen ausgedrückt ergibt sich folgendes Elutionsprofil:

30:0 < 32:0 < 34:0 < 36:0 < 38:0 < 40:1 < 42:3 < 40:0 < 42:1 < 42:0 < 44:1 < 44:0 < 46:1.

Die Darstellung von Kakaobutter ist im TIC-Chromatogramm 5-12 abgebildet. Aus den Signalen des Totalionenstroms lassen sich die Massenspuren für 7 Triglyceride extrahieren, die sich wie folgt darstellen:

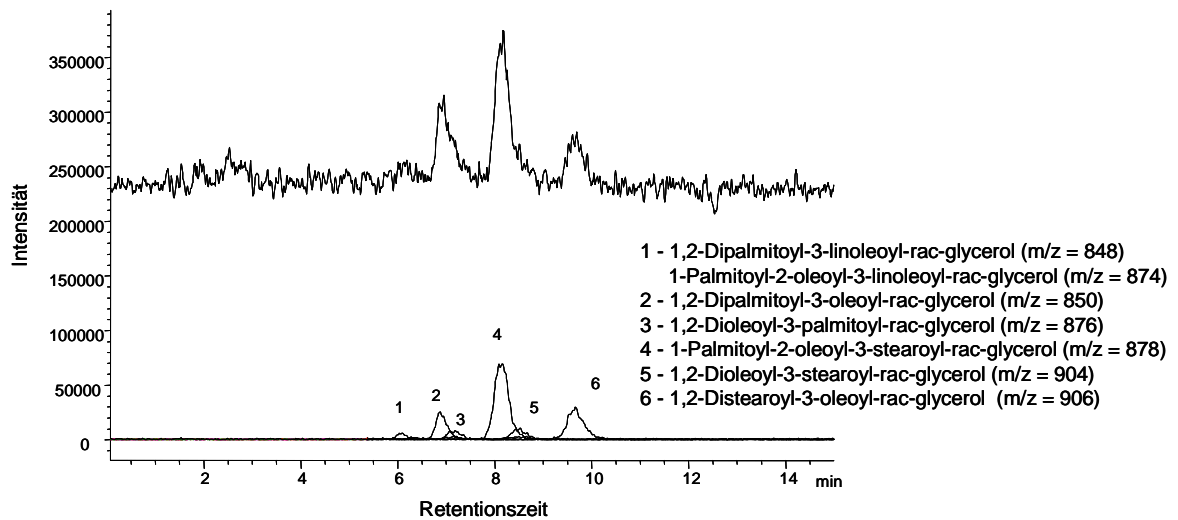


Abbildung 5-12.

Chromatographische Trennung der Kakaobutter mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.0796 mg/ml.

Die Masse $m/z = 848$ kann für 1,2-Dipalmitoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol und ebenso für 1-Palmitoleyl-2-palmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol stehen. MS/MS-Fragmentierungsexperimente geben Aufschluss über die veresterten Fettsäuren. Die Massenspuren 850, 876 und 906 stehen für mehrere Kombinationsmöglichkeiten von veresterten Fettsäuren. Das Elutionsprofil für Kakaobutter stellt sich in Zahlenkombination wie folgt dar:

50:2 < 52:3 < 50:1 < 52:2 < 52:1 < 54:2 < 54:1.

Die Abbildung 5-13 zeigt das TIC-Chromatogramm von Mandelöl. Aus den Signalen des Chromatogramms lassen sich die Massenspuren von 8 verschiedenen Ammonium-Addukten der Triglyceride extrahieren.

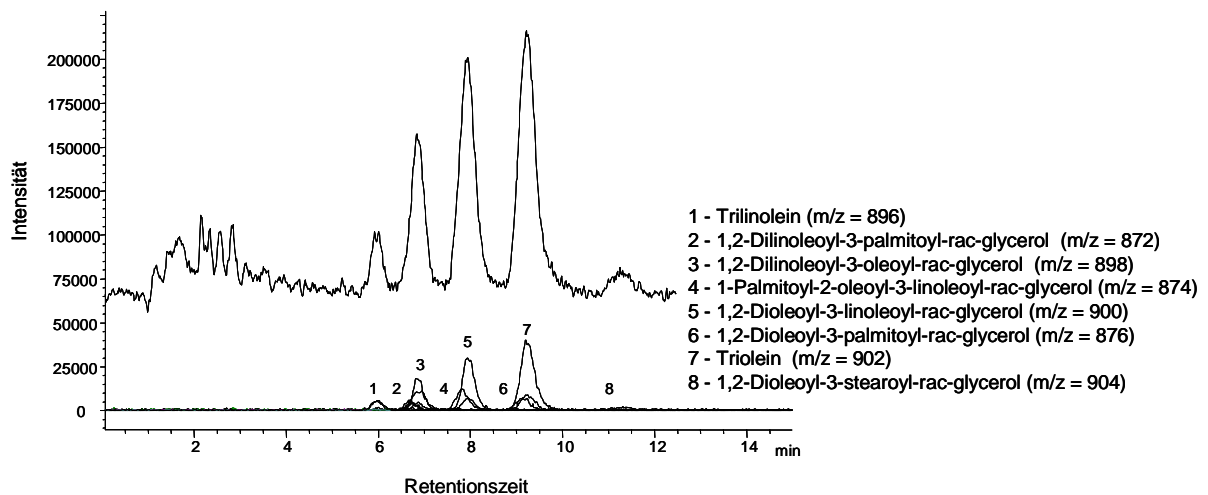


Abbildung 5-13.

Chromatographische Trennung des Mandelöls mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.0476 mg/ml.

Die Massenspuren von 872, 898, 900, 876 und 902 stehen für mehrere Kombinationen veresterter Fettsäuren. In der Abbildung wurden die Triglyceride genannt, die am wahrscheinlichsten sind aufgrund der Einteilung in die Gruppe der ölsäurereichen Triglyceride. Das Elutionsprofil in Zahlenkombinationen ausgedrückt, stellt sich wie folgt dar:

54:6 < 52:4 < 54:5 < 52:3 < 54:4 < 52:2 < 54:3 < 54:2.

Zur Gruppe der linolsäurereichen Öle gehört das Sonnenblumenöl. In Abbildung 5-14 ist das TIC-Chromatogramm von Sonnenblumenöl dargestellt. Aus den 4 nicht basisliniengetrennten Signalen des Totalionenstroms lassen sich die Massenspuren von 9 Triglyceriden extrahieren.

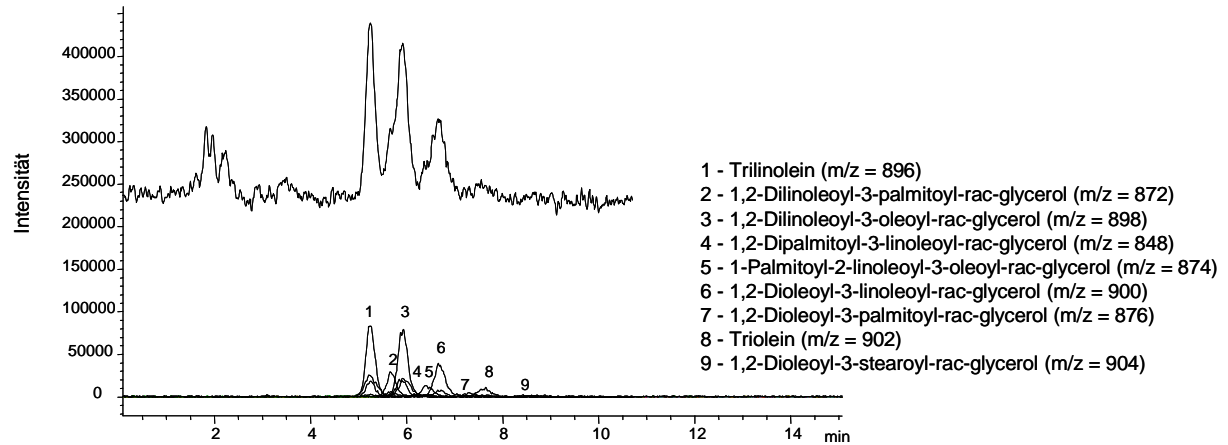


Abbildung 5-14.

Chromatographische Trennung des Sonnenblumenöls mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.0704 mg/ml.

Im Sonnenblumenöl stehen einige m/z-Zahlen für mehrere Kombinationsmöglichkeiten der veresterten Fettsäuren in den Triglyceriden bei gleicher molekularer Masse. Die Triglyceride eluieren in Folge von der stationären Phase:

54:6 < 52:4 < 54:5 < 50:2 < 52:3 < 54:4 < 52:2 < 54:3 < 54:2.

In 5-15 ist das Chromatogramm des Sojaöls abgebildet. Aus dem Totalionenstrom lassen sich die Massenspuren von 11 verschiedenen Triglyceriden extrahieren.

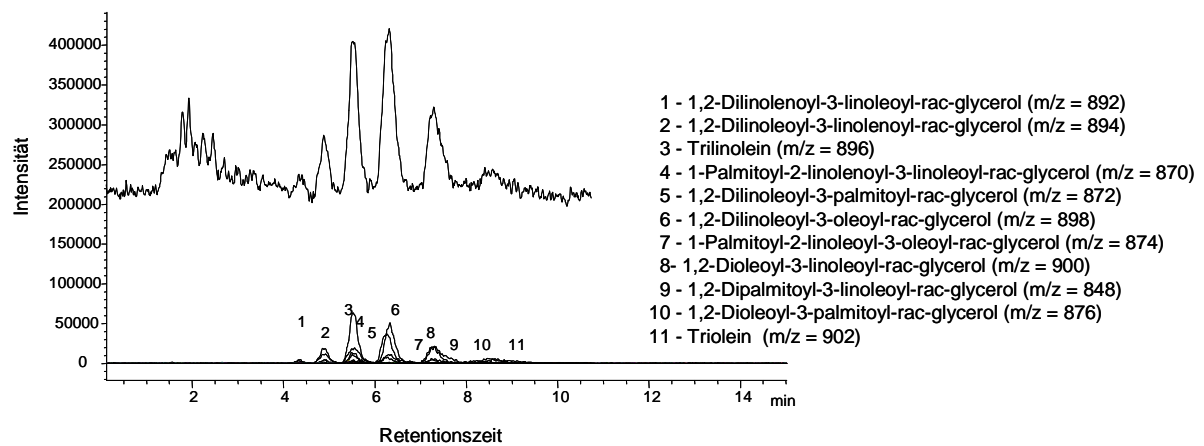


Abbildung 5-15.

Chromatographische Trennung des Sojaöls mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.0812 mg/ml.

Für die Massenspuren 894, 896, 872, 898, 900, 876 und 902 sind mehrere Kombinationen von Fettsäuren möglich. Das Elutionsprofil für Sojaöl lässt sich in Zahlen wie folgt darstellen:

54:8 < 54:7 < 54:6 < 52:5 < 52:4 < 54:5 < 52:3 < 54:4 < 50:2 < 52:2 < 54:3.

Das Jojobaöl gehört zur Klasse der flüssigen Wachse und wurde als einziges Wachs chromatographisch untersucht. Die Bienenwachse eluieren unter den chromatographischen Bedingungen nicht von der stationären Phase. Die hochmolekularen unpolaren Ester und die Löslichkeit der Bienenwachse verhindern eine Elution. Die Massenspektren der Ester zeigen als Quasi-Molekular-Ionen die Ammonium-, Natrium- und Kalium-Addukten sowie die Protonen-Addukte. In der Abbildung 5-16 ist das TIC-Chromatogramm des Jojobaöls dargestellt. Aus den Signalen des Totalionenstroms lassen sich die Massenspuren von 4 verschiedenen Estern extrahieren. Die Elutionsfolge ist:

38:2 < 40:2 < 42:2 < 44:2.

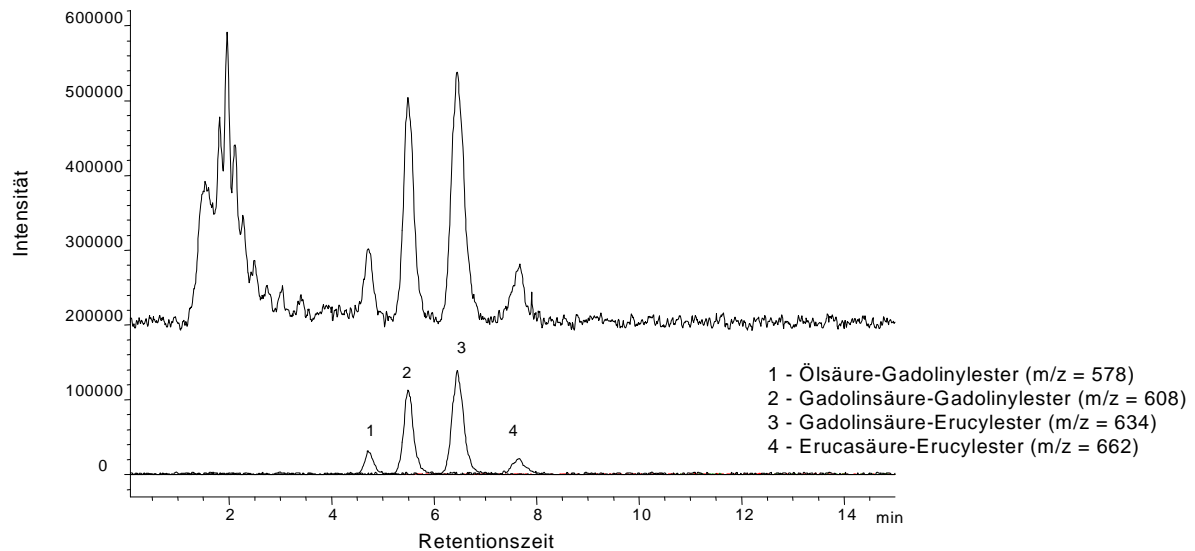


Abbildung 5-16.

Chromatographische Trennung des Jojobaöls mit der Trennsäule LiChrospher-100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.0612 mg/ml.

In Abbildung 5-17 ist die chromatographische Trennung von Rizinusöl dargestellt. Die Triglyceride des Rizinusöls bilden als Quasi-Molekular-Ionen das Protonen-Addukt. Die Zugabe von Ammoniumacetat zum Methanol führt nur zu einer geringen Bildung von Ammonium-Addukten. Aus dem Totalionenstrom des Rizinusöls lassen sich die Massenspuren für 6 verschiedene Triglyceride extrahieren. Das Elutionsprofil stellt sich wie folgt dar:

54(3-OH):3 < 54(2-OH):5 < 54(2-OH):4 < 52(2-OH):2 < 54(2-OH):3 < 54(2-OH):2).

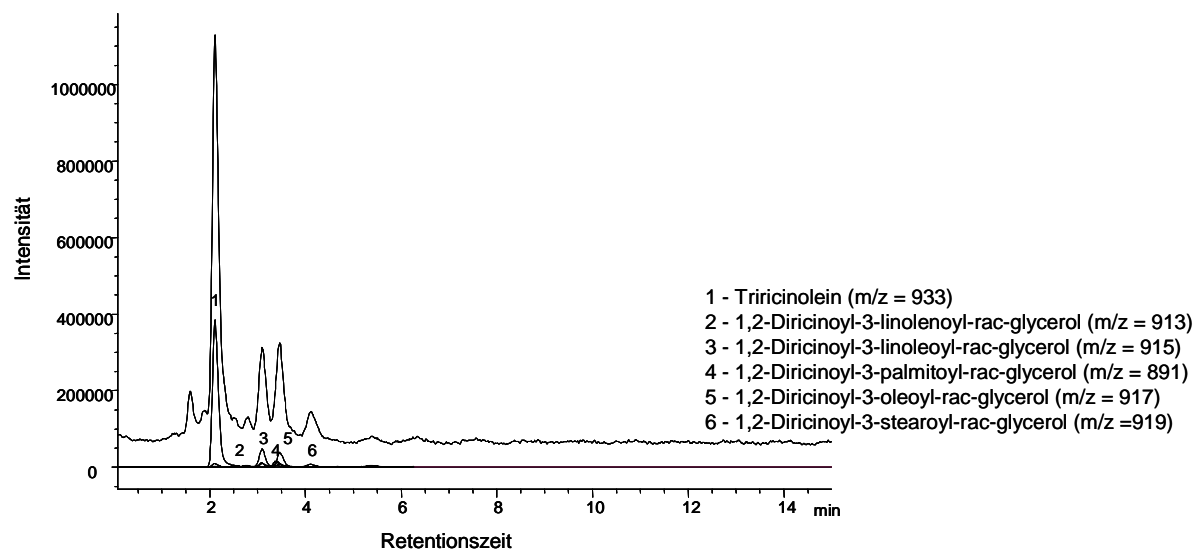


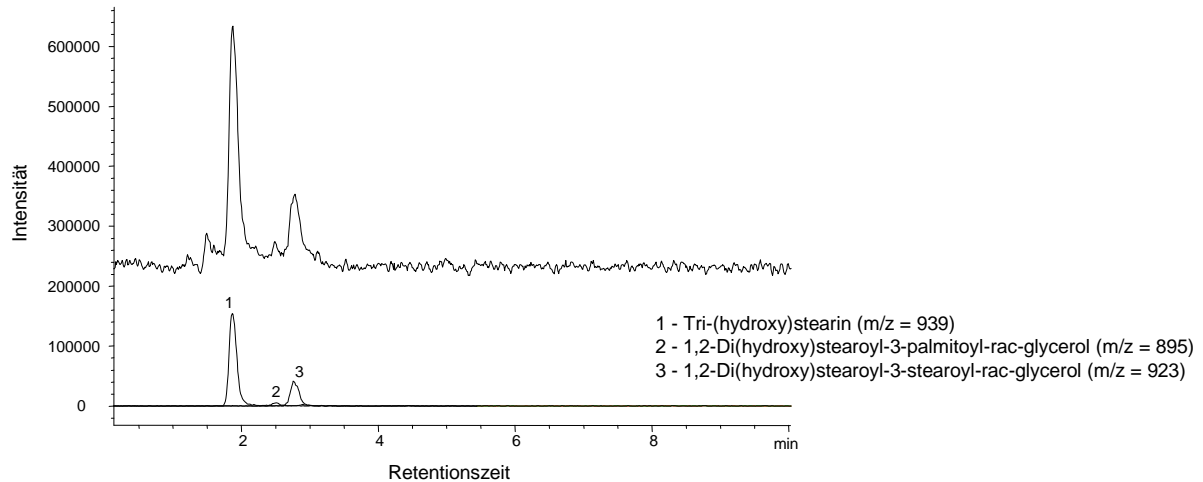
Abbildung 5-17.

Chromatographische Trennung des Rizinusöls mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.064 mg/ml.

Die quantitative Bestimmung des Rizinusöls in kosmetischen Formulierungen ist bei der LC/MS-Methode ohne Änderung des Gradienten möglich. Für den Nachweis eines Rohstoffes im kosmetischen Mittel wurde im SIM Mode gemessen. Dafür werden 1 oder 2 Massen des Rohstoffes ausgewählt und nur diese Massenspuren detektiert.

Hydriertes Rizinusöl wird ebenfalls in kosmetischen Mitteln eingesetzt und das Chromatogramm ist in 5-18 abgebildet. Die detektierten m/z-Verhältnisse bestätigen die Hydrierung der ungesättigten Fettsäuren. Im Massenspektrum werden als Quasi-Molekular-Ionen die Protonen-Addukte detektiert. Daneben finden sich noch Natrium-Addukte und Kalium-Addukte. Die Ammonium-Addukte werden in ihrer Bildung unterdrückt. Natrium-Addukte und Protonen-Addukte konkurrieren miteinander und zeigen gleiche Intensität in den Massenspektren. Durch die Hydrierung halbiert sich die Anzahl der im hydrierten Rizinusöl enthaltenen Einzelkomponenten. Aus der Ricinolsäure entsteht die 12-Hydroxystearinsäure und aus der Linolen-, Linol- und Ölsäure die Stearinsäure. Das Elutionsprofil für die 3 Substanzen sieht wie folgt aus

54(3-OH):0 < 52(2-OH):0, < 54(2-OH):0.

**Abbildung 5-18.**

Chromatographische Trennung des hydrierten Rizinusöls mit der Trennsäule Li-Chrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Standardkonzentration = 0.056 mg/ml.

Durch Ionisierung der Moleküle in der Ionenquelle und durch Trennung der Massen mit dem Quadrupol, finden sich im Massenspektrum verschiedene m/z-Zahlen für eine Substanz wieder. Triglyceride, die z. B. keine oxidierten Fettsäuren enthalten, sind schwer ionisierbar. Die Zugabe von NH_4^+ , Na^+ oder K^+ -Ionen in die mobile Phase fördert die Bildung dieser Addukte und sie können als Quasi-Molekular-Ionen mit dem Massenspektrometer detektiert werden. Ester und Triglyceride mit oxidierten Fettsäuren bilden als Quasi-Molekular-Ionen ebenso Protonen-Addukte. Das Massenspektrum 5-19 stellt für das Triglycerid Triolein die detektierten Quasi-Molekular-Ionen dar.

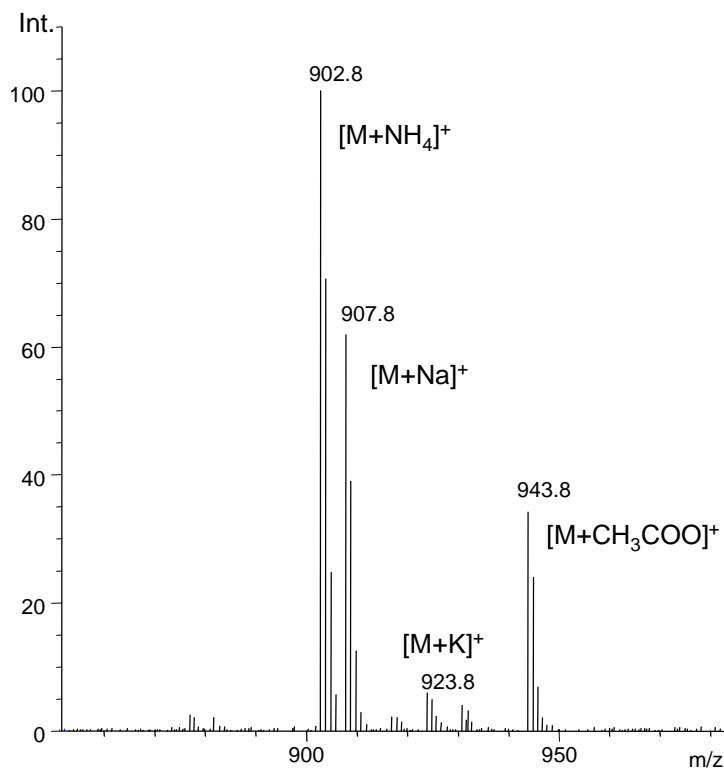


Abbildung 5-19.

Massenspektrum des Triglycerides Triolein aus dem Mandelöl.

Die molekulare Masse des Trioleins beträgt 884 g/mol. Im Massenspektrum sind als Molekül-Ionen das Ammonium-Addukt $[M+18]^+$, das Natrium-Addukt $[M+23]^+$, das Kalium-Addukt $[M+39]^+$ und das Acetat-Addukt $[M+59]^+$ sichtbar. Ammonium- und Acetat-Addukte entstehen durch die Zugabe der Ionisierungshilfe. Verzichtet man auf diese sind im MS nur Natrium- und Kalium-Addukte sichtbar. Ohne Zugabe einer Ionisierungshilfe sind die Triglyceride nicht empfindlich genug nachweisbar. Im MS ist auch eine Verteilung der Massen zu beobachten, was sich auf die Existenz des natürlichen Isotopes ^{13}C zurückführen lässt. Die Bildung von Ammonium-Addukten konkurriert mit der von Natrium-Addukten. Es ist kein konstantes Verhältnis zwischen beiden zu ermitteln. Die Entstehung von Ammonium-Addukten lässt sich durch die Zugabe von NaAc zur mobilen Phase verhindern.

Die Ester bilden als Quasi-Molekular-Ionen Protonen-Addukte im Massenspektrum. In der Abbildung 5-20 ist das MS von Gadolinsäure-Erucylester aus dem Jojobaöl dargestellt. Daneben entstehen ebenso die Addukte $[M+18]^+$, $[M+23]^+$ und $[M+39]^+$.

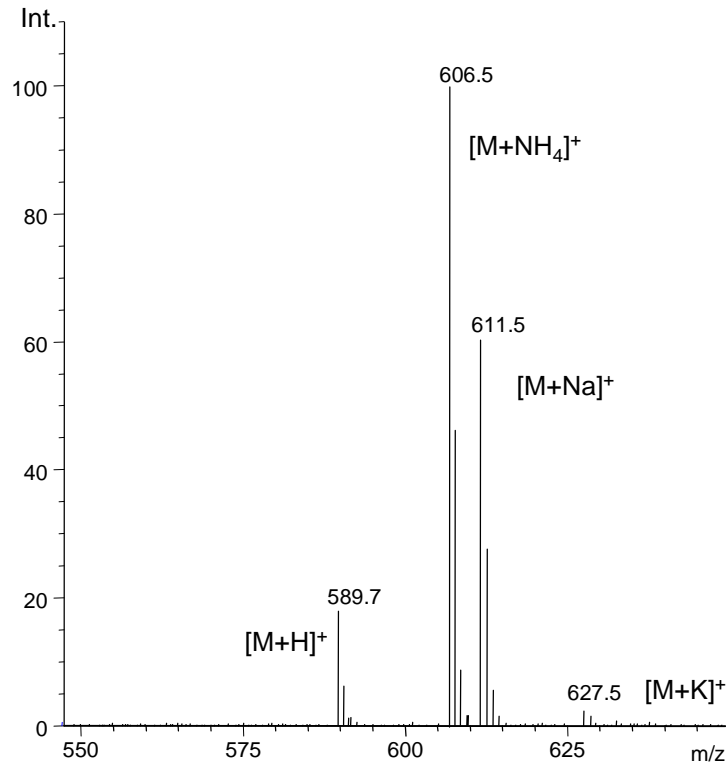


Abbildung 5-20.

Massenspektrum des Esters Gadolinsäure-Erucylester aus dem Jojobaöl.

Die Intensität des Quasi-Molekular-Ions $[M+H]^+$ im Massenspektrum ist abhängig von der Ionisierbarkeit der Moleküle. Die Triglyceride des Rizinusöls sind aufgrund der oxidierten Fettsäuren leicht ionisierbar. Dies drückt sich in einer Intensität von 100 % für das Quasi-Molekular-Ion $[M+H]^+$ aus.

Einige kosmetische Rohstoffe sind mit der LC/MS-Methode nicht chromatographierbar. Zu den Rohstoffen gehören die Bienenwachse und hydriertes Rapsöl.

5.1.3 Vergleich von HPLC-ELSD mit LC/MS

Eine Möglichkeit des Vergleiches ist die graphische Darstellung der Elutionsfolge von gesättigten und ungesättigten Standard-Acylglycerinen. Die Elutionsprofile von HPLC-ELSD und LC/MS differieren aufgrund der unterschiedlich verwendeten chromatographischen Bedingungen. Die Charakterisierung der Fette, Öle und Wachse ergab für einige Rohstoffe Übereinstimmungen mit beiden Methoden. Zu diesen Rohstoffen gehören u. a. Mandelöl, Sojaöl, Jojobaöl, Rizinusöl und hydriertes Ri-

zinusöl. Bei weiteren Beispielen erhielt man mit der LC/MS-Methode mehr Massenzahlen für Triglyceride als Signale im HPLC-ELSD-Chromatogramm, wie z. B. für Kokosnussöl und Kakaobutter. In den Diagrammen in 5-21 und 5-22 ist das Elutionsprofil für die Standard-Acylglycerine dargestellt. Die Anzahl der C-Atome der veresterten Fettsäuren wurde gegen die Retentionszeit aufgetragen. Dabei wurde zwischen gesättigten sowie 1fach bis 9fach ungesättigten Triglyceriden unterschieden.

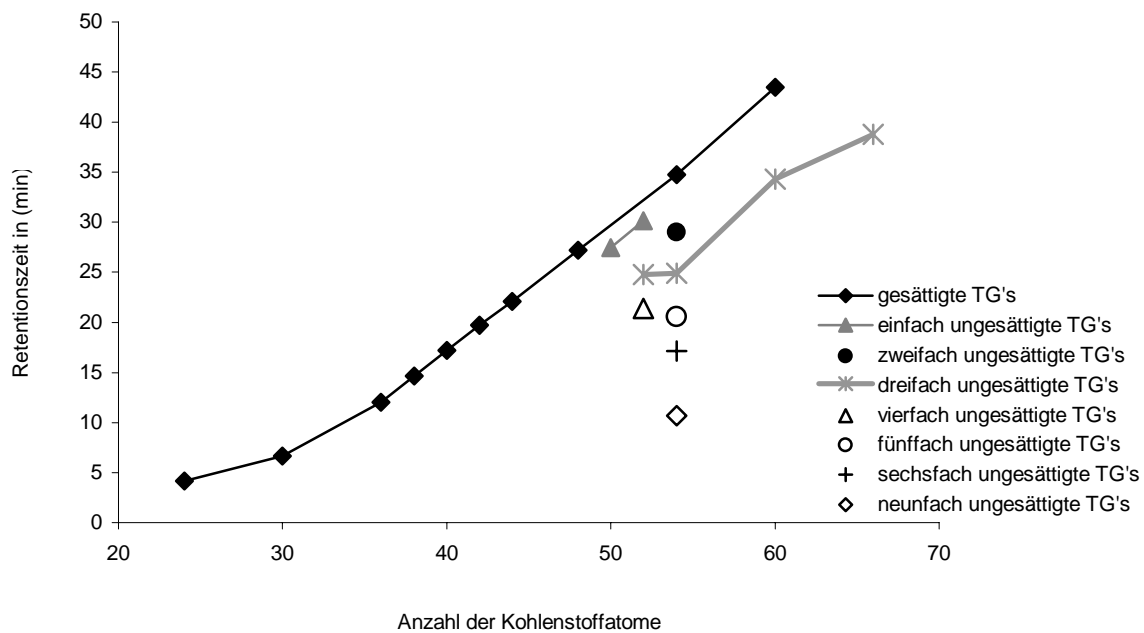


Abbildung 5-21.

Darstellung des Elutionsprofils der HPLC-ELSD-Methode mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm).

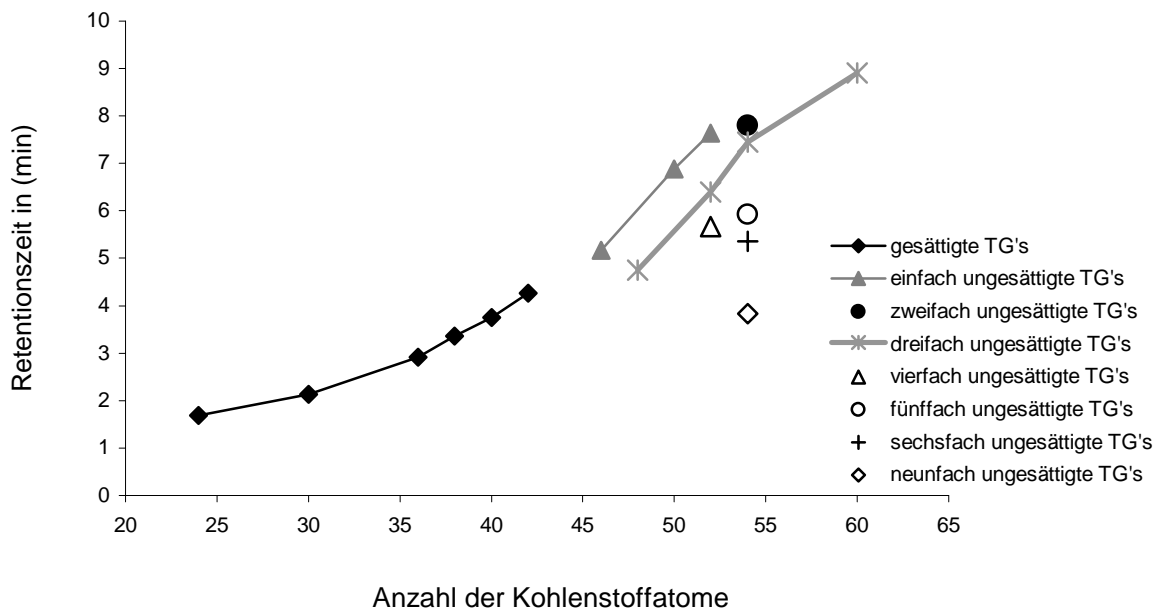


Abbildung 5-22.

Darstellung des Elutionsprofils der LC/MS-Methode mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μ m (125*2 mm).

Mit der HPLC-ELSD-Methode können gesättigte Triglyceride mit höherem Molekulargewicht eluiert werden. Im Vergleich zu Literaturdaten [93,118] ist es mit der HPLC-ELSD-Methode möglich mit dem binären Gradienten aus Acetonitril/Aceton gesättigte Triglyceride wie Tristearin und Triarachin zu eluieren. Tristearin und Triarachin lösen sich nicht vollständig in Aceton und werden deshalb in einem unpolaren Lösungsmittel gelöst. In der Literatur wurden mobile Phasen bestehend aus Acetonitril und Chloroform für die isokratische Elution langkettiger gesättigter Triglyceride eingesetzt.

Wie in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben, eluieren die ungesättigten Triglyceride früher im Vergleich zu den gesättigten. Subtrahiert man für eine Doppelbindung 2 C-Atome von der Gesamtzahl der C-Atome sollte dies mit der C-Zahl des entsprechenden gesättigten Triglycerides übereinstimmen und die Elution mit gleicher Retentionszeit erfolgen. Vergleicht man die Retentionszeiten miteinander ist festzustellen, dass durch Substraktion von 2 C-Atomen für eine Doppelbindung nicht die gewünschte C-Zahl erhalten wird, die mit der Retentionszeit identisch ist. Für die Gradientenelution der HPLC-ELSD wurde durch Auftragen der C-Zahl der gesättigten

Triglyceride gegen den Logarithmus der Retentionszeit die hypothetische C-Zahl der ungesättigten Triglyceride mittels einer Exponentialfunktion berechnet. In der Abbildung 5-23 ist das Diagramm für die HPLC-ELSD-Methode dargestellt.

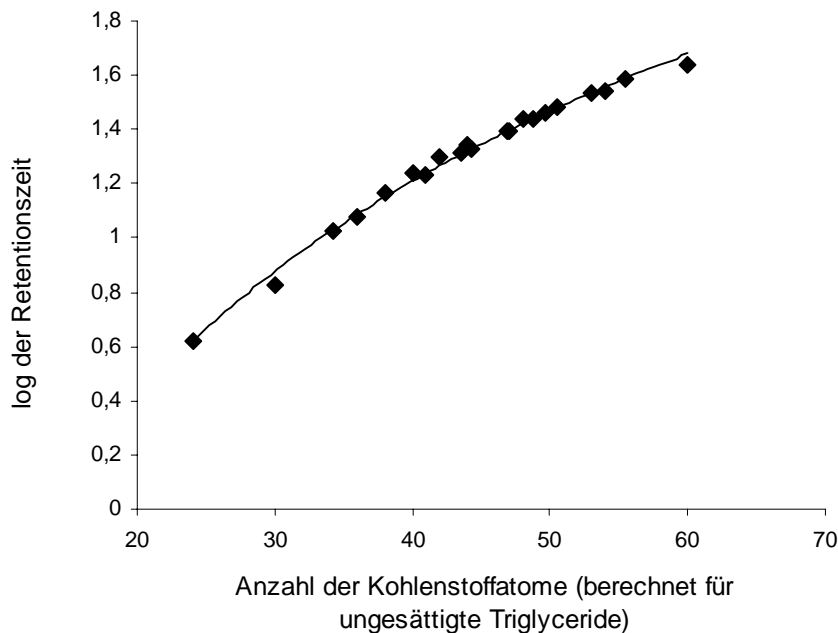


Abbildung 5-23.

Darstellung der Anzahl der C-Atome gegen den Logarithmus der Retentionszeit für die HPLC-ELSD-Methode (Gradientenelution). Es besteht eine exponentielle Abhängigkeit die sich durch die Gleichung $x = e^{(y+3.063)/1.1583}$ ausdrücken lässt.

Die LC/MS ermöglichte eine isokratische Trennung der Triglyceride. Das Ergebnis stellt keine exponentielle Abhängigkeit sondern eine lineare dar, wenn die Summe der C-Atome gesättigter Fettsäuren gegen den Logarithmus der Retentionszeit aufgetragen wird. Für beide stationären Phasen, die für die chromatographische Trennung verwendet wurden, ergab die Auswertung verschiedene funktionelle Abhängigkeiten. In 5-24 und 5-25 sind die Diagramme für beide stationären Phasen abgebildet.

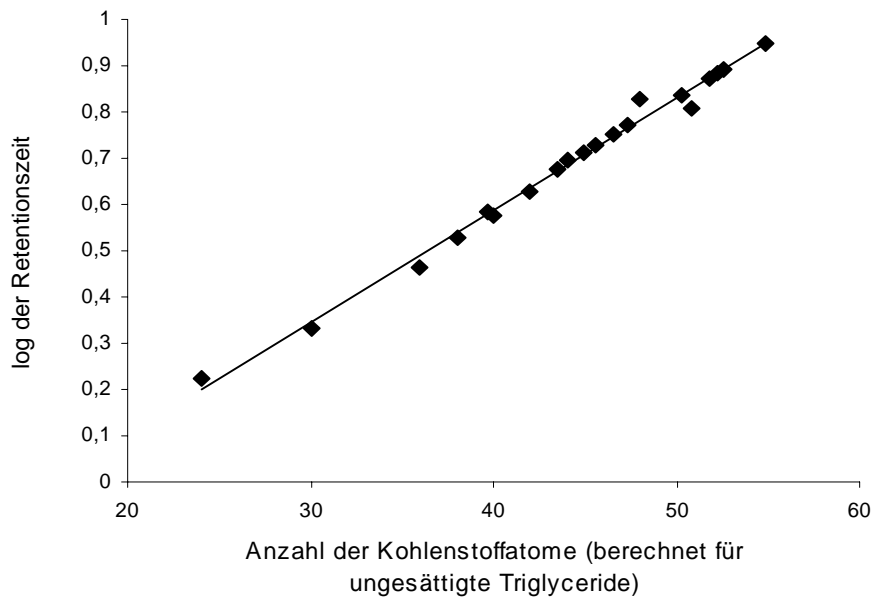


Abbildung 5-24.

Darstellung der Anzahl der C-Atome gegen den Logarithmus der Retentionszeit für die LC/MS mit der stationären Phase LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm). Es besteht eine lineare Abhängigkeit die sich durch die Gleichung $x = (y + 0.3805)/0.0242$ ausdrücken lässt.

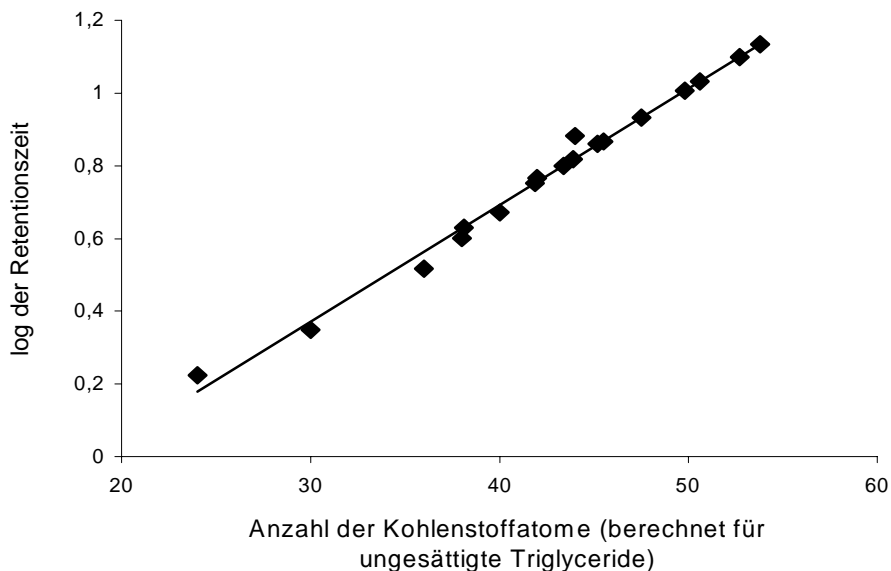


Abbildung 5-25.

Darstellung der Anzahl der C-Atome gegen den Logarithmus der Retentionszeit für die LC/MS mit der stationären Phase GROM-SIL Octyl-5 CP, 5 μm (125*2 mm). Es besteht eine lineare Abhängigkeit die sich durch die Gleichung $x = (y + 0.5924)/0.0321$ ausdrücken lässt.

Verallgemeinernd lässt sich festhalten, dass bei der isokratischen Elution eine lineare Abhängigkeit zwischen der C-Zahl der veresterten Fettsäuren und dem Logarithmus der Retentionszeit besteht, während für die Gradientenelution der Zusammenhang nicht linear (exponentiell) ist.

Die HPLC-ELSD-Methode eignet sich für die quantitative Bestimmung einer Mischung von 1 bis 3 verschiedenen pflanzlichen Ölen. Besonders gut lässt sich Sojaöl, Sonnenblumenöl oder Traubenkernöl neben Rizinusöl quantifizieren. Gemische bestehend aus Rizinusöl, Sojaöl und Jojobaöl sind mit der HPLC-ELSD-Methode differenzierbar und die Gehalte quantitativ bestimmbar. Weisen die Fette, Öle und Wachse in den Produkten identische Leitsubstanzen auf, kann nur die Summe der Rohstoffe angegeben werden. Mit Hilfe der LC/MS-Methode lassen sich mehr als 3 verschiedene pflanzliche Öle quantifizieren, wenn die Rohstoffe über verschiedene Leitsubstanzen verfügen. Durch Einstellen der entsprechenden Quasi-Molekularionen im SIM Mode werden nur diese Signale aufgenommen.

Beide Methoden erbringen eine 93 bis 98 %ige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Probenvorbereitung ist abhängig von der Zusammensetzung des kosmetischen Mittels.

Die Nachweisgrenze der HPLC-ELSD-Methode für die Triglycerid-Standards beträgt 0.5 µg absolute Menge und ca. 1.8 µg absolute Menge für die pflanzlichen Fette und Öle. Wird bei der Detektion von Fetten, Ölen und Wachsen an der Nachweisgrenze gearbeitet, dann werden nur die Leittriglyceride detektiert. Die in geringen Konzentrationen enthaltenen Triglyceride verschwinden im Basislinienrauschen. Der Variationskoeffizient beträgt für die Triglyceride etwa 7 %. Die Detektionslimits der LC/MS-Methode liegen im Scan Mode bei 0.02 µg absolut für die Triglyceride. Im SIM Mode sind die Triglyceride auch unterhalb von 1 ng absolut detektierbar. Der Variationskoeffizient für die LC/MS-Methode liegt bei 5 % für die Triglyceride.

Für den Einsatz in der Routineanalytik sind beide Systeme geeignet. In den Anschaffungs- und Betriebskosten ist das HPLC-ELSD-System kostengünstiger als das LC/MS-System. Mit dem HPLC-ELSD-System werden keine Strukturinformationen

erhalten, die mit LC/MS möglich sind. Mit dem LC/MS-System können Substanzen empfindlicher nachgewiesen werden.

5.1.4 Vergleich von HPLC-ELSD mit LC und IR-Spektroskopie

Für die Bestimmung von pflanzlichen Fetten, Ölen und Wachsen wurden 3 Produkte verwendet, um den methodischen Aufwand und die Ergebnisse von HPLC-ELSD und präparativer Flüssigchromatographie mit IR-Spektroskopie zu vergleichen. Die Quantifizierung der Rohstoffe in den Produkten erfolgte mit der HPLC-ELSD-Methode und mit präparativer Flüssigchromatographie und anschließender IR-spektroskopischer Identifizierung. Bei den 3 ausgewählten Produkten handelt es sich um nahezu wasserfreie ölige Systeme mit einem hohen Ölanteil (> 54 %). Das Produkt A enthält Sojaöl und Rizinusöl, Produkt B Sojaöl, Rizinusöl und Jojobaöl und Produkt C Sojaöl, Rizinusöl und Avocadoöl.

Für die HPLC wurden die Produkte eingewogen, mit Aceton auf 10 ml aufgefüllt, mit dem Reax gemischt und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Lösung wurde mit einem 0.45 µm Spritzenfilter filtriert und analysiert. Eine Standardkalibrierung der Rohstoffe wurde durchgeführt. Sojaöl und Rizinusöl liegen in Gewichtsanteilen > 5 % vor. Jojobaöl und Avocadoöl wurden in die Rezepturen mit Gewichtsanteilen von < 2 % eingearbeitet. Für die quantitative Bestimmung von Jojobaöl und Avocadoöl ist bei geringen Konzentrationen eine Standardaddition erforderlich.

In Abbildung 5-26 sind die Chromatogramme der 3 Produkte dargestellt. Im Produkt A wurden Rizinusöl und Sojaöl detektiert; im Produkt B Rizinusöl, Sojaöl und Jojobaöl und im Produkt C Rizinusöl, Sojaöl und Avocadoöl. Für Jojobaöl und Avocadoöl wurden Standardadditionen durchgeführt. Rizinusöl eluiert bei der eingesetzten HPLC-Methode zu Beginn des chromatographischen Laufes und wurde von der Matrix teilweise überlagert. Deshalb wurde für Rizinusöl der Gradientenverlauf so variiert, dass sich die Elution verzögerte und störende Matrixbestandteile abgetrennt wurden.

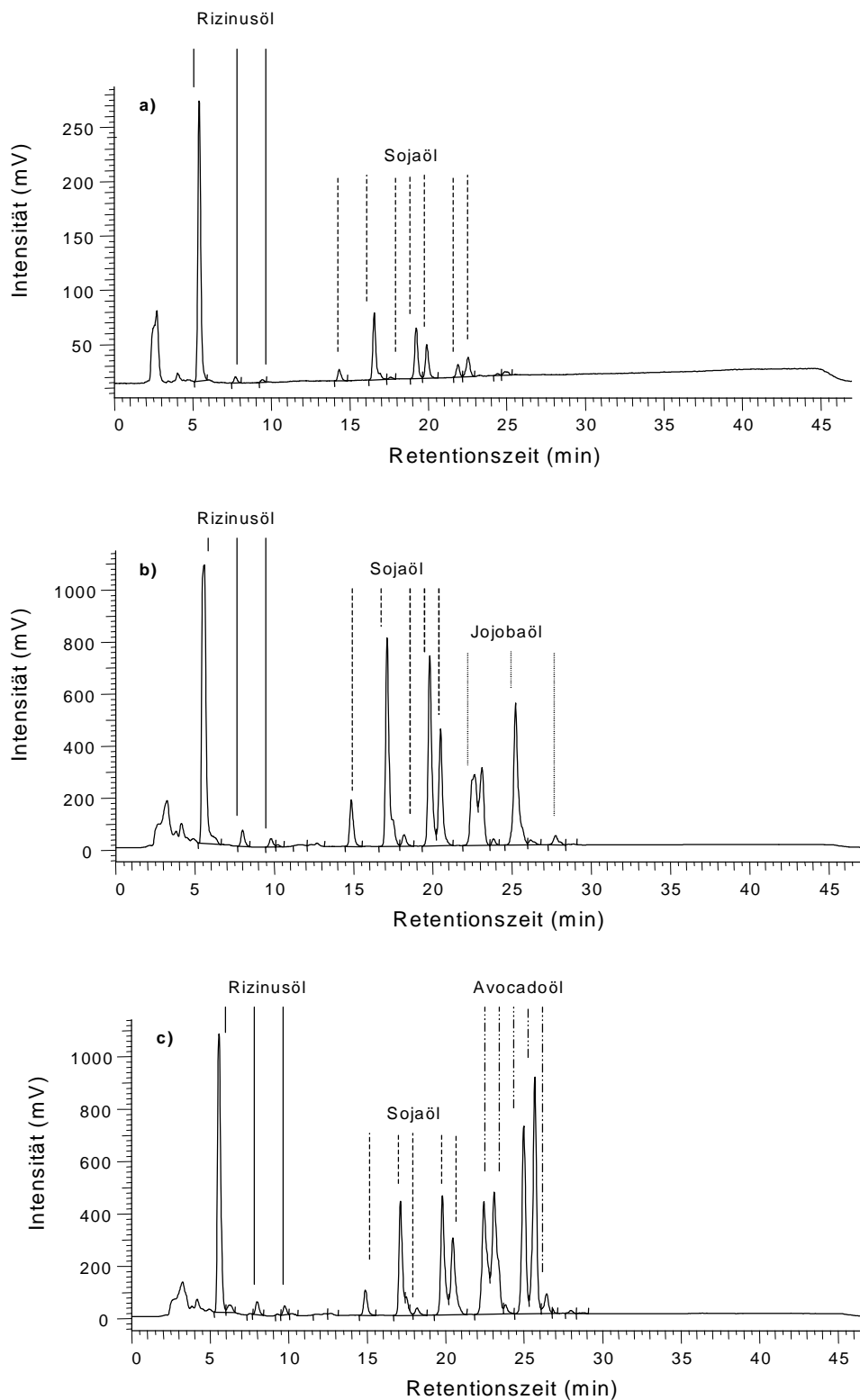


Abbildung 5-26.

Chromatographische Trennung der Produkte mit LiChrospher 100 RP-18, 5 μ m (250*4 mm). a) Produkt A mit Rizinusöl und Sojaöl, b) Produkt B mit Rizinusöl, Sojaöl und Standardaddition für Jojobaöl, c) Produkt C mit Rizinusöl, Sojaöl und Standardaddition für Avocadoöl.

Im Produkt A sind 38.5 +/- 2.0 % Sojaöl und 13.1 +/- 1.1 % Rizinusöl, im Produkt B sind 40.2 +/- 2.2 % Sojaöl, 13.9 +/- 1.9 % Rizinusöl und 0.11 +/- 0.01 % Jojobaöl und im Produkt C sind 35.3 +/- 1.7 % Sojaöl, 14.2 +/- 1.4 % Rizinusöl und 1.8 +/- 0.2 % Avocadoöl enthalten.

Die IR-spektroskopischen Untersuchungen wurden auf ATR-Einheiten (*attenuated total reflexion*) durchgeführt, da hier die Proben direkt auf der Einheit präpariert und vermessen werden können. Für die Untersuchungen mit IR-Spektroskopie wurden zuerst die Gesamtspektren der Produkte aufgenommen, dann die Trockenrückstände hergestellt und spektroskopisch untersucht. Das in Abbildung 5-27 dargestellte IR-Spektrum zeigt die Gesamtaufnahme des Produktes C. Das IR-Spektrum zeigt Banden für die OH-Valenzschwingung, die CH-, CH₂- und CH₃-Valenzschwingungen, die C=O-Valenzschwingung und die C-H-, C-C- und C-O-Deformationschwingungen. Neben den pflanzlichen Ölen liegen ebenso waschaktive Substanzen, Paraffine, Wasser usw. vor. Eine Charakterisierung der pflanzlichen Öle aus dem Gesamtspektrum ist nicht möglich. Das angefertigte Spektrum des Trockenrückstandes ist in Kapitel 9.3. dargestellt und zeigt keine Veränderung der Anzahl oder der Lage der Schwingungsbanden. Die Intensität der Schwingungsbanden im Wellenzahlenbereich von 400 bis 1000 cm⁻¹ verändert sich geringfügig.

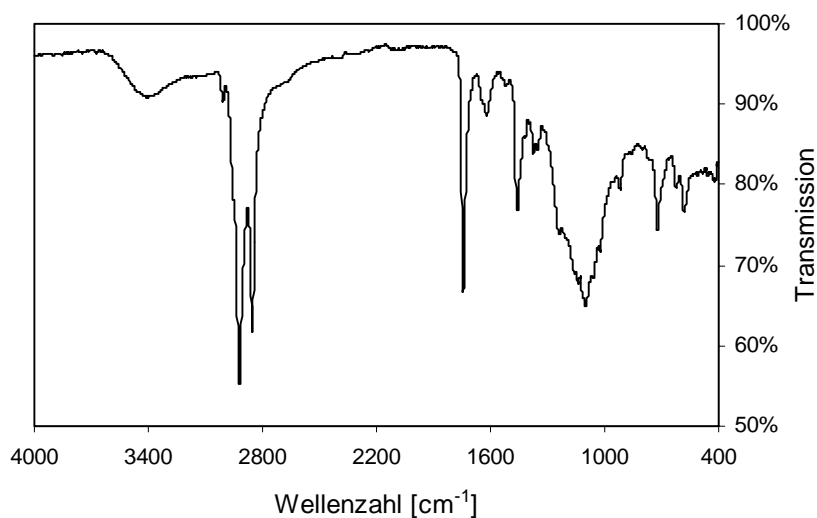


Abbildung 5-27.

IR-Spektrum des Produktes C als Gesamtaufnahme dargestellt.

Um die pflanzlichen Öle zu identifizieren, muss das Produkt in Fraktionen getrennt werden. Für die präparative Trennung wurde eine Kieselgel-Kartusche verwendet. Lösungsmittel von unpolar bis polar wurden über die Kartusche gegeben. Vom Produkt C wurden 0.078 g eingewogen und in 2 ml Heptan suspendiert. Die Suspension wurde auf die Kartusche gegeben sowie nacheinander folgende Lösungsmittel (je 5 ml):

1. Heptan
2. Petrolether
3. Petrolether + 1 % Diethylether
4. Petrolether + 3 % Diethylether
5. Petrolether + 5 % Diethylether
6. Petrolether + 10 % Diethylether
7. Petrolether + 20 % Diethylether
8. Diethylether
9. Chloroform
10. Ethanol
11. Methanol

Lösungsmittel und extrahierte Probenbestandteile wurden in Extraktionsschalen aufgefangen. Diese sind vor und nach der Extraktion zu wiegen. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel wurden die Fraktionen spektroskopisch untersucht. Die gesuchten Rohstoffe sind in den Schalen 3, 4 und 5 zu finden. Mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels wurden die polaren Komponenten des kosmetischen Mittels extrahiert. Gut ersichtlich ist dies aus der Zunahme der Bandenintensität der OH-Valenzschwingung von Schale 4 zu Schale 5, wo Rizinusöl eluierte. Rizinusöl lässt sich aufgrund der OH-Valenzschwingung seiner oxidierten Fettsäuren gut von den anderen Pflanzenölen IR-spektroskopisch unterscheiden. In 5-28 sind die IR-Spektren der Extraktionsschalen 3, 4 und 5 dargestellt. In den anderen Extraktionsschalen konnten keine pflanzlichen Öle nachgewiesen werden.

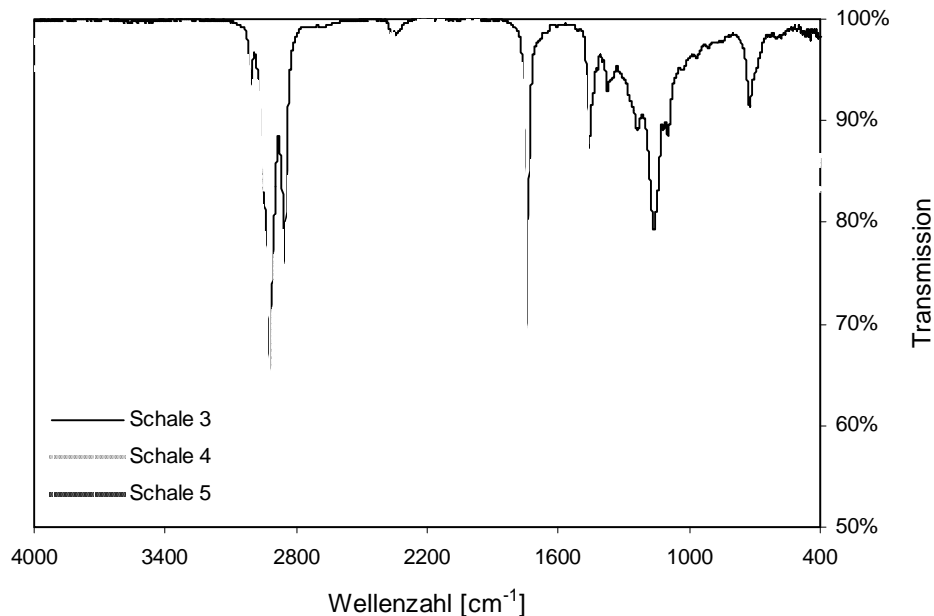


Abbildung 5-28.

IR-Spektren der Extraktionsschalen 3, 4 und 5 mit Rizinusöl, Sojaöl und Avocadoöl.

Die IR-Gesamtaufnahmen der Produkte A und B sowie die IR-Spektren der Rohstoffe Rizinusöl, Sojaöl, Jojobaöl und Avocadoöl sind im Kapitel 9.3.6 abgebildet. In den Extraktionsschalen 3, 4 und 5 fanden sich ca. 39 % des angegebenen Produktes wieder. Die Wiederfindungsrate für dieses Experiment lag bei 103.9 %.

Die Auswertung der IR-Spektren ist mit Hilfe von Vergleichsspektren möglich; jedoch sehr zeitaufwendig, wenn man nicht über IR-spektroskopische Erfahrung verfügt. Da keine komplette Trennung des kosmetischen Produktes in die Einzelbestandteile gelingt, sondern immer Mischungen bei der Kartuscentrennung entstehen, ist die Auswertung der Fraktionen schwierig. Hier wurde nur der Gesamtgehalt an pflanzlichem Öl abgeschätzt. Mit Hilfe der HPLC-ELSD können die einzelnen Öle identifiziert und quantifiziert werden. Das Erstellen der Kalibrierfunktionen für die einzelnen Rohstoffe sowie die Standardaddition ist zeitaufwendiger als die IR-spektroskopische Analyse der einzelnen Fraktionen. Die Berechnung des Gehaltes an pflanzlichen Ölen mit externer Standardkalibrierung ist exakter als die Abschätzung des Gehaltes in verschiedenen Fraktionen. Auftretende Matrixeinflüsse führen zu einer Erhöhung der relativen Standardabweichung der Ergebnisse.

5.1.5 Ansätze für die Erstellung einer Rohstoffdatenbank

Die zu erstellende Rohstoffdatenbank soll die originalen Messwerte, die Chromatogramme, beinhalten. Die Datenbank kann die analytischen Informationen verschieden repräsentieren. Chromatographische Daten gehören zu den numerischen Daten. Die Beschreibungen von Probenkennungen oder Methodenspezifika sind typische alphanumerische Daten.

Die Informationen gelangen im Verlaufe mehrerer Verarbeitungsschritte in die Datenbank. Eine Datenbank setzt sich aus verschiedenen Dateien zusammen; dazu zählen die Quell- und Bibliotheksdatei, die Austauschdatei und die Arbeits- und Indexdatei. Zur Verarbeitung der Datenbankinformationen sind dann zusätzliche Software-Routinen erforderlich, wie z. B. Bibliothekssuchverfahren, künstliche Intelligenz und Expertensysteme [149].

In der Quelldatei liegen die gemessenen Rohdaten vor. Nicht-relevante Daten werden durch Filterung, Transformation oder Kompression eliminiert und es entsteht eine Bibliotheksdatei, die für die Archivierung geeignet ist. In die Quelldatei werden die Originaldaten eingespeist. Ein Chromatogramm zeichnet in Abhängigkeit von der Zeit die Änderung der Intensität auf. In die Quelldatei können als numerische Daten, die Nettoretentionszeit, die Intensitätsverteilung der Signale sowie die Zuordnung der Verbindungen eingegeben werden. Um Chromatogramme verschiedener Systeme einfacher vergleichen zu können, ist die Eingabe der HPLC-Kenngrößen – Kapazitätsfaktor k' und Trennstufenzahl N_{th} – sinnvoll.

Die Bibliotheksdatei besteht in der Analytik gewöhnlich aus einem Kopfteil (Header) und dem Rest in Form eines Datenblocks. Der Header enthält Informationen zur Datei selbst sowie Steuerparameter. Im Datenblock sind die unterschiedlichen Datensätze abgelegt.

Die Arbeitsdatei enthält die für die Anwendung notwendigen Daten. Durch eine geeignete Organisation soll ein möglichst schneller Zugriff garantiert werden. Des Wei-

teren bestimmt der Suchalgorithmus die Anordnung der Daten mit. Der Zugriff auf andere Daten bzw. Dateien verläuft über Indexdateien.

Nachdem in die Quelldatei die numerischen Daten der bekannten Rohstoffe und Standard-Acylglycerine eingelesen wurden, soll die Datenbank die Identifizierung von Triglyceriden in unbekanntem Substanzgemischen unterstützen. Gemische von Fetten, Ölen und Wachsen werden immer häufiger in kosmetische Mittel eingesetzt und eine Differenzierung der einzelnen Rohstoffe wird immer schwieriger. Eine Datenbank soll diese Aufgabe nach Eingabe der entsprechenden Informationen übernehmen und auch das Verhältnis der beinhalteten Rohstoffe angeben können.

5.1.6 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die Entwicklung der beiden chromatographischen Methoden ermöglicht die Charakterisierung und Identifizierung von Fetten, Ölen und Wachsen in kosmetischen Mitteln. Verschiedene Triglyceride, Alkohole, Sterole und Sterylester können einfach und präzise im Produkt quantifiziert werden. Die Etablierung dieser beiden Methoden soll die bisherigen Bestimmungsmethoden, die gaschromatographische Bestimmung sowie die IR-spektroskopische Bestimmung, ablösen.

Im Vergleich zu Literaturdaten [12,67,93,118] kann mit der HPLC-ELSD eine Elution von Triglyceriden erfolgen, die gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit 8 bis 22 C-Atomen beinhalten. Der nichtwässrige Gradient aus Aceton und Acetonitril ermöglicht die Differenzierung und Identifizierung kosmetischer Rohstoffe. Auf den Einsatz chlorierter Lösungsmittel für die chromatographische Trennung wurde verzichtet. Der Gradientenverlauf der HPLC-ELSD-Methode ist noch nicht ausgeschöpft. Eine Variation in der prozentualen Zusammensetzung der mobilen Phase eröffnet Möglichkeiten für den Gewinn zusätzlicher Informationen.

Beide chromatographischen Methoden sind selektiv für die zu analysierenden Substanzen und direkt anwendbar. Mit Hilfe der externen Standardkalibrierung ist eine exakte Bestimmung des Gehaltes an Fetten, Ölen und Wachsen in kosmetischen Produkten möglich.

5.2 Bestimmung von neutralen Lipiden in kosmetischen Mitteln

In kommerziell erhältlichen Produkten wurde der Gehalt an Fetten, Ölen und Wachsen quantitativ bestimmt. Fette, Öle und Wachse werden in höheren Konzentrationen in Duschölen, Badeölen und Duschprodukten eingesetzt. Weiterhin wird eine Vielzahl von Fetten, Ölen und Wachsen aufgrund ihrer hautpflegenden Eigenschaften (siehe Kapitel 3.2) in kosmetische Mittel eingearbeitet.

In Duschölen befindet sich häufig Rizinusöl und Sojaöl in Anteilen von über 10 % (w/w). Neben Rizinusöl und Sojaöl wurden in kosmetischen Formulierungen ebenso Sonnenblumenöl, Jojobaöl und Traubenkernöl in Konzentrationen < 3 % (w/w) quantitativ bestimmt. Für die Lippenstiftherstellung werden die Farbpigmente in einem Öl suspendiert. Die meisten Hersteller dekorativer Kosmetik benutzen Rizinusöl zur Suspendierung der Pigmente.

Im Duschöl D (Produkt D) wurden die Rohstoffe Sojaöl, Rizinusöl und Jojobaöl quantitativ mit HPLC-ELSD bestimmt. Hierfür wurden Kalibrierfunktionen für die Rohstoffe Rizinusöl, Sojaöl und Jojobaöl erstellt. Die Einwaage von Rizinusöl betrug 53.95 mg; von Sojaöl 64.40 mg und von Jojobaöl 49.95 mg jeweils in 10 ml Aceton. Aus den Stammlösungen wurden die Verdünnungen 1:50, 1:20, 1:10, 1:5 und 1:2 hergestellt und jede Verdünnung doppelt injiziert. Für diese quantitative Bestimmung wurde am Detektor der Empfindlichkeitsbereich 8 gewählt. Für die Kalibrierung wurde das Signal mit der prozentual höchsten Signalfäche ausgewählt. Bei diesem Produkt war es möglich alle 3 Rohstoffe nebeneinander mit HPLC-ELSD zu bestimmen. Das Lichtstredetektionsprinzip verlangt eine doppelt logarithmische Auftragung, um eine lineare Kalibrierfunktion zu erhalten. Es wird der Logarithmus der Konzentration ($\log c$) gegen den Logarithmus der Signalfäche ($\log A$) aufgetragen. Die gemessenen Werte werden ins Diagramm eingetragen und mit Hilfe der linearen Regression wird eine Ausgleichsgerade berechnet. Für Rizinusöl erhält man in diesem Beispiel die Funktion $y = 1.3073x + 3.3409$, für Sojaöl $y = 1.4671x + 2.0436$ und für Jojobaöl $y = 1.3388x + 2.0933$. Das Produkt wird doppelt eingewogen und mit Konzentrationen von 2.186 mg/ml und 5.750 mg/ml mit je 20 μ l in das HPLC-ELSD-System injiziert. Nach der chromatographischen Trennung erhält man für jedes Signal die zugehörige

Peakfläche. Mit Hilfe der Geradengleichungen lassen sich die Gehalte der kosmetischen Rohstoffe im Produkt berechnen. Die Berechnung ergab für Rizinusöl einen Anteil von 8.8 %, für Sojaöl 28.0 % und für Jojobaöl 1.0 %. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte. Die relative Standardabweichung dieser Bestimmung betrug 10 %. Das untersuchte Produkt war ein Wettbewerbsmuster. Die eingesetzten Rohstoffchargen der Inhaltsstoffe des kosmetischen Mittels sind nicht bekannt. Für die Quantifizierung kommen die mir vorliegenden Rohstoffchargen zum Einsatz. Diese Rohstoffchargen müssen nicht identisch sein mit denen im Produkt. Das Ergebnis bezieht sich auf die von mir verwendeten Rohstoffe.

Bei der Bestimmung von Sojaöl und Rizinusöl im Produkt E (Duschöl) wurde aufgrund von Matrixeffekten bei der Rizinusölquantifizierung die im Gradientenverlauf geänderte HPLC-ELSD-Methode verwendet. Für Sojaöl ergab sich als Kalibrierfunktion die Geradengleichung $y = 1.4364x + 1.9747$ und für Rizinusöl $y = 1.4036x + 2.8054$. Für die Bestimmung von Sojaöl im Produkt wurden je 20 μ l der Konzentration 2.700 mg/ml und 5.665 mg/ml in das System injiziert. Die anschließende Berechnung ergab für Sojaöl einen Mittelwert von 33.4 %. Für die Bestimmung von Rizinusöl wurden 20 μ l der Lösungen 5.665 mg/ml und 13.500 mg/ml in das System injiziert. Die Berechnung ergab für Rizinusöl einen Mittelwert von 2.2 %.

In Duschprodukt F wurde der Gehalt von Traubenkernöl quantitativ bestimmt. Der Sollgehalt des Öls im Produkt beträgt 0.1 % und sollte überprüft werden. Es wurde eine Stammlösung für Traubenkernöl und daraus 5 Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0.100 mg/ml, 0.250 mg/ml, 0.500 mg/ml, 0.573 mg/ml und 1.4325 mg/ml. Jede Konzentration wurde 3fach vermessen. Die Tabelle 5-1 beinhaltet die Rohdaten der Standardkalibrierung. Neben dem x-Wert (Konzentration) sind in der Tabelle die verschiedenen y-Werte (Signalflächen), der daraus berechnete Mittelwert y_m -Wert und der Variationskoeffizient V angegeben. Der Variationskoeffizient berechnet sich, indem man die Standardabweichung s in Bezug zum Mittelwert y_m der Messwerte setzt. Der Variationskoeffizient oder „relative Standardabweichung“ wird in Prozent ausgedrückt und ermöglicht den Vergleich von Datenreihen.

Tabelle 5-1.

Rohdaten der Standardkalibrierung für Traubenkernöl

x-Wert	y ₁ -Wert	y ₂ -Wert	y ₃ -Wert	y _m -Wert	V [%]
0.1000	149128	145398	162564	152363	5.93
0.2500	478349	484831	520832	494671	4.63
0.5000	1645600	1657577	1716242	1673140	2.26
0.5730	2043268	2041976	2043838	2043027	0.05
1.4325	8368304	8536335	8400602	8435080	1.06

Der Variationskoeffizient ist für geringe Konzentrationen höher und nimmt mit zunehmender Konzentration der Standards ab.

Vom Duschprodukt F wurde ca. 1 g eingewogen und in 5 ml Aceton gelöst. Die Einwaage wurde aufgrund der geringen Sollkonzentration so hoch gewählt. Die Lösung wurde gemischt und für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Probe wurde mit einem 0.45 µm Spritzenfilter filtriert sowie 1:2 und 1:1 verdünnt gemessen.

Die x- und y_m-Werte wurden logarithmiert und in Abhängigkeit voneinander dargestellt. Mit Hilfe der linearen Regression wird die Ausgleichsgerade $y = 1.5271x + 2.0935$ ermittelt. Durch Einsetzen der logarithmierten Peakflächen der unbekannt, chromatographisch untersuchten Probe lässt sich die Konzentration in der Probe und somit der prozentuale Gehalt (w/w) ermitteln. Die Tabelle 5-2 zeigt die Rohdaten für die Berechnung der Konzentration von Traubenkernöl in Duschprodukt F.

Tabelle 5-2.

Chromatographische Rohdaten für die Berechnung der Konzentration von Traubenkernöl mit der Geradengleichung $y = 1.5271x + 2.0935$.

Einwaage [mg/ml]	y _m -Wert der Probe	log y _m	log x	x _{berechnet} [%]
96.13	174911	5.24	2.06	0.12
192.26	679253	5.81	2.43	0.14
18.56	544186	5.74	2.38	0.13

Der Gehalt von Traubenkernöl wurde mit 0.13 % +/- 0.01 % bestimmt.

Von mehreren auf dem Markt befindlichen kosmetischen Produkten – vor allem von Duschprodukten und Duschölen – wurden quantitativ die Gehalte der pflanzlichen Fette, Öle und Wachse bestimmt. Die Quantifizierungen wurden immer nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt. Die ermittelten Gehalte in diesen Mustern beziehen sich immer auf die als Standardsubstanzen verwendeten Rohstoffe. Die Aufarbeitung der Produkte wurde in Abhängigkeit der Löslichkeit des kosmetischen Mittels variiert. Fast alle Duschöle konnten mit Aceton in Lösung gebracht werden und ergaben eine klare, niederschlagsfreie Lösung. Diese Lösung wurde für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend mit einem Spritzenfilter filtriert, verdünnt und analysiert.

Es wurden diverse Produkte auf ihre Gehalte an pflanzlichen Ölen mit HPLC-ELSD überprüft, u. a. auch Lippenstifte. Die untersuchten Lippenstifte enthielten alle bis auf eine Ausnahme Rizinusöl zur Suspendierung der Farbpigmente. Der Rizinusgehalt variierte von 30 % bis 40 %. Die Probenvorbereitung der Lippenstifte gestaltete sich abweichend von der Probenvorbereitung der Duschprodukte. Von der Probe wurden ca. 50 mg in ein Röhrchen eingewogen. Als Lösungsmittel wurde 1 ml THF und 5 ml Aceton verwendet. Die Probe wurde gemischt, 10 Minuten geschüttelt und anschließend 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Farbpigmente setzen sich als Niederschlag am Boden des Röhrchens ab. Der Überstand wurde mit einem 0.45 µm Spritzenfilter filtriert, die Proben 1:20 oder 1:10 mit Aceton verdünnt und analysiert.

In einer Pflegeemulsion G wurde der Gehalt von natürlichem Bienenwachs bestimmt. Der verwendete Rohstoff für die Quantifizierung im Produkt war nicht identisch mit dem im Produkt eingearbeitetem Rohstoff. Dies war durch Vergleich der Signalverteilung des Rohstoffes und des Produktes sichtbar. Bienenwachs löst sich nur in Chloroform vollständig. Deshalb wurde die Probenaufbereitung für die Formulierungsgrundlage den Bedingungen angepasst. Von der Probe wurde ca. 1 g in 5 ml 0.1 m Natriumhydroxydlösung gelöst. Diese Lösung wurde gemischt und für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Danach wurde die Lösung mit 1 ml Chloroform versetzt. Es bildete sich ein 2-Phasen-System aus, das durch Zentrifugation eine optimale Trennung in wässrige und organische Phase ermöglichte. Die organische Pha-

se wurde für die Analytik verwendet. Der Gehalt des natürlichen Bienenwachses in dem Produkt konnte mit 0.1 bis 0.15 % angegeben werden.

Für einige Bestimmungen von pflanzlichen Ölen wurde die LC/MS-Methode im SIM Mode angewendet, um Matrixeffekte auszuschließen bzw. um empfindlicher detektieren zu können.

In Duschprodukt H wurde Sesamöl mit der LC/MS-Methode quantitativ bestimmt. Als Leittriglycerid wurde 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol ausgewählt, da es im Sesamöl in der höchsten Konzentration vorliegt. Die Detektion der Masse des Triglycerides wurde im SIM Mode durchgeführt. Bei der massenselektiven Detektion besteht eine direkte Abhängigkeit der Konzentration von der Signalfäche. Für die externe Standardkalibrierung wurde eine Stammlösung und daraus unabhängige Verdünnungen hergestellt. Die Konzentrationen der Kalibrierungslösungen enthielten 2.928 µg/ml, 5.856 µg/ml, 29.28 µg/ml und 58.56 µg/ml Sesamöl. Aus diesen Lösungen wurden 5 µl in LC/MS-System injiziert. Die Auftragung der Konzentration gegen die Signalfäche und die Berechnung der Ausgleichsgeraden ergab die Gleichung $y = 26959732x + 4982$. Mit Hilfe dieser Gleichung lies sich die Konzentration des Öles in der Probe bestimmen. Der Gehalt von Sesamöl konnte mit 0.1 +/- 0.01 % im Duschprodukt H angegeben werden.

Im Produkt I wurden Traubenkernöl und Sonnenblumenöl als Summe bestimmt. Traubenkernöl und Sonnenblumenöl weisen gleiche Leittriglyceride in unterschiedlicher Intensitätsverteilung auf. Es wurden 3 Triglyceride für die Kalibrierung ausgewählt: Trilinolein, 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol und 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol. Neben der Kalibrierung mit Standardlösungen der Fa. Sigma wurden auch für die Rohstoffe Sonnenblumenöl und Traubenkernöl Kalibrierfunktionen angefertigt. Für Traubenkernöl ergaben sich durch Auftragung der Konzentration gegen die Signalfäche folgende Geradengleichungen:

- Trilinolein (53.7 %, w/w) $y = 1292084x + 16216$,
- 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol (14.2 %, w/w) $y = 1403107x - 3904$,
- 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol (31.9 %, w/w) $y = 1415412x - 9160$.

Für Sonnenblumenöl ergaben sich die folgenden Geradengleichungen für die Triglyceride:

- Trilinolein (47.8 %, w/w) $y = 1211790x + 5404$,
- 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol (11.5 %, w/w) $y = 1285083x - 2704$,
- 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol (40.5 %, w/w) $y = 1253317x - 4274$.

Das Produkt I wurde doppelt eingewogen, gelöst und injiziert. Die Verteilung der 3 Triglyceride ergab einen Anteil von 48.9 % für Trilinolein, 14.3 % für 1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol und 36.6 % für 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol. Die ermittelten Signalfächen der Triglyceride wurden als y-Werte entsprechend in die Geradengleichungen eingesetzt und die dazugehörige Konzentration berechnet. Im Produkt I wurden 11.8 +/- 1.0 % pflanzliche Öle (Sonnenblumenöl und Traubenkernöl) nachgewiesen.

Im Produkt I wurde neben den beiden pflanzlichen Ölen auch Cholesterol bestimmt. Die Bestimmung wurde mit HPLC-ELSD durchgeführt. Die Quantifizierung verläuft nach dem gleichen Schema, wie die Bestimmung der Triglyceride. Cholesterol wurde mit einem prozentualen Gehalt von 0.08 +/- 0.01 % im Produkt nachgewiesen.

Neben Cholesterol lassen sich auch die Alkohole, Cholesterylester und Wachsester quantitativ im Produkt bestimmen. Die langkettigen Alkohole eluieren bei niedrigen Retentionszeiten. Für eine Bestimmung im Produkt ist teilweise eine aufwendige Probenvorbereitung notwendig, da die Emulsionen mehrere langkettige Alkohole und kurzkettige Triglyceride enthalten. Es kann zur chromatographischen Überlagerung mehrerer Signale kommen.

6 Methoden für die spurenanalytische Bestimmung von Ubichinonen

Ubichinone sollen in humanen Zellen nachgewiesen werden. Ubichinon-50 und Ubichinol-50 befinden sich in den Mitochondrien humaner bzw. tierischer Zellen und ist ein essentieller Bestandteil für die Energiegewinnung in der Atmungskette. In den Kapiteln 3.1.4 und 3.2.3 wurden die Eigenschaften und Funktionen von Ubichinon-50 zusammengefasst.

Für die Bestimmung von Ubichinon-50 in epidermalen Zellen wurden verschiedene Arten von humanen Zellen, wie Saugblasen-Epidermis, Zellkultur und Hautbiopsien bereitgestellt. Die Bestimmung von Ubichinon-50 in Zellen erfolgt mit empfindlichen Detektionssystemen. Dazu zählen elektrochemische und massenspektrometrische Techniken, die sich an eine chromatographische Trennung anschließen. Der Nachweis von nativem Ubichinon-50 sowie die Probenvorbereitung und die Entwicklung chromatographischer Techniken wird in diesem Kapitel näher erläutert.

6.1 Probennahme von Humanzellen

Zellen humanen Ursprungs, wie Saugblasen-Epidermis und Hautbiopsien, waren nur begrenzt verfügbar, da sie von lebenden Probanden gewonnen wurden. Die Entnahme von Humanzellen wurde nur an freiwilligen, gesunden Probanden gemäß den Bestimmungen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Ausnahme bildeten die Zellkulturen, die durch Anlegen von Primärkulturen dermalen Fibroblasten hergestellt wurden.

6.1.1 Gewinnung von Saugblasen-Epidermis (*ex vivo*)

Saugblasen-Epidermis gewinnt man an Hautarealen, die eine relativ dünne Epidermis und nur eine leichte Verzahnung mit der Dermis aufweisen. Für die vorliegende Arbeit wurde die Saugblasen-Epidermis ausschließlich an der Innenseite des Unterarms und an der Innenseite des Oberarms gewonnen. Auf einem runden Hautareal

legte man auf einem Durchmesser von 5 mm einen Unterdruck von 220 bis 250 mbar an. Nach 1.5 bis 2.5 Stunden entwickelte sich eine mit Flüssigkeit gefüllte Saugblase. Diese Saugblase wurde mit einem sterilen Mikropräparierbesteck abpräpariert [150]. Die Saugblase enthält Zellen vom Stratum corneum bis hin zum Stratum basale. Zur Abtrennung des Stratum corneum von den lebenden Zellen wurde das Material mehreren zellbiologischen Arbeitsschritten unterzogen, die hier nicht näher erläutert werden. Als Resultat erhielt man die lebenden Zellen als Zellpellet und konnte sie weiteren Extraktionsschritten zuführen.

6.1.2 Gewinnung von Zellkultur (*in vitro*)

Für die Studien mit Zellkulturen wurden ausschließlich primäre Fibroblasten verwendet. Die Zellen wurden in Medium bei 37°C im Brutschrank 1 bis 2 Wochen kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte zweimal wöchentlich.

Das Nährmedium der Zellkultur wird abgesaugt und die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen. Die PBS-Lösung setzt sich aus 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 und 8.1 mM Na_2HPO_4 (Herstellerangaben, fertig bezogen) zusammen. Der Zellkultur wurde Trypsinlösung zugesetzt und anschließend 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Der Lösung wurde ein Stopreagenz zugegeben. Die in Lösung vorliegenden Fibroblasten wurden in ein Vial überführt. Die Zelllösung wurde 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und weiteren Aufarbeitungsschritten zugeführt.

6.1.3 Extraktion aus humanen Keratinozyten

Die lebenden Zellen der Saugblasen-Epidermis von 2 Probanden wurden nach Yamashita und Yamamoto [108] extrahiert, da diese Extraktionsmethode die kürzeste und zeitsparendste Methode darstellt. Für die Extraktion wurden 50 µl der Zelllösung mit 250 µl Ethanol und 500 µl n-Hexan versetzt. Die Lösung wurde bei 6°C 5 Minuten zentrifugiert und die n-Hexan-Phase direkt injiziert und analysiert. Die Extraktion wurde auf Eis und im Halbdunkeln durchgeführt.

Die lebenden Zellen der Saugblasen-Epidermis weiterer Probanden wurden der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer unterzogen. Den 50 µl Zellschlamm wurden 250 µl Methanol und 125 µl Chloroform zugegeben. Die Probe wurde 5 Minuten mit Ultraschall behandelt, wiederholt 125 µl Chloroform zugegeben und 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Danach wurde 125 µl Wasser zugegeben, um ein 2-Phasen-System zu erhalten. Die Proben wurden 10 Minuten bei 6°C zentrifugiert, die Lipidphase abpipettiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Die Chloroformphase wurde unter Stickstoff in der SpeedVac (ohne Heizung) eingeengt und der Rückstand in 100 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) wieder aufgenommen, in ein Vial mit Einsatz überführt und analysiert. Die Extraktionsschritte wurden auf Eis und im Halbdunkeln durchgeführt.

6.1.4 Extraktion aus primären Fibroblasten

Für die Extraktion von Ubichinon-50 aus primären Fibroblasten wurden mehrere Verfahren getestet. Der optimierte Extraktionsprozess wird nachfolgend beschrieben.

Das in PBS aufgenommene Zellpellet (250 µl) wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dieser Prozess wurde 3mal wiederholt. Zwischen den Schritten – Frieren und Auftauen – wurde die Zellschlamm gevortext. Danach wurde die Zellschlamm 2mal 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und dazwischen gevortext. Diese Arbeitsschritte sind notwendig, um die Zellmembranen zu zerstören, damit Ubichinon-50 und Ubichinol-50 extrahierbar sind. Zur Zellschlamm wurden 250 µl 0.1 m SDS-Lösung, 10 µl BHT-Lösung und 10 µl α-Tocopherol-Lösung addiert. Die Lösungen wurden selbst hergestellt. Für die BHT-Lösung wurden 100 mg Butylhydroxytoluol in 10 ml Ethanol gelöst. α-Tocopherol (29.65 mg) wurde ebenso in 10 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wurde gevortext und anschließend 250 µl Ethanol und 250 µl n-Hexan zugegeben, wieder gemischt und 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es entstand ein 2-Phasen-System. In der Hexanphase befinden sich die lipophilen Komponenten. Diese Phase wurde für die Analyse in ein Vial überführt und vermessen.

6.2 Chromatographische Bestimmung von Ubichinonen

In der Literatur existieren eine Vielzahl von Bestimmungsmöglichkeiten für Ubichinon-50 [94-113]. Die Detektion mit coulometrischen [110-113] und massenselektiven Systemen ermöglicht eine Quantifizierung im Spurenbereich. Für die Trennung des Ubichinon-50 von anderen lipophilen Bestandteilen der Extrakte wird die HPLC verwendet.

6.2.1 Kopplung von HPLC mit coulometrischem Detektor

Die coulometrische Detektion ermöglicht den spezifischen Nachweis von redoxfähigen Substanzen. Zu diesen Spezies gehören die Biochinone (polyprenylierte 1,4-Benzo- bzw. Naphtochinone, deren Seitenketten mehr oder weniger stark gesättigt sind). Zu den Biochinonen gehören beispielweise die Plastochinone, Tocopherolchinone, Ubichinone, Bovichinone, K-Vitamine und Menachinone sowie Verbindungen wie Retinol und Tocopherylacetat. Das selektive Detektionsverfahren gewährleistet Bestimmungen im pico-Mol- und femto-Molbereich [110-113]. Für den Nachweis von Ubichinon-50 in humanen Zellen ist eine empfindliche Detektion erforderlich, da die Verfügbarkeit von biologischem Material begrenzt ist.

Informationen zur verwendeten flüssigchromatographischen Methode für die Detektion von Ubichinon-50 erhielt ich von der Fa. Bischoff. Als stationäre Phase kam eine PRONTOSIL 120-3-C18-SH (150*4 mm) der Fa. Bischoff zum Einsatz. Die mobile Phase setzte sich aus Methanol/Ethanol/2-Propanol (450:88.5:50, v/v:v) zusammen. Der Coulochem[®] II erlaubt nur die isokratische Elution. Bei der Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase konnte sich die Basislinie nicht stabilisieren. Das am häufigsten in der Elektrochemie eingesetzte Leitsalz ist LiClO_4 , da es sich in organischen und wässrigen Medien löst. Es wurden 0.639 g LiClO_4 dem Eluenten zugesetzt. LiClO_4 ist ein starkes Oxidationsmittel. Alle Stahlkapillaren der HPLC-Anlage wurden durch Peekkapillaren ersetzt. Für die HPLC-Pumpe war aufgrund des hohen Salzgehaltes in der mobilen Phase eine Hinterkolbenspülung erforderlich. Weitere Salze wie NaClO_4 oder NH_4Ac erzielten nicht die gewünschte Empfindlichkeit. Die methodischen Einzelheiten sind im Abschnitt 9.1.6 dargestellt.

Neben Ubichinon-50 wurden mit dieser Methode die Tocopherole (α -, β -, γ -, δ -), Ubichinol-50, β -Carotin, Retinol und die Vitamine K_1 und K_2 getrennt und detektiert. Chromatographisch lassen sich β - und γ -Tocopherol sowie α -Tocopherol und Retinol mit dieser Methode nicht voneinander trennen. Das Elutionsprofil der HPLC-ECD-Methode stellt sich wie folgt dar:

δ -Tocopherol < γ -Tocopherol = β -Tocopherol < α -Tocopherol < Vitamin K_2 < Vitamin K_1 < Ubichinol-50 < β -Carotin < Ubichinon-50.

Der coulometrische Detektor Coulochem[®] II der Fa. ESA wurde für die Detektion redoxfähiger Verbindungen im Eluenten von flüssigchromatographischen Systemen entwickelt [129]. Der Eluent durchströmt die elektrochemischen Zellen und ermöglicht einen 100 %igen Stoffumsatz an der Elektrode. Eine HPLC-Anlage mit dem Coulochem[®] II wurde wie folgt aufgebaut: die HPLC-Pumpe pumpt den Eluenten durch einen Pulsationsdämpfer und Inline-Filter in die erste Zelle (Schutzzone oder Guard Cell). Die mobile Phase passiert den Autosampler und die analytische Säule. Nach der Säule strömt das Lösungsmittel wiederholt durch einen Inline-Filter und dann folgen die Konditionierungszelle (Conditioning Cell) und die Messzelle (High Sensitivity Analytical Cell). Der Coulochem[®] II gewährleistet die Versorgung von 2 der 3 Zellen mit Strom. Man kann entweder die Schutzzone oder die Konditionierungszelle an den Detektor zur Stromversorgung anschließen. Koppelt man die Konditionierungszelle an, führt dies zu einem geringeren Basislinienstrom, der eine empfindlichere Detektion ermöglicht. Der Verschleiß der Elektrode in der Konditionierungszelle ist aufgrund der kleineren Oberfläche größer. Die Daten der Messzelle wurden digital verarbeitet und im Auswertesystem dargestellt. Im Kapitel 3.4.3 ist die elektrochemische Detektion näher erläutert.

Für die Charakterisierung der elektroaktiven Spezies wurden hydrodynamische Voltammogramme aufgenommen, um die optimale Detektionsspannung festzulegen. Für Ubichinon-50 sowie die Vitamine K_1 und K_2 wurde ein hydrodynamisches Voltammogramm im Bereich von 300 mV bis 700 mV in 50 mV-Schritten aufgenommen. Hierfür wurde für jede Messung eine andere Oxidationsspannung in der Messzelle

an der Elektrode 2 angelegt und gewartet bis sich die Basislinie mit der neuen Stromstärke stabilisiert hatte. Für die Tocopherole wurde ebenfalls ein hydrodynamisches Voltammogramm im Bereich von 100 mV bis 1000 mV in 100 mV-Schritten aufgenommen. Die Diagramme sind in der Abbildung 6-1 und 6-2 dargestellt.

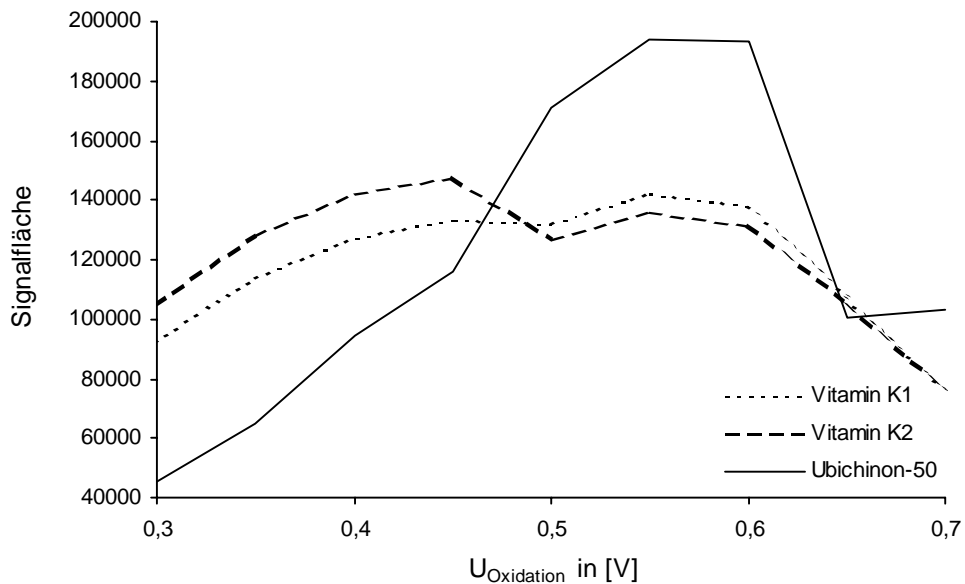
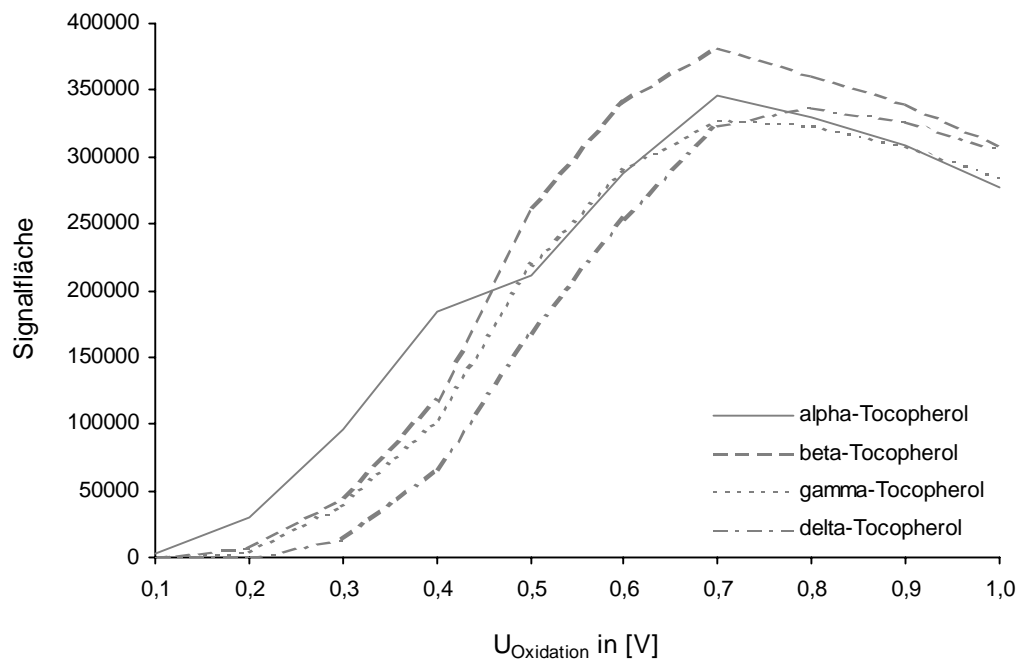


Abbildung 6-1.

Hydrodynamisches Voltammogramm für Ubichinon-50, Vitamin K₁ und K₂.

**Abbildung 6-2.**

Hydrodynamisches Voltammogramm der Tocopherole.

Ubichinon-50 hat seine optimale Oxidationsspannung zwischen 550 und 600 mV, wenn die Reduktionsspannung an der Elektrode 1 in der Messzelle - 250 mV beträgt. Die Tocopherole erreichen ihre optimale Oxidationsspannung bei 700 mV unter den gleichen Voraussetzungen. Da das Hauptaugenmerk jedoch auf Ubichinon-50 liegt, wurde die Oxidationsspannung für die Methode auf + 600 mV gesetzt.

Die Nachweisgrenzen für α -Tocopherol, Vitamin K₁, Vitamin K₂ und Ubichinon-50 sind in der Tabelle 6-1 dargestellt.

Tabelle 6-1.

Die Nachweisgrenzen wurden mit folgenden Einstellungen in der Messzelle erreicht: Spannung (Elektrode 1) = - 250 mV, Stromstärke (Elektrode 1) = 200 nA, Spannung (Elektrode 2) = + 600 mV, Stromstärke (Elektrode 2) = 20 nA.

Substanz	c in [ng/ml]	m _{injiziert} in [pg]	n _{injiziert} in [pmol]
α -Tocopherol	1.035	20.7	0.048
Vitamin K ₁	2.240	44.8	0.490
Vitamin K ₂	1.840	36.8	0.410
Ubichinon-50	1.140	22.8	0.130

Diese niedrigen Einstellungen in der Messzelle wurden nicht für die Analytik von matrixbelastetem Material verwendet. Die Stromstärke an der Elektrode 1 betrug 200 nA oder 500 nA. An der 1. Elektrode wurden die Verbindungen bei - 250 mV reduziert und an der 2. Elektrode wurden die Spezies bei + 600 mV oxidiert sowie die Änderung der Stromstärke im Chromatogramm aufgezeichnet. Die Stromstärke an der Elektrode 2 wurde auf 100 nA oder 200 nA eingestellt. Der Grundstrom der Basislinie pendelte um ca. 20 nA.

Aus der Ubichinon-50-Stammlösung mit einer Konzentration von 11.4 mg/ml wurden 5 Verdünnungen hergestellt – 1:1 000 000, 1:500 000, 1:200 000, 1:100 000 und 1:50 000. Jede dieser Konzentrationen wurde 3 mal ins HPLC-System injiziert und aus den erhaltenen Signalflächen der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient ermittelt. Die Tabelle 6-2 stellt die Daten für Ubichinon-50 dar.

Tabelle 6-2.

Angabe des Mittelwertes y_m der Signalflächen, der Standardabweichung s_x und des Variationskoeffizienten V für Ubichinon-50. Die Rohdaten (Signalflächen y_1 bis y_3 sind im Kapitel 9.2.5 dargestellt.

c [ng/ml]	y_m	s_x	V [%]
11.4	19446	1541	7.9
22.8	34888	1436	4.1
57.0	53146	1455	2.7
114.0	141805	5789	4.1
228.0	248168	12254	4.9

Zwischen der Konzentration und der Signalfläche besteht eine direkte Proportionalität. Trägt man die Konzentration gegen die Signalfläche in einem Diagramm auf, entsteht eine lineare Funktion. In der Abbildung 6-3 sind die Kalibrierfunktionen für 2 Stromstärken (100 nA, 200 nA) der Elektrode 2 dargestellt. Mit der Einstellung von 200 nA wurden die meisten Messungen durchgeführt. Hier war die Basislinie relativ stabil. Mit der Einstellung von 100 nA war eine empfindlichere Detektion möglich; das Signal-zu-Rausch-Verhältnis war jedoch ungünstiger. Die schwarz dargestellte Funktion im Diagramm beschreibt die lineare Abhängigkeit von Konzentration zu Signalfläche bei einer eingestellten Stromstärke von 200 nA. Die grau dargestellte Funktion steht für die Einstellung der Stromstärke bei 100 nA. Man erhält nach Durchführung

der linearen Regression 2 Kalibrierfunktionen, die den Geradengleichungen $y = 1072110x + 6821$ (schwarz) und $y = 1821855x + 12707$ (grau) entsprechen. Der Korrelationsfaktor beträgt 0.990 für die schwarz dargestellte Funktion und 0.965 für die grau dargestellte Funktion. In 6-3 ist das Diagramm abgebildet.

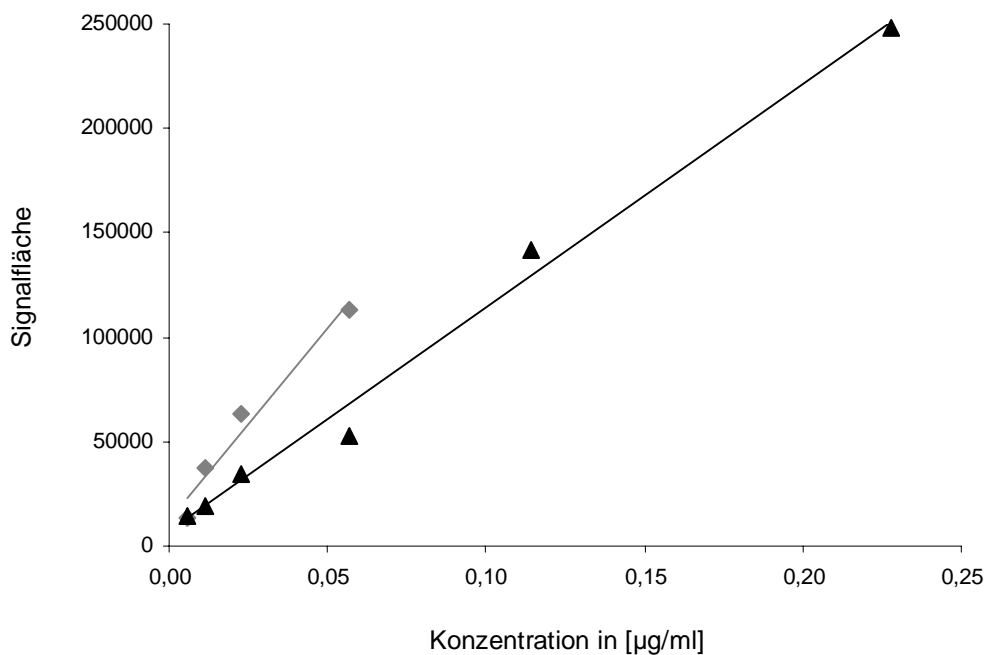


Abbildung 6-3.

Darstellung der Kalibrierfunktionen für Ubichinon-50 mit HPLC-ECD. Die Einstellungen der Messzelle im Oxidationsmodus sind: $U = + 600$ mV, $I = + 200$ nA (schwarz) bzw. $+ 100$ nA (grau).

Bei der Analytik von matrixbelasteten Proben treten Schwierigkeiten mit der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse auf. Die mobile Phase durchströmt die Elektroden für die coulometrische Detektion, d. h. alle in der Lösung befindlichen Substanzen wurden in Abhängigkeit von ihren Redoxpotentialen reduziert bzw. oxidiert. Die Elektroden bzw. die Elektrodenoberfläche veränderte sich. Wahrscheinlich ist, dass sich Matrixbestandteile an der Elektrodenoberfläche abgeschieden haben. Diese führten zu einem Verlust an Empfindlichkeit, zu Schwankungen in der Basislinie und der Druck in den Zellen stieg drastisch an. Durch Spülen der Zellen mit verschiedenen polaren und unpolaren Lösungsmitteln wurde keine längerandauernde Regenerierung der Elektroden erreicht. Eine kurzfristige Wiederherstellung der Leistung der

elektrochemischen Zellen war durch Spülen mit 6 molarer Salpetersäure für ca. 30 Sekunden und anschließendem Reinigen mit viel destilliertem Wasser möglich. Diese Regenerierungsphase ist nur von kurzer Dauer. Die ständige Belastung der analytischen Säule mit dem Leitsalz führte zu einer Versalzung der stationären Phase. Durch die HPLC-Anlage musste ständig mobile Phase gepumpt werden. Das Abschalten des Systems führte zum Auskristallisieren des Leitsalzes in den Kapillaren und zog die Reinigung aller Kapillarverbindungen und Inline-Filter nach sich.

Die Probenvorbereitung ist entscheidend für die Lebensdauer der coulometrischen Zellen. Eine Möglichkeit zur Verringerung der Verschleißerscheinungen ist der Einbau eines Säulenschaltventils. Das Säulenschaltventil ermöglicht, dass die ersten Minuten des chromatographischen Laufes nicht über die Säule sondern in den Abfall gepumpt werden. Nach kurzer Zeit schaltet das Ventil wieder zurück und der Eluent passiert die analytische Säule und die coulometrischen Zellen, ohne diese mit Matrix stark zu belasten. Für die Betreibung eines Säulenschaltventil ist eine 2. Pumpe notwendig. Durch die coulometrischen Zellen muss ein ständiger Fluss mit mobiler Phase erfolgen.

6.2.2 Kopplung von LC mit MS

Für die spurenanalytische Bestimmung von Ubichinon-50 mittels LC/MS wurde im SIM Mode gearbeitet, um eine vergleichbare Empfindlichkeit wie bei der coulometrischen Detektion zu erhalten. Des Weiteren soll die LC/MS-Kopplung eine Alternativmethode darstellen, da die elektrochemischen Zellen für den Routinebetrieb von matrixbehafteten Proben nicht uneingeschränkt nutzbar sind.

Bei der Entwicklung der LC/MS-Methode wurde mit FIA gearbeitet und jeder einzelne Parameter der Ionenquelle und des Massenspektrometers einem Optimierungsprozess unterzogen. Ubichinon-50 lässt sich im positiven Modus als Quasi-Molekularion $[M+Na]^+$ darstellen. Bei einer Fragmentorspannung von 200 V ist die empfindlichste Detektion möglich. Nachdem mit FIA die Parameter für die Detektion optimiert waren, wurde die Chromatographie für diese Substanz entwickelt. Als optimale Lösungsmittel für die Elektrospray-Ionisierung erwiesen sich Wasser, Methanol und

tert-Butyl-methyl-ether. Da Ubichinon-50 in Wasser nur in micromolaren Mengen löslich ist, scheidet es als Solvens für die Chromatographie aus, damit die Substanz auf der stationären Phase nicht ausfällt. Als stationäre Phase wurde die Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm (125*2 mm) eingesetzt. Als Eluent diente reines Methanol, das mit einer Flussrate von 200 µl/min durch das LC-System gepumpt wurde. Die mobile Phase wurde bei 25°C temperiert. Auf den Einsatz von *tert*-Butyl-methyl-ether wurde verzichtet, da das Solvens die Ionisierung in der Ionenquelle negativ beeinflusst und eine Verschlechterung der Empfindlichkeit zur Folge hat. Der Einsatz einer RP-18 Trennsäule führte zu keiner Elution von Ubichinon-50. Als Alternative zu der Säule LiChrospher 100 RP-8 endcapped ist die Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP zu nennen, die zum gleichen Ergebnis führt. Die LC/MS-Methode ist in Kapitel 9.1.9 ausführlich beschrieben.

Ubichinon-50 eluiert mit einer Retentionszeit von 14.7 Minuten. Das Signal weist Fronting auf. Ubichinol-50 eluiert mit einer Retentionszeit von 9.2 Minuten und ergibt ein symmetrisches Signal. Um beide Substanzen im Spurenbereich quantitativ bestimmen zu können, wurde ein Zeitfenster eingerichtet, das bis 10.5 Minuten das Quasi-Molekular-Ion des Ubichinol-50 mit der *m/z*-Zahl von 887.7 aufnimmt und ab 10.5 Minuten das Quasi-Molekular-Ion von Ubichinon-50 mit *m/z* = 885.7 detektiert.

Für die Kalibrierfunktion von Ubichinon-50 wurde eine Stammlösung von 1.14 mg/ml Ubichinon-50 in *n*-Hexan hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden folgende Verdünnungen gewonnen: 1:5 000 000, 1:2 000 000, 1:1 000 000, 1:500 000, 1:200 000, 1:100 000, 1:50 000, 1:20 000 und 1:10 000. Die Verdünnungen wurden durch unabhängige Schritte aus der Stammlösung in 1:100, 1:50, 1:20 und 1:10 Schritten hergestellt. Die Tabelle 6-3 stellt die Konzentrationen, die injizierte Menge und die daraus berechnete Stoffmenge für Ubichinon-50 dar.

Tabelle 6-3.

Angabe der Konzentrationen, absolute Masse und Stoffmenge für die Verdünnungsreihe von Ubichinon-50 ausgehend von der Stammlösung von 1.14 mg/ml.

Verdünnung	c in [ng/ml]	m _{injiziert} in [pg]	n _{injiziert} in [fmol]
1:5 000 000	0.228	1.14	1.32
1:2 000 000	0.570	2.85	3.30
1:1 000 000	1.140	5.70	6.60
1:500 000	2.280	11.40	13.20
1:200 000	5.700	28.50	33.00
1:100 000	11.400	57.00	66.00
1:50 000	22.800	114.00	132.00
1:20 000	57.000	285.00	330.00
1:10 000	114.000	570.00	660.00

Jede dieser Konzentrationen wurde 6 mal ins LC/MS-System injiziert und aus den erhaltenen Signalfächern der Mittelwert, die Standardabweichung, der Variationskoeffizient und die Kalibrierfunktion ermittelt. Die Tabelle 6-4 stellt die Daten für Ubichinon-50 dar. Bei der Konzentration von 0.228 ng/ml wurde kein Signal von Ubichinon-50 aufgezeichnet. Ab einer Konzentration von 0.57 ng/ml ist Ubichinon-50 mit dem LC/MS-System detektierbar.

Tabelle 6-4.

Angabe des Mittelwertes y_m der Signalfächern, der Standardabweichung s_x und des Variationskoeffizienten V für Ubichinon-50. Die Rohdaten (Signalfächern y_1 bis y_6) sind im Kapitel 9.2.5 dargestellt.

c in [ng/ml]	y_m	s_x	V [%]
0.57	8207	816	9.9
1.14	15354	477	3.1
2.28	18187	483	2.7
5.70	72804	655	0.9
11.40	135520	986	0.7
22.80	181023	2141	1.2
57.00	575285	7000	1.2
114.00	1113052	5493	0.5

Die Signalfächern wurden in Abhängigkeit von der Konzentration des Standards im Diagramm aufgetragen. Man erhält nach Durchführung der linearen Regression eine

Kalibrierfunktion, die der Geradengleichung $y = 9756.4x + 2861$ entspricht. Der Korrelationsfaktor beträgt 0.997. In der Abbildung 6-4 ist die Kalibrierfunktion dargestellt.

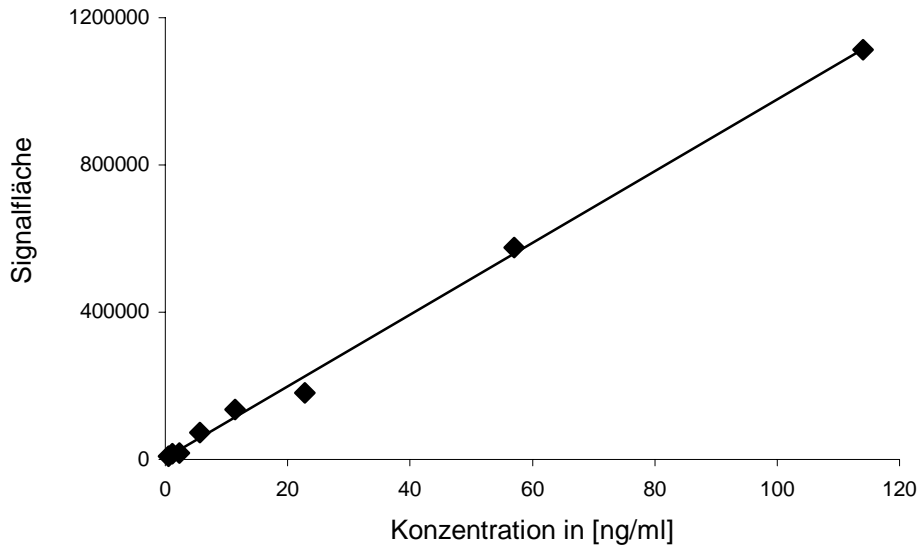
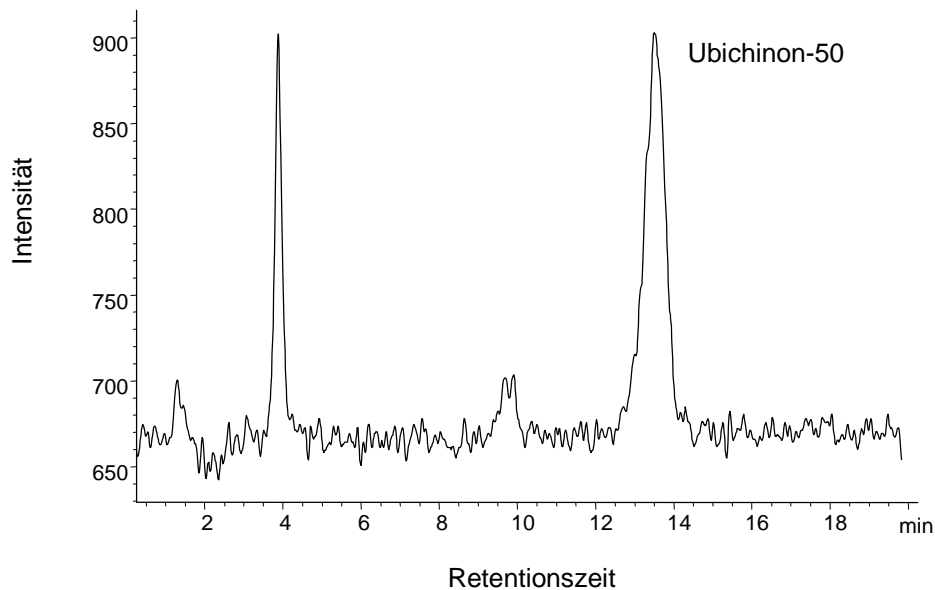


Abbildung 6-4.

Darstellung der Kalibrierfunktion für Ubichinon-50.

Injiziert man höhere Konzentrationen in das LC/MS-System als 114 ng/ml, dann verlässt man den linearen Bereich der Proportionalität zwischen Analytkonzentration und Signalfläche. Für Ubichinol-50 werden ähnliche Daten erreicht, obwohl die Parameter auf Ubichinon-50 optimiert wurden.

Die Abbildung 6-5 zeigt das TIC-Chromatogramm für Ubichinon-50. Ubichinon-50 wurde im SIM Mode bei der m/z-Zahl von 885.7 aufgenommen und stellt die Substanz an der Nachweisgrenze dar.

**Abbildung 6-5.**

Chromatographische Trennung von Ubichinon-50 mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm), Konzentration = 0.57 ng/ml.

6.2.3 Vergleich von HPLC-ECD mit LC/MS

Beide Methoden eignen sich für die quantitative Bestimmung von Ubichinon-50 im spurenanalytischen Bereich. Die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Werte ist bei der LC/MS-Methode besser als bei der HPLC-ECD-Methode. Die Nachweisgrenze für Ubichinon-50 lag bei der LC/MS bei 0.003 pmol und bei der coulometrischen Detektion bei 0.13 pmol. Eine intensive Probenvorbereitung ist für beide Methoden erforderlich. Bei der massenselektiven Detektion wurde das Quasi-Molekularion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ von Ubichinon-50 detektiert. Diese Massenspur können auch andere Substanzen aufweisen, entweder als Molekül- oder Fragment-Ion. Bei der coulometrischen Detektion wurde die Redoxfähigkeit der Verbindung ausgenutzt. Die dafür verwendete spezifische Oxidationsspannung steht vorwiegend für eine Substanzklasse und führt selten zu Verwechslungen.

Die LC/MS ist für die Routineanalytik einsetzbar, während die elektrochemischen Zellen bei hoher Matrixbelastung Ausfallerscheinungen zeigten. Die Elektroden der Zellen verfügten über keine einheitliche Lebensdauer.

6.2.4 Reduktion von Ubichinon-50

Neben der Detektion von Ubichinon-50 soll ebenso die reduzierte Form Ubichinol-50 in Zellen nachgewiesen werden. Ubichinol-50 ist in freier Form sehr temperaturinstabil und wird zu Ubichinon-50 oxidiert. Stabilitätsdaten aus der Literatur von Yamashita und Yamamoto [108] belegen, dass Ubichinol-50 in Plasma nur bei -78°C stabil ist. Bei Raumtemperatur, 0°C und -20°C kommt es schon nach 120 min zu einer merklichen Oxidation von Ubichinol-50 zu Ubichinon-50.

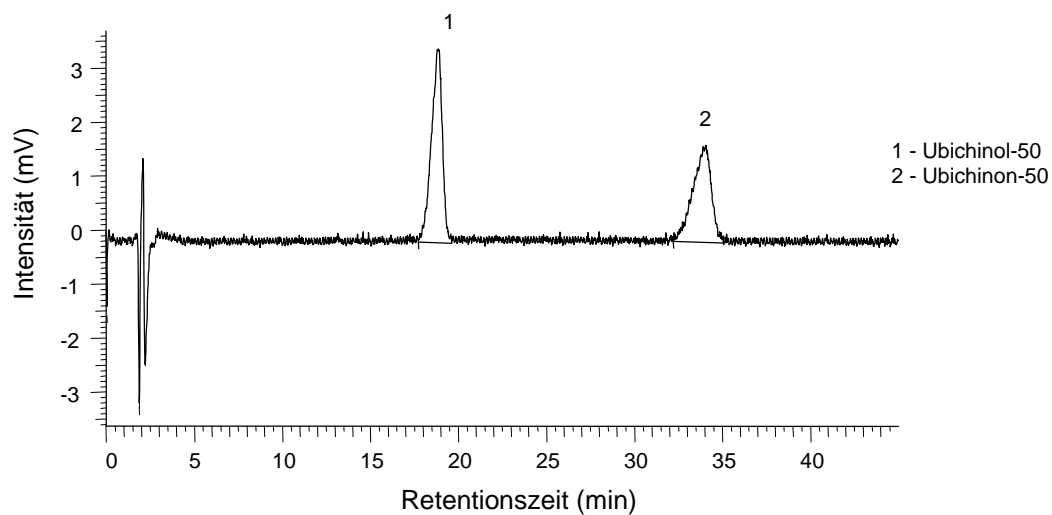
Die Herstellung von Ubichinol-50 aus Ubichinon-50 erfolgte nach Literaturangabe von Yamashita und Yamamoto [108]: Es wurden 0.2 bis 0.3 g Ubichinon-50 in 2 ml n-Hexan gelöst. Zur n-Hexanlösung wurden 50 μl Methanol und 20 mg Natriumborhydrid addiert. Während der Reduktion entsteht Wasserstoff, der in den Abzug geleitet wurde. Die Lösung wurde 3 Minuten gerührt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Die Reduktion ist abgeschlossen, wenn die orange-gelbe Farbe des Ubichinon-50 verschwindet. Anschließend gab man 1 ml 0.1 mmol EDTA-Lösung zur n-Hexan-Lösung zu, die Lösung wurde gemischt und bei 1500 U^{-1} für 3 Minuten zentrifugiert. Die Reduktion soll nach Literaturangaben quantitativ von Ubichinon-50 zu Ubichinol-50 verlaufen. Während der Zentrifugation bildete sich ein 2-Phasen-System aus. In der n-Hexan-Phase liegt Ubichinol-50 in der gleichen Konzentration vor, wie Ubichinon-50 vor der Reduktion. Ubichinol-50 in n-Hexan ist für mehrere Wochen bei -80°C haltbar. Die Durchführung der Reduktion von Ubichinon-50 zu Ubichinol-50 verlief unvollständig. Es entstanden 20 % Ubichinol-50 aus Ubichinon-50. Die Vorschrift wurde in mehreren Schritten überprüft und einige Details abgeändert.

Durch Veränderung der Einwaage wurde eine Verbesserung des Gehaltes der reduzierten Verbindung erreicht. Es wurden 11.3 mg Ubichinon-50 in 2 ml n-Hexan gelöst, 50 μl Methanol und 18.5 mg Natriumborhydrid zugegeben. Dann wurde geschüttelt und die Lösung bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen, bis keine Gasblasen mehr aus der Lösung aufstiegen. Die Farbe der Lösung änderte sich von orange-gelb nach hellgelb. Es erfolgte die Zugabe der EDTA-Lösung und die Zentrifugation. Die chromatographische Trennung ergab einen reduzierten Anteil von 52 %

und einen oxidierten Anteil von 48 %. Die n-Hexan-Lösung wurde bei - 20°C über 42 Stunden gelagert und es konnte keine Abnahme des Gehaltes an Ubichinol-50 festgestellt werden. Die Reduktion wurde im Halbdunkeln durchgeführt, die n-Hexan-Phase mit der reduzierten Substanz in Eppendorf-Cups überführt und in der Rotilabo Kühlbox vor Licht geschützt aufbewahrt.

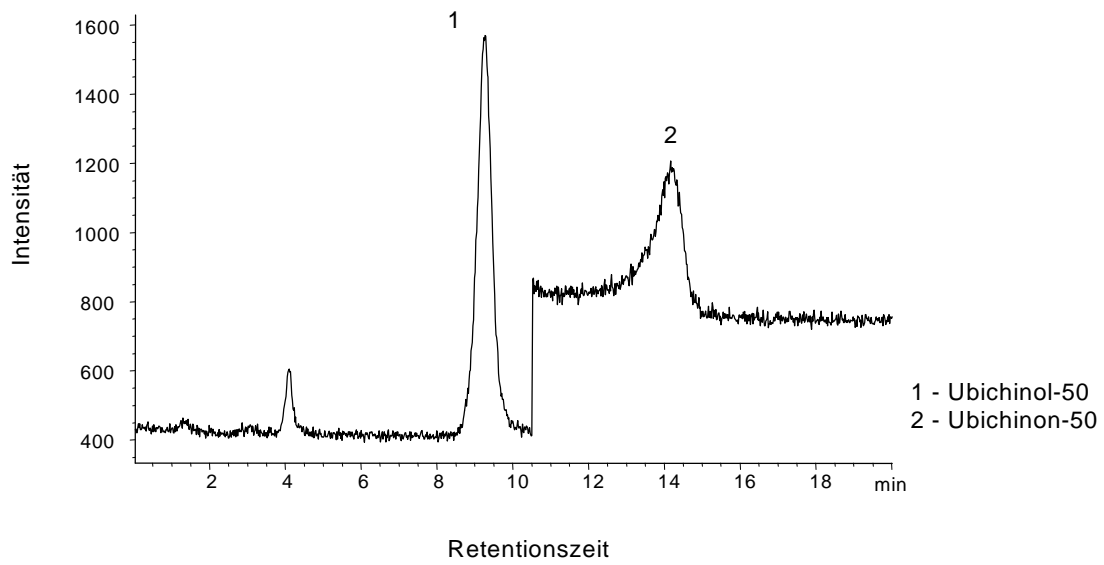
Die Einwaage wurde ein 2. Mal variiert. Es wurden 9.8 mg Ubichinon-50 in 2 ml n-Hexan in einem kleinem Erlenmeyerkolben gelöst und 50 µl Methanol zugegeben. Vom Natriumborhydrid wurden 38.2 mg eingewogen und der stark gerührten Lösung zugeführt. Es wurde ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur im Halbdunkeln kräftig gerührt, bis die Gasentwicklung nachlies. Die Lösung wurde dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch Zugabe von 1 ml 0.1 mmol EDTA-Lösung bildete sich ein 2-Phasen-System aus. Die Lösung wurde aus dem Erlenmeyerkolben in ein Eppendorf-Cup überführt und zentrifugiert. Die n-Hexan-Phase wurde abpipettiert und direkt bei - 20°C tiefgefroren. Die anschließende chromatographische Trennung ergab einen Anteil von 80 % Ubichinol-50 und 20 % Ubichinon-50.

Das Ubichinol-50 lässt sich sowohl mit der HPLC-ECD sowie mit der LC/MS-Methode detektieren. In 6-6 ist ein Chromatogramm der coulometrischen Detektion mit dem Redoxpaar Ubichinol-50/Ubichinon-50 abgebildet.

**Abbildung 6-6.**

Chromatographische Trennung von Ubichinol-50 und Ubichinon-50 mit der Trennsäule PRONTOSIL 120-3-C18-SH (150*4 mm). Konzentration = 1.13 $\mu\text{g/ml}$ ($c_{\text{Ubichinol-50}} = 0.6125 \mu\text{g/ml}$, $c_{\text{Ubichinon-50}} = 0.5164 \mu\text{g/ml}$).

Ein TIC-Chromatogramm der massenselektiven Detektion für Ubichinol-50 und Ubichinon-50 ist in Abbildung 6-7 dargestellt. Das Zeitfenster verursacht bei 10.5 Minuten einen Sprung in der Basislinie, da sich die zu detektierende Masse ändert. Nimmt man die Massen für Ubichinol-50 und Ubichinon-50 gleichzeitig auf, verschlechtert sich die Empfindlichkeit.

**Abbildung 6-7.**

Chromatographische Trennung von Ubichinol-50 und Ubichinon-50 mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm), Konzentration (gesamt) = 13.3 ng/ml.

6.3 Bestimmung in Humanzellen

Für den Nachweis von Ubichinon-50 in Humanzellen wurden verschiedene Zelltypen verwendet. Bei den Zellen der Saugblasen-Epidermis handelt es sich um Keratinozyten. Die Zellen der Hautbiopsien wurden aus der Dermis der Haut gewonnen und sind dementsprechend Fibroblasten. Bei den HaCat-Zellen handelte es sich um eine Keratinozyten-Zelllinie. Diese Zelllinie verfügt über spezifische Eigenschaften, die für die Bestimmung von Ubichinon-50 nicht relevant sind.

Ziel der Bestimmungen ist es, neben Ubichinon-50 auch das oxidationsempfindlichere Ubichinol-50 in humanen Zellen nachzuweisen. Dafür wurde die Probenvorbereitung und Extraktion optimiert.

6.3.1 Untersuchungen von Saugblasen-Epidermis, Biopsien und Zelllinien

Für die Bestimmung von Ubichinon-50 in humanen Zellen wurden Saugblasen-Epidermis, Biopsien und Zelllinien untersucht. Zusätzlich zur Ubichinon-50-Bestimmung wurde ein Parameter ausgewählt, der in Bezug zu Ubichinon-50 zu setzen ist, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Als Bezugsgröße können der Protein- und Cholesterolgehalt sowie die Zellzahl dienen. Der Protein- und Cholesterolgehalt ist eine vom Individuum abhängige Größe und von Individuum zu Individuum sehr variabel. Eine unabhängig bestimmbare Größe ist die Zellzahl. Die Zellzahl wurde für die Zellen der Biopsie und der Zelllinie bestimmt, während bei der Saugblasen-Epidermis nur die Anzahl der Saugblasen bekannt war. Die quantitative Bestimmung wurde mit der HPLC-ECD-Methode durchgeführt. An der Messzelle wurden die Parameter wie folgt eingestellt: Elektrode 1 – Reduktionsspannung = - 250 mV und Reduktionsstromstärke = 200 nA, Elektrode 2 – Oxidationsspannung = + 600 mV und Oxidationsstromstärke = 200 nA.

Für die Saugblasen-Epidermis wurden von einem Probanden je 3 Saugblasen pro Arm gewonnen, das Stratum corneum von den lebenden Zellen der Epidermis getrennt und alle Zellbestandteile der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer zugeführt. Von der Gewinnung bis zur Analyse der Saugblasen-Epidermis vergingen ca. 6 Stunden.

Das extrahierte und aufkonzentrierte Material wurde in 200 µl Methanol aufgenommen und 2mal 100 µl ins HPLC-System injiziert und analysiert. Die Tabelle 6-5 stellt die Ergebnisse der Saugblasen-Epidermis dar.

Tabelle 6-5.

Daten der HPLC-Analyse für die Saugblasen-Epidermis.

	Signalfläche (y_m)	$C_{\text{berechnet}}$ in [µg/ml]	$n_{\text{berechnet}}$ in [pmol]
SBE links	155730	0.0278	32.20
SBE rechts	159485	0.0285	33.01
SC links	51635 ¹	0.0084	9.73
SC rechts	104405	0.0182	21.08

¹ nur Einfachbestimmung möglich

Eine Saugblase enthält in Abhängigkeit vom Hauttyp zwischen 300 000 und 500 000 Zellen. Das Stratum corneum wurde abgetrennt, da es keine Mitochondrien enthält und somit auch kein natives Ubichinon-50 enthalten kann. Die Werte, die bei der Analyse der extrahierten Proben des Stratum corneums gefunden wurden, sprechen für eine unvollständige Ablösung der lebenden Zellen der Epidermis. Für die Analyse wurden die Extrakte der 3 Saugblasen pro Arm vereinigt. Die Saugblasen des rechten Arms enthielten 33.01 pmol und die des linken Arms 32.20 pmol Ubichinon-50. Für weitere Untersuchungen sind anstatt der 3 Saugblasen pro Areal 2 ausreichend für die flüssigchromatographische Bestimmung.

Die Zellen der Biopsie wurden nach einem Dispase-Verdau der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer unterzogen und aufgeteilt, nicht aufkonzentriert und 2mal 100 µl analysiert. Vor der Lipidextraktion wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden 3 verschiedene Proben mit 250 000, 500 000 und 2 000 000 Zellen analysiert. Bei 250 000 Zellen wurde kein Ubichinon-50 detektiert. Bei 500 000 Zellen wurde ein Ubichinon-50-Gehalt von 0.0061 µg/ml detektiert und bei 2 000 000 Zellen wurden 0.1866 µg/ml Ubichinon-50 quantifiziert.

Die Zellen der HaCat-Zelllinie wurden nach Bligh & Dyer extrahiert. Vor der Extraktion wurde ein Aliquot entnommen und die Zellzahl bestimmt. Die zu analysierenden

Proben beinhalteten 1 500 000, 2 000 000 und 2 500 000 Zellen. Nach der Lipidextraktion wurden die Zellen aufkonzentriert, in 200 µl Methanol aufgenommen und 2mal 100 µl analysiert. Die Tabelle 6-6 bildet die Signalflächen und die daraus ermittelten Konzentrationen und Stoffmengen ab.

Tabelle 6-6.

Daten der HPLC-Analyse für die HaCat-Zelllinie.

Zellzahl	Signalfläche (y_m)	$c_{\text{berechnet}}$ in [µg/ml]	$n_{\text{berechnet}}$ in [pmol]
1 500 000	89072	0.0153	17.76
2 000 000	120998	0.0213	24.66
2 500 000	133025	0.0235	27.26

Im Vergleich zu den Zellen der Hautbiopsie enthalten die Zellen der Zelllinie ein Zehntel des Gehaltes an Ubichinon-50. In den Zellen der Hautbiopsie wurde der höchste Gehalt von Ubichinon-50 nachgewiesen. Ubichinol-50 konnte in keiner dieser Proben detektiert werden. Eine statistische Auswertung war aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Probenmaterials nicht möglich.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Saugblasen-Epidermis von 4 Probanden mit LC/MS quantifiziert. Diese Proben wurden ebenfalls mit der Extraktionsmethode nach Bligh & Dyer extrahiert und etwa 1 Jahr bei - 20°C gelagert. Von den Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. In der Tabelle 6-7 sind die LC/MS-Ergebnisse dargestellt.

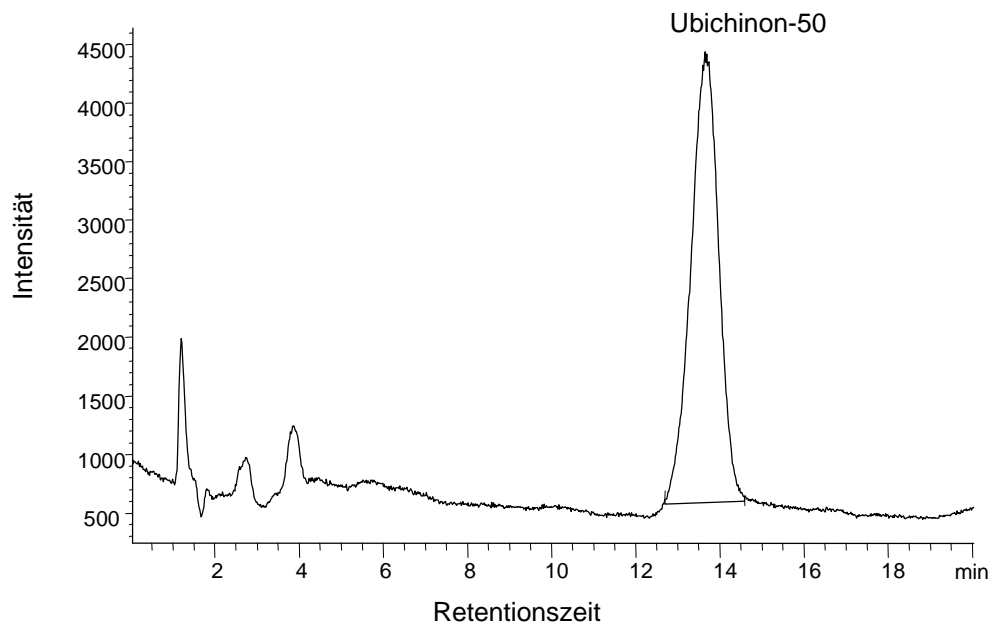
Tabelle 6-7.

LC/MS-Daten der Saugblasen-Epidermis mehrerer Probanden.

Proband	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	Mittelwert	C _{berechnet} in [ng/ml]
i	47591	84160	82283	71345	7.02
ii	167068	166626	168679	167458	16.77
iii	101255	100621	107202	103026	10.27
iv	46957	49094	49614	48555	4.68

Die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) dieser Ergebnisse liegt unter 5 %, wenn der erste Wert des Probanden i einen Ausreißer darstellt. Bezieht man diesen Wert mit ein, erhält man eine relative Standardabweichung von ca. 30 %. Die ermittelten Ubichinon-50-Gehalte zeigen für jedes Individuum einen anderen Ubichinon-50-Level. Bildet man den Mittelwert aus den errechneten Konzentrationen, erhält man 9.68 ng/ml. Die relative Standardabweichung für diese 4 Probanden liegt dann bei 54.2 %. Für Humanproben ist diese Größenordnung der relativen Standardabweichung nicht ungewöhnlich. Der Gehalt von Ubichinon-50 in der menschlichen Epidermis ist von Mensch zu Mensch verschieden und durch äußere Faktoren beeinflussbar.

In der Abbildung 6-8 ist das TIC-Chromatogramm des Probanden ii dargestellt. Ubichinon-50 wurde im SIM Mode bei $m/z = 885.7$ detektiert.

**Abbildung 6-8.**

Chromatographische Trennung von Ubichinon-50 mit der Trennsäule Lichrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm). Ubichinon-50 wurde aus der Saugblasen-Epidermis von Proband ii gewonnen.

6.3.2 Bestimmung in Zellkultur

Die unzureichende Verfügbarkeit von lebenden Humanzellen führte zur Verwendung von Zellkulturen, die für die Optimierung der Extraktionsmethode und zum Nachweis von Ubichinol-50 verwendet wurden. Kultiviert wurden dermale Fibroblasten.

Das Ubichinon-50 ist in der Mitochondrienmembran lokalisiert. Für eine Extraktion der lipophilen Substanz müssen die Zellmembranen zerstört bzw. so permeabilisiert werden, dass eine Extraktion möglich ist. Im 1. Versuch wurden die primären Zellkulturen im flüssigem Stickstoff 5 Minuten tiefgefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Die Probe wurde gedrittelt und 3 verschiedene Extraktionsmöglichkeiten getestet. Der Probe 1 wurden 1 ml 0.1 m SDS-Lösung und 50 μl BHT (10 mg/ml) zugegeben. Die Probe wurde gevortext und 2 ml Ethanol/Aceton (1:1, v/v) addiert, gemischt und bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Es bildete sich kein 2-Phasen-System aus. Nachträglich wurde 1 ml n-Hexan zugegeben, um die lipophilen Komponenten in die organische Phase zu überführen. Die n-Hexanphase wurde abpipettiert und in ein Analysenvial überführt. Der Probe 2 wurden 1 ml 0.1 m

SDS-Lösung und 50 µl BHT (10 mg/ml) zugegeben. Die Probe wurde gemischt und 1 ml Ethanol und 1 ml n-Hexan zugeführt, wieder gemischt und bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die n-Hexanphase wurde für die Analyse in ein Vial überführt. Die Probe 3 wurde mit 1 ml 0.1 m SDS und 50 µl BHT (1 mg/ml) versetzt, gemischt und 1 ml Ethanol und 1 ml n-Hexan zugeführt. Die Probe wurde wieder gemischt und zentrifugiert und die n-Hexanphase ins Analysenvial überführt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde vor der Extraktion jeder Lösung ein Aliquot entnommen. Die ermittelten Resultate wurden auf 1 Millionen Zellen bezogen. Für die Probe 2 wurde der höchste Ubichinon-50-Gehalt mit 0.77 pmol, bezogen auf 1 Millionen Zellen, bestimmt. In der Probe 1 wurden 0.24 pmol Ubichinon-50 detektiert und in der Probe 3 0.08 pmol. Die Zeit von der Entnahme der Fibroblasten aus dem Brutschrank bis zur Überführung ins Analysenvial betrug ca. 1 Stunde. Die quantitative Bestimmung von Ubichinon-50 wurde mit der HPLC-ECD-Methode durchgeführt.

Im 2. Versuch wurden verschiedene Methoden für die Zerstörung der Zellmembranen und Zellorganellen untersucht. Die Extraktionsmethode, die im 1. Versuch den höchsten Gehalt an Ubichinon-50 erbrachte, wurde für die Extraktion aller Proben verwendet. Die Volumenanteile der Lösungsmittel wurden etwas reduziert, um im Eppendorf-Cup arbeiten zu können. Die 1 ml SDS, Ethanol und n-Hexan wurden auf 250 µl reduziert. Die 50 µl der BHT-Lösung wurden auf 10 µl reduziert. Nach der Überführung der Zellkultur aus dem Brutschrank ins Eppendorf-Cup wurde die Zellkultur gedrittelt und eine der folgenden Aufarbeitungsschritte durchgeführt:

- a) auf Eis gepottert,
- b) 5 mal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dazwischen bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut und
- c) nicht behandelt.

Die weitere Aufarbeitung verlief bei den 3 Zellkultur-Proben identisch. In allen 3 Proben konnte Ubichinon-50 mit der LC/MS-Methode detektiert werden. Die Probe, die tiefgefroren und wieder aufgetaut wurde, lieferte den höchsten Ubichinon-50-Gehalt. Als Bezugsgröße diente der Proteingehalt. Jeder Probe wurde vor der Extraktion ein Aliquot entnommen und der Proteingehalt bestimmt. Der ermittelte Gehalt von Ubi-

chinon-50 wurde auf μg Protein bezogen. Die Probe, die den Frierungsprozessen unterzogen wurde, enthielt 0.75 ng Ubichinon-50 bezogen auf 1 μg Protein. Die Probe, die auf Eis gepottert wurde, enthielt 0.14 ng Ubichinon-50 bezogen auf 1 μg Protein. Die Probe, die nicht behandelt wurde, enthielt 0.02 ng Ubichinon-50 bezogen auf 1 μg Protein. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass die Zellmembranen durch Einfrieren und Auftauen am besten zu zerstören sind. Im Placebo konnte kein Ubichinon-50 nachgewiesen werden. Ubichinol-50 wurde erstmals in Spuren in der Probe, die den Frierungsprozessen unterzogen wurde, detektiert. Die Durchführung der Aufarbeitung und Extraktion dauerte etwa 1 Stunde; fand im Halbdunkeln und auf Eis statt.

In der 3. Versuchsreihe wurde der Einfluss von α -Tocopherol in Ethanol auf die Extraktion von Ubichinon-50 untersucht. Hierfür wurden jeweils 3 Proben gleich aufgearbeitet, einmal mit bzw. ohne α -Tocopherol. Von der Entnahme der Fibroblasten aus dem Brutschrank bis zur Überführung der extrahierten Lösung ins Analysenvial verging ca. 1 Stunde. Ein Placebo wurde ebenfalls extrahiert. Die Aufarbeitung wurde auf Eis und im Halbdunkeln durchgeführt. Als Bezugsgröße diente abermals der Proteingehalt der Fibroblasten. Die Extraktionsschritte sind in Kapitel 6.1.4 beschrieben. Die Bestimmung von Ubichinon-50 und Ubichinol-50 erfolgte mittels LC/MS. Von jeder Probenlösung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Rohdaten befinden sich in Kapitel 9.2.5. Die Ergebnisse sind in 6-9 graphisch dargestellt. Den Proben 4 bis 6 wurde bei der Extraktion α -Tocopherol zugesetzt. Die Proben wurden an verschiedenen Tagen analysiert und bis zur jeweiligen Bestimmung bei -20°C aufbewahrt. Die Reihenfolge der Analyse: Probe 1, Probe 2, Probe 4, Probe 5, Probe 3, Probe 6. Ubichinol-50 wurde durch Reduktion hergestellt und als Standard für die Quantifizierung verwendet.

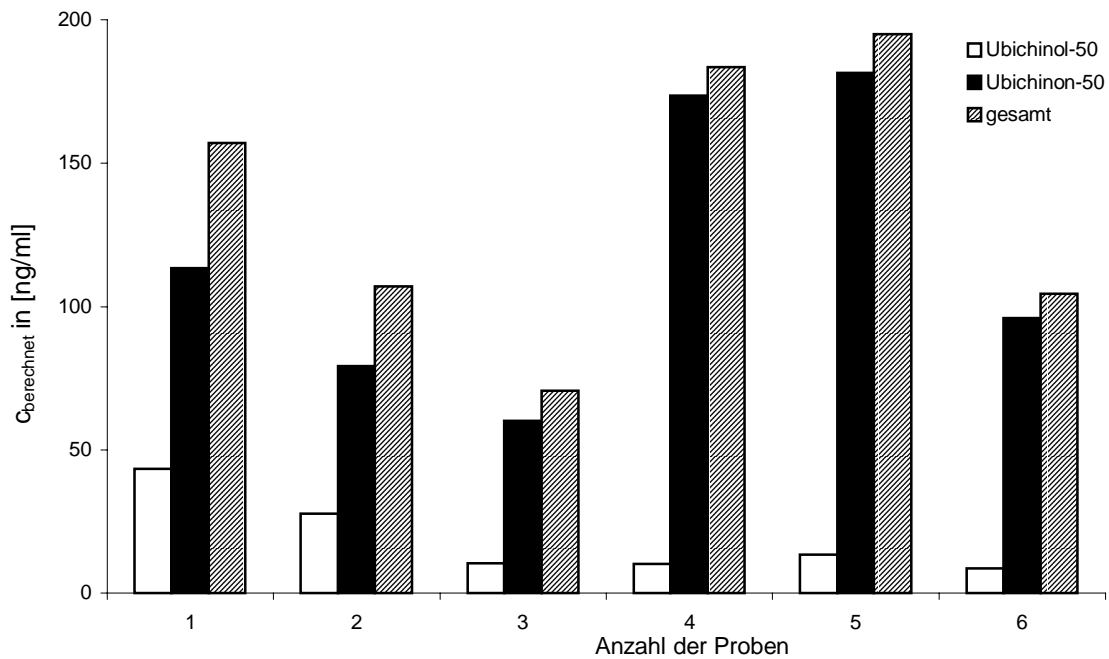


Abbildung 6-9.

Darstellung der Konzentrationen von Ubichinol-50, Ubichinon-50 und der Summe aus beiden in primären Fibroblasten.

Die relative Standardabweichung für Ubichinol-50 und Ubichinon-50 bei der Bestimmung in den Fibroblasten liegt bei 20 %. Die Proteinbestimmung wurde in Bezug zu den ermittelten Konzentrationen aus Ubichinol-50 und Ubichinon-50 gesetzt. Die Tabelle 6-8 zeigt die numerischen Daten der Konzentrationen von Ubichinol-50, Ubichinon-50 und die Ergebnisse der Proteinbestimmung.

Tabelle 6-8.

Ergebnisse der LC/MS-Analyse und der Proteinbestimmung der primären Fibroblasten.

Probe	$C_{\text{Ubichinol-50}}$ in [ng/ml]	$C_{\text{Ubichinon-50}}$ in [ng/ml]	C_{gesamt} in [ng/ml]	$\mu\text{g}_{\text{Protein}}/$ ml_{Probe}	$\text{ng}_{\text{Ubichinon (gesamt)}}/$ $\mu\text{g}_{\text{Protein}}$
1	43.5	113.4	156.9	1.231	127.4
2	27.9	79.2	107.1	2.337	45.8
3	10.4	60.2	70.6	2.201	32.1
4	10.1	173.4	183.5	0.989	185.5
5	13.5	181.6	195.1	1.494	130.6
6	8.6	95.9	104.5	1.884	55.5

Bildet man den Mittelwert aus ng Ubichinon-50 (gesamt) zu μg Protein, erhält man für diese Proben 96.17 ng Ubichinon-50 (gesamt) zu 1 μg Protein. Die relative Standardabweichung beträgt 64 %.

Die Zugabe von α -Tocopherol während der Extraktion hat einen positiven Einfluss auf den detektierten Ubichinon-50-Gehalt. Die Lagerung der Proben bei -20°C mindert den Gehalt an Ubichinol-50. Die Proben 1 und 2 wurden zuerst analysiert und weisen dementsprechend einen höheren Ubichinol-50-Gehalt auf. In der Abbildung 6-10 ist als Beispiel die chromatographische Trennung von Ubichinol-50 und Ubichinon-50 der Probe 2 dargestellt.

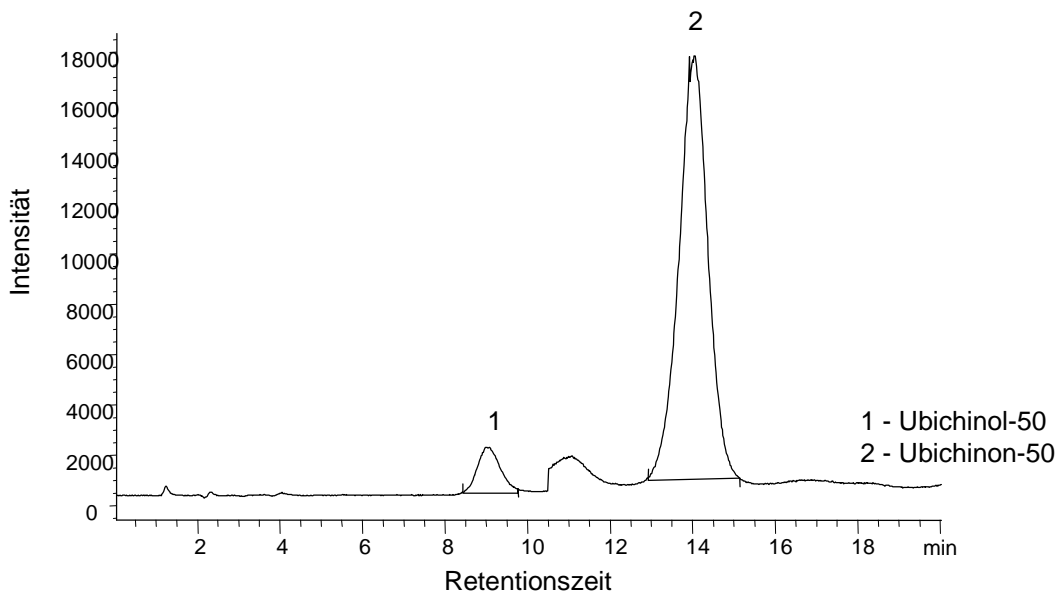


Abbildung 6-10.

Chromatographische Trennung von Ubichinol-50 und Ubichinon-50 mit der Trennsäule LiChropsher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm) von Zellkultur (Probe 2).

Die für weitere Extraktionen verwendete Vorschrift ist in Kapitel 6.1.4 ausführlich wiedergegeben.

6.4 Diskussion der Ergebnisse

Die flüssigchromatographischen Methoden gekoppelt mit coulometrischer bzw. massenselektiver Detektion gewährleiten die Bestimmung von Ubichinon-50 sowie Ubichinol-50 nebeneinander im spurenanalytischen Bereich. Mit der LC/MS ist Ubichinon-50 mit 0.57 ng/ml an der Nachweisgrenze detektierbar. Der Variationskoeffizient für diese Methode lag bei maximal 10 % bei der Detektion an der Nachweisgrenze. Der Korrelationsfaktor für die Kalibrierfunktion betrug 0.997. Die HPLC-ECD-Methode ermöglichte die Quantifizierung von 11.4 ng/ml Ubichinon-50. Die relative Standardabweichung dieser Methode lag bei maximal 8 % bei der Detektion an der Nachweisgrenze und der Korrelationsfaktor für die Geradengleichung betrug 0.965.

In humanen Zellen wurde Ubichinon-50, in Zellkultur Ubichinon-50 und Ubichinol-50 quantitativ bestimmt. Die Aufarbeitung und Extraktion der Zellen ist von besonderer Bedeutung für den Nachweis der Verbindung Ubichinol-50. Diese Substanz ist sehr oxidationsempfindlich und verlangt eine schnelle Aufarbeitung bei ca. 0°C unter Minimierung des Lichteinflusses. Berechnet man die relative Standardabweichung für die Ubichinon-Werte mehrerer Probanden erhält man Abweichungen von 50 % und mehr. Bei Humanproben sind diese Abweichungen nicht ungewöhnlich.

Die Lokalisation des Ubichinon-50 und Ubichinol-50 in der Mitochondrienmembran fordert die Permeabilisierung bzw. Zerstörung der Zellmembranen und Zellorganellen für die Extraktion. Diese wurde durch Frieren in flüssigem Stickstoff und Ultraschallbehandlung erreicht. Die dermalen Fibroblasten wurden für die Optimierung der Probenvorbereitung aufgrund der regelmäßigen Verfügbarkeit verwendet.

In den veröffentlichten Publikationen wurde der Ubichinon-50-Gehalt hauptsächlich in humanem Plasma bestimmt. Die Literatur verweist auch auf Bestimmungen von Ubichinon-50 in zellulärem Gewebe oder Zellkultur.

7 Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf Ubichinone

Die Verbindung Ubichinon-50 verändert sich durch Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten und sichtbaren Bereich. Dieses Kapitel stellt die durchgeführten Bestrahlungsexperimente der Verbindungen Ubichinon-50, Ubichinon-10 und Ubichinon-0 sowie die erzielten Resultate dar. Alle 3 Verbindungen gehören zur Substanzklasse der 1,4-Benzochinone. Außer den Photodegradationsstudien wurden ebenso Stabilisierungsexperimente durchgeführt und die Ergebnisse hier niedergelegt.

7.1 Bestrahlungsexperimente in Lösung

Für die Untersuchungen des Einflusses von elektromagnetischer Strahlung auf die Ubichinone wurden die Verbindungen gelöst. In Lösung können Reaktionsmöglichkeiten mit weiteren Verbindungen (außer Lösungsmittelmoleküle) oder Energieübertragung auf andere Reaktionspartner ausgeschlossen werden. Ubichinon-10 und Ubichinon-0 sind Ubichinone mit verkürzter bzw. ohne isoprenoide Seitenkette. Diese Verbindungen wurden aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu Ubichinon-50 ausgewählt. Die Standardsubstanzen wurden über die Firma Sigma-Aldrich bezogen. Informationen zu den Substanzen sind im Abschnitt 9.4 niedergelegt. Das verwendete Ubichinon-50 wurde über die Firma Kaneka GmbH bezogen und als kosmetischer Rohstoff in Emulsionen eingearbeitet.

Zu den 1. Untersuchungen gehörte die Bestrahlung von 2 Ubichinon-50-n-Hexan-Lösungen im Suntest CPS+ mit 250 W/m^2 . Die Konzentration der Lösung 1 betrug 1.01 mg/ml und die der Lösung 2 1.008 mg/ml . Beide Lösungen wurden parallel bestrahlt, ein Aliquot nach 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten entnommen und mit HPLC-DAD der Gehalt an Ubichinon-50 bestimmt. Das Diagramm 7-1 zeigt die Veränderung beider Ubichinon-50 Lösungen. Die Bestrahlungsdauer wurde gegen die Signalflächen von Ubichinon-50 aufgetragen.

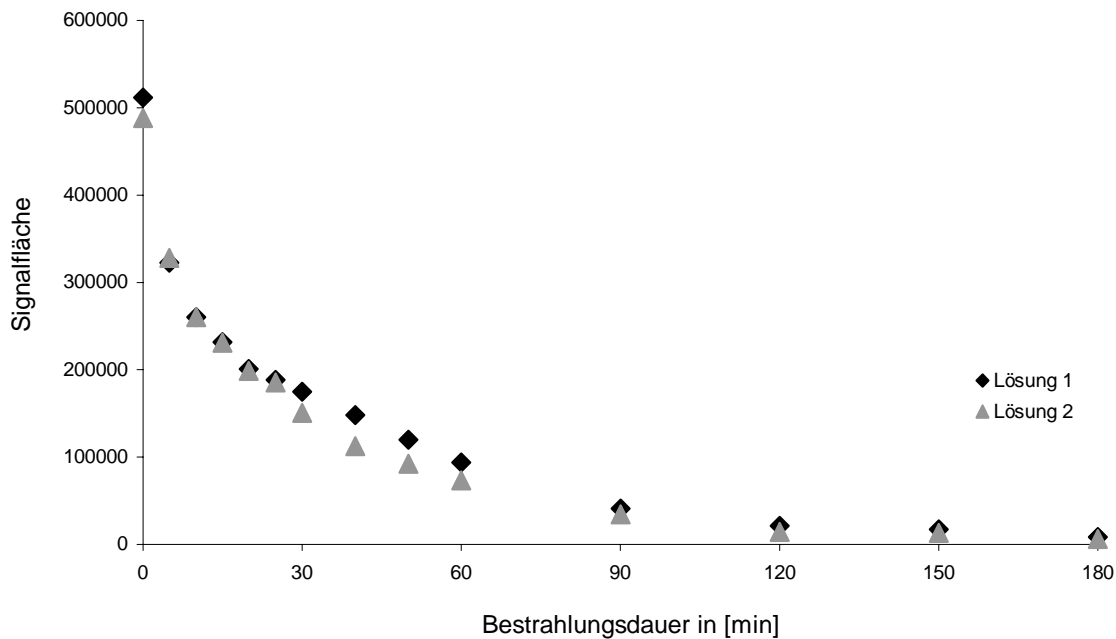


Abbildung 7-1.

Veränderung von Ubichinon-50 in n-Hexan durch elektromagnetische Strahlung.

Die relative Standardabweichung für die bestrahlten Ubichinon-50-Lösungen beträgt bis zu einer Dauer von 25 Minuten unter 5 %. Mit zunehmender Abnahme von Ubichinon-50 erhöht sich der Variationskoeffizient für diese Methode und liegt zwischen 7 und 14 %.

Die bestrahlten sowie unbestrahlten Lösungen wurden mit einer NP-HPLC-DAD-Methode chromatographisch untersucht. Die Trennung basierte auf einer Adsorptions-Chromatographie mit Normal-phase. Als stationäre Phase wurde eine GROM-SIL 120 Si NP-2, 5 μm (150*4 mm) als Trennphase verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus n-Heptan und Ethylacetat zusammen. Polare Verbindungen wurden stärker zurückgehalten als unpolare. Im Vergleich zur RP-Phase eluierte mit dieser Methode Ubichinon-50 vor Ubichinol-50 bzw. Ubichinon-50 vor Ubichinon-10 und Ubichinon-0. Die ursprüngliche NP-HPLC-Methode von der Fa. Kaneka GmbH wurde für die Trennung der bestrahlten Lösungen optimiert, indem eine Kieselgelsäule mit veränderter Selektivität, n-Heptan als Eluent und ein Gradientenverlauf zum Einsatz kamen. Die Detektion erfolgte mit einem Photodiodenarraydetektor bei 268 nm oder

274 nm in Abhängigkeit vom verwendeten Messgerät. Die Parameter der HPLC-DAD-Methode sind in Kapitel 9.1.8 dargestellt.

Aus der Ubichinon-50 n-Hexan-Stammlösung (1.82 mg/ml) wurden 10 Standard-Lösungen für die Ermittlung der externen Kalibrierfunktion erstellt. Die 10 Lösungen wurden je 6mal ins System injiziert und anschließend die Standardabweichung, der Variationskoeffizient und der Korrelationskoeffizient ermittelt. Die externe Kalibrierfunktion wurde mit linearer Regression bestimmt und entspricht der Funktion $y = 5336x + 99881$. Diese Funktion wurde zur quantitativen Bestimmung des Ubichinon-50-Gehaltes verwendet. Der Korrelationsfaktor der Funktion betrug 0.997. Die Nachweisgrenze für Ubichinon-50 in n-Hexan lag bei 0.91 µg/ml. Dies entsprach einer aufgegebenen Gesamtmenge von 0.0182 µg. In Tabelle 7-1 sind die Mittelwerte der Signalfächen y_m , die errechnete Standardabweichung s_x und der Variationskoeffizient V für die 10 Lösungen aufgeführt.

Tabelle 7-1.

Darstellung der Daten für die Kalibrierung von Ubichinon-50 mit HPLC-DAD.

c in [µg/ml]	y_m	s_x	V [%]
1.82	13637	965	7.1
3.64	17760	666	3.8
9.10	75533	1426	1.9
18.20	123393	3132	2.5
36.40	164233	4539	2.8
91.00	648025	25815	4.0
182.00	1226106	79375	6.5
364.00	2454396	102915	4.2
910.00	4838169	52578	1.1
1820.00	9773382	84469	0.9

Für Ubichinon-50 in Ethanol wurden aus der Stammlösung (0.532 mg/ml) 7 Lösungen für die Erstellung einer externen Kalibrierfunktion hergestellt. Die 7 Lösungen wurden doppelt ins HPLC-System injiziert und die Kalibrierfunktion ermittelt. Die Geradengleichung $y = 8061x + 63198$ erhält man nach Durchführung der linearen Regression. Der Korrelationsfaktor betrug 0.998.

7.1.1 Einfluss des Lösungsmittels

Ubichinon-50 löst sich sehr gut in unpolaren Lösungsmitteln. Die Löslichkeit nimmt ab, wenn das Lösungsmittel polarer wird. Ausschlaggebend für die Wahl der Lösungsmittel waren deren Polarität und die Löslichkeit von Ubichinon-50. Ubichinon-50 wurde in n-Hexan und Ethanol gelöst. Ethanol wurde exemplarisch für polare und n-Hexan für unpolare Lösungsmittel ausgewählt. Ubichinon-10 und Ubichinon-0 lösen sich sehr gut in polaren Lösungsmitteln. Von diesen Verbindungen wurden Lösungen mit Ethanol hergestellt. In Abbildung 7-2 sind die UV-Spektren der Verbindungen in Ethanol dargestellt.

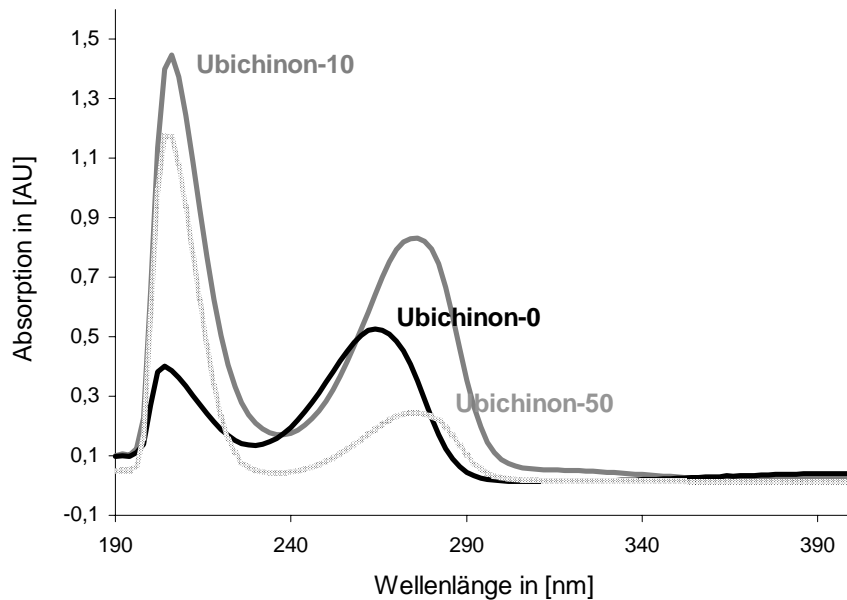


Abbildung 7-2.

UV-Spektren von Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 in Ethanol.

Die UV-Spektren wurden mit dem Diode Array Spectrophotometer 8452 A der Firma Agilent Technology aufgenommen. Ubichinon-50 hat lokale Absorptionsmaxima bei 204 und 274 nm, Ubichinon-10 bei 206 und 276 nm und Ubichinon-0 bei 202 und 264 nm. In den UV-Spektren ist ein bathochromer sowie hyperchromer Effekt von Ubichinon-0 nach Ubichinon-50 erkennbar.

Ubichinon-50-Lösungen in Ethanol und n-Hexan, Ubichinon-10- und Ubichinon-0-Lösungen in Ethanol wurden im Suntest CPS+ bestrahlt. Für die Bestrahlungsexperimente im Suntest CPS+ diente eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm. Während der Bestrahlung wurde die Quarzküvette verschlossen, um ein Verdampfen des Lösungsmittels zu vermeiden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Lösungen entnommen und analysiert, z. B. nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten. Bei den verwendeten Lösungen handelte es sich um verdünnte Lösungen.

Die Abbildungen 7-3 und 7-4 zeigen eine Auswahl an Chromatogrammen von Ubichinon-50 in Ethanol und n-Hexan mit zunehmender Bestrahlungsdauer.

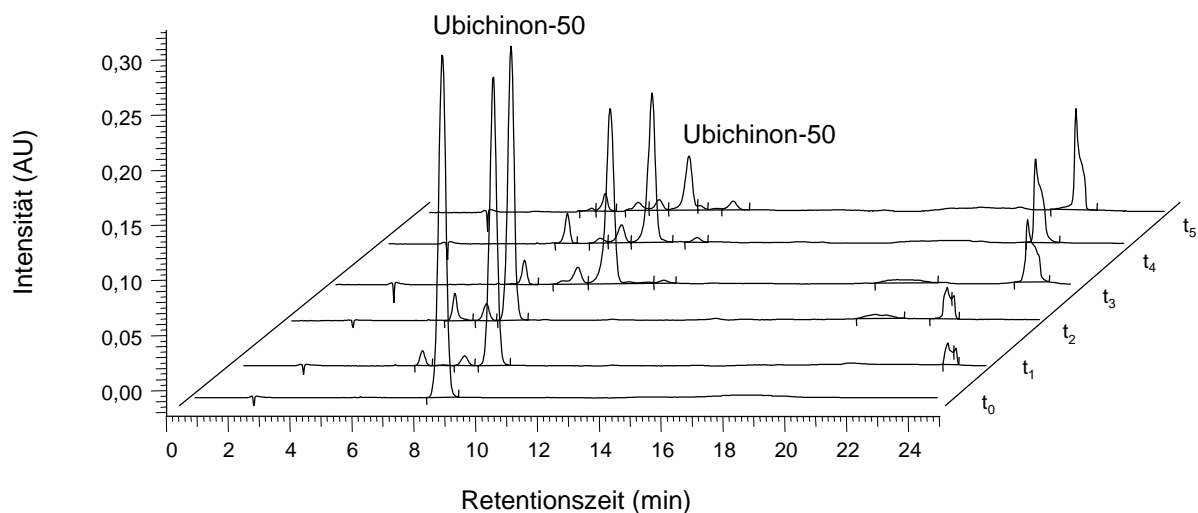


Abbildung 7-3.

Darstellung der Veränderung von Ubichinon-50 in Ethanol nach Bestrahlung. Ausgangskonzentration (Ubichinon-50) = 0.532 mg/ml, Intensität = 250 W/m². Entnahme der Aliquots nach 5 (t_1), 10 (t_2), 15 (t_3), 20 (t_4) und 40 (t_5) Minuten.

Durch Lichteinwirkung auf in Ethanol gelöstes Ubichinon-50 entstehen innerhalb weniger Minuten Verbindungen, die mit der HPLC-DAD-Methode nachweisbar sind. Die Signale zeigten überwiegend ein ähnliches bzw. identisches UV-Spektrum wie Ubichinon-50. Nach einer Bestrahlungszeit von 40 Minuten wurden 8 zusätzliche Signale mit der Methode nachgewiesen. Dabei reduzierte sich der Anteil von Ubichinon-50 auf etwa 16 % im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Wie in der Literatur [139-142] beschrieben, verläuft der Abbau von Ubichinon-50 durch elektromagnetische

Strahlung nach einer Reaktionskinetik 1. Ordnung. Diese Kinetik wird im vorliegenden Fall durch die Gleichung $y = 1.0664 e^{-0.0462x}$ dargestellt.

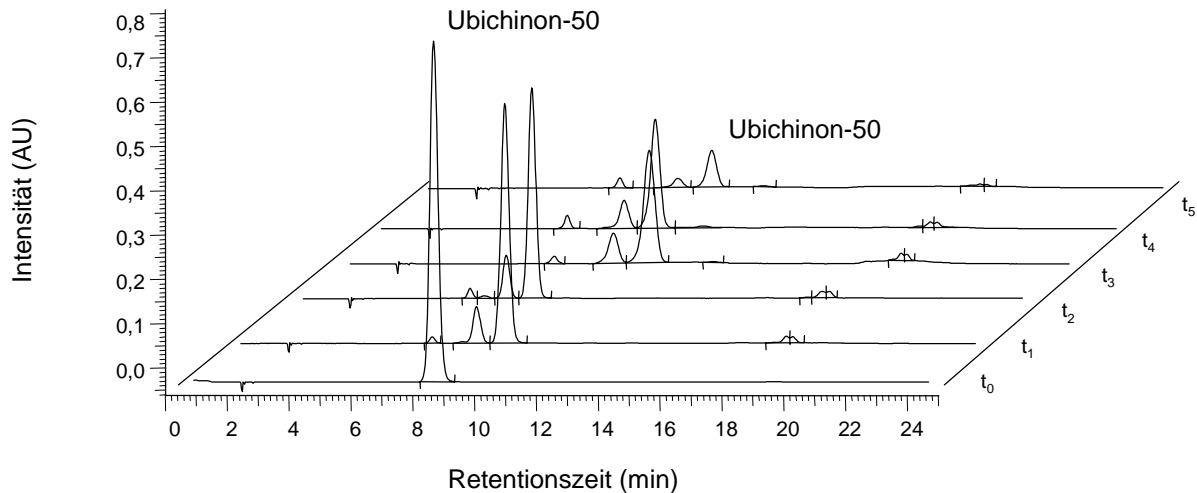


Abbildung 7-4.

Darstellung der Veränderung von Ubichinon-50 in n-Hexan nach Bestrahlung. Ausgangskonzentration (Ubichinon-50) = 1.508 mg/ml, Intensität = 250 W/m². Entnahme der Aliquots nach 5 (t₁), 10 (t₂), 15 (t₃), 20 (t₄) und 40 (t₅) Minuten.

Ist Ubichinon-50 in n-Hexan gelöst, entstanden bei Lichteinwirkung ebenfalls Bestrahlungsaddukte bzw. -produkte. Nach einer Bestrahlungszeit von 5 Minuten waren im Chromatogramm 3 neue Signale sichtbar. Nach 40 Minuten Lichteinwirkung waren 5 zusätzliche Signale mit der HPLC-DAD-Methode nachweisbar. Der Anteil von Ubichinon-50 in Lösung verringerte sich auf ca. 13 % bezogen auf die Ausgangskonzentration. Der Abbau von Ubichinon-50 in n-Hexan wird durch die Funktion $y = 0.9766 e^{-0.0518x}$ beschrieben.

Vergleicht man die Ergebnisse der Photodegradation von Ubichinon-50 in Ethanol und n-Hexan, stellt man fest, dass mit dem polaren Lösungsmittel Ethanol mehr Bestrahlungsaddukte bzw. -produkte erzeugt werden. Der Gehalt an Ubichinon-50 ist in beiden Lösungsmitteln nach 40 Minuten ähnlich. Die geringfügige Variation ist durch die geringere Konzentration von Ubichinon-50 in Ethanol zu erklären.

Ubichinon-0 und Ubichinon-10, gelöst in Ethanol, wurden ebenfalls mit einer Intensität von 250 W/m² im Suntest CPS+ bestrahlt. Ubichinon-0 ist nach einer Bestrah-

lungsdauer von 5 Minuten nicht mehr detektierbar. Das Chromatogramm zeigte dafür eine Häufung von nicht basisliniengetrennten Signalen. Die Chromatogramme von Ubichinon-0 sind in Kapitel 9.3.7 dargestellt. Ubichinon-10 wurde gleichen Bestrahlungszyklen unterworfen wie Ubichinon-50. Dabei wurde festgestellt, dass der Gehalt an Ubichinon-10 langsamer abnimmt wie der Gehalt von Ubichinon-50. Von Ubichinon-10 wurden nach einer Bestrahlungszeit von 40 Minuten noch 37 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen. Die bestrahlten Ubichinon-10-Lösungen zeigten nach chromatographischer Trennung wie Ubichinon-50 mehrere neue Signale im Chromatogramm.

7.1.2 Wellenlängenabhängigkeit

Ubichinon-50 wurde mit Licht verschiedener Wellenlänge bestrahlt. Hierfür wurde die Quarzküvette im Suntest CPS+ mit Glas bzw. Ceranglas abgedeckt. Glas ist durchlässig für elektromagnetische Strahlung größer als 300 nm. Ceranglas absorbiert die Strahlung bis 600 nm. In 7-5 sind die UV-Spektren für Glas und Ceranglas abgebildet.

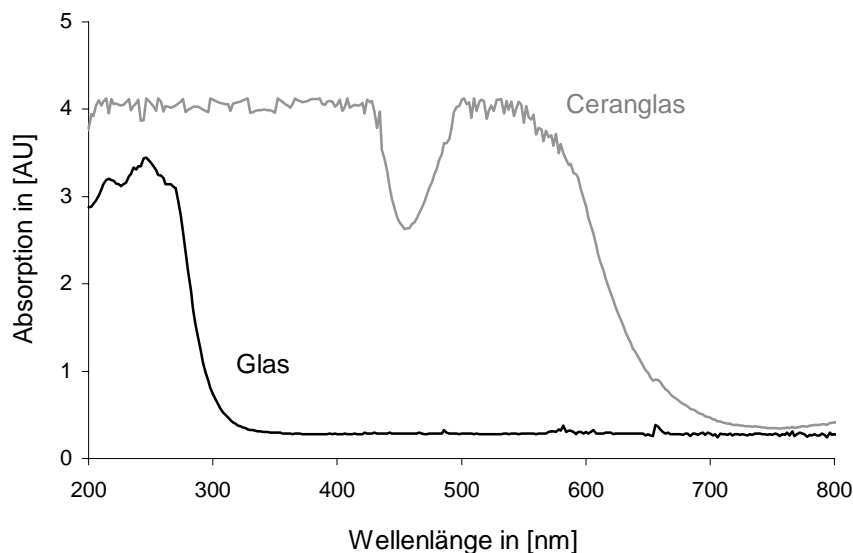


Abbildung 7-5.
UV/VIS-Spektren von Glas und Ceranglas.

Ubichinon-50 in Ethanol und n-Hexan gelöst, wurde mit elektromagnetischer Strahlung kleiner 300 nm, größer 300 nm und größer 600 nm bestrahlt. Zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 und t_5 (siehe 8.1.1) wurde der Gehalt von Ubichinon-50 flüssigchromatographisch bestimmt. Die Bestrahlungsleistung des Suntest CPS+ lag für diese Versuchsreihe bei 250 W/m^2 .

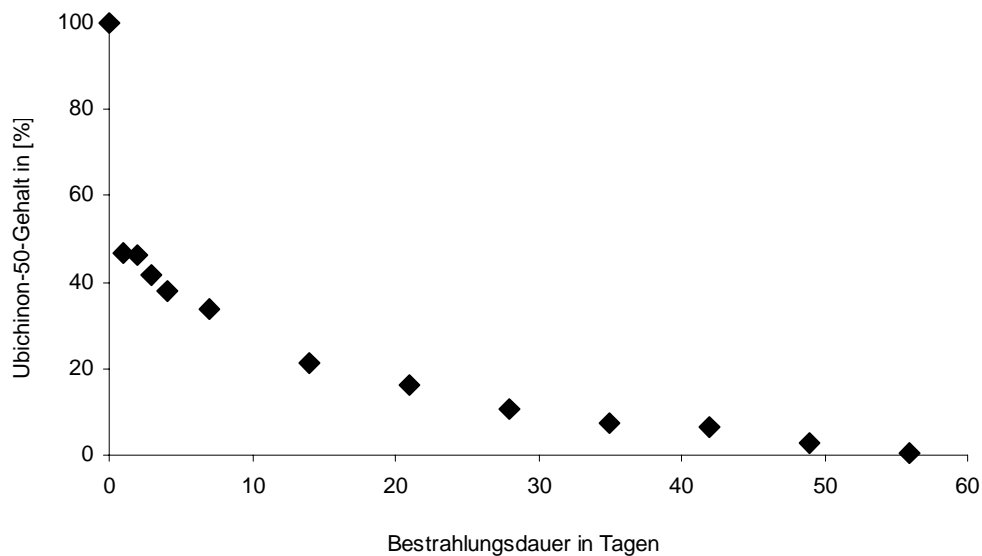
Die Auswertung der Chromatogramme ergab die geringste Konzentrationsabnahme von Ubichinon-50 bei der Bestrahlung mit elektromagnetischer Strahlung größer 600 nm. Die elektromagnetischen Strahlen mit einer Wellenlänge größer 300 nm führten zu einer Reduzierung des Ubichinon-50 Gehaltes auf etwa 1/5 des Ausgangswertes. Der stärkste Abbau von Ubichinon-50 wurde, wie erwartet, bei der Bestrahlung unter 300 nm festgestellt. Die Tabelle 7-2 spiegelt die Ergebnisse der Bestrahlung von Ubichinon-50 in Ethanol und n-Hexan wider.

Tabelle 7-2.

Darstellung der Ubichinon-50 Gehalte in [%] bezogen auf den t_0 -Wert.

Zeit in [min]	Ubichinon in Ethanol (< 300 nm)	Ubichinon in Ethanol (> 300 nm)	Ubichinon in Ethanol (> 600 nm)	Ubichinon in n-Hexan (< 300 nm)	Ubichinon in n-Hexan (> 300 nm)	Ubichinon in n-Hexan (> 600 nm)
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	83.0	83.2	100.0	71.1	75.2	100.0
10	71.4	72.6	100.0	57.7	62.4	97.7
15	56.7	57.0	98.9	46.2	47.9	97.4
20	44.4	47.9	98.4	36.8	36.7	96.0
40	16.4	23.2	95.8	12.9	18.5	95.7

In einem weiteren Versuch, wurde eine Küvette mit einer Ubichinon-50 n-Hexan-Lösung der täglichen Sonneneinstrahlung der Monate Februar und März ausgesetzt. Im Sommer strahlt die Sonne mit einer Leistung von etwa 900 W/m^2 . Die Leistung setzt sich zusammen aus ca. 800 W/m^2 Direktstrahlung und ca. 100 W/m^2 Streustrahlung. Im Winter sind es ca. 165 W/m^2 Direktstrahlung und ca. 100 W/m^2 Streustrahlung. Der Ubichinon-Lösung wurde nach 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 und 56 Tagen ein Aliquot entnommen und mit NP-HPLC-DAD chromatographisch untersucht. Die Konzentration der Lösung betrug 0.5875 mg/ml . Das Diagramm in 7-6 verdeutlicht die Abnahme von Ubichinon-50.

**Abbildung 7-6.**

Abnahme von Ubichinon-50 in n-Hexan durch Sonnenlicht. Konzentration der unbestrahlten Lösung 0.5875 mg/ml. Nach dem 1. Tag wurde noch 46.9 % Ubichinon-50 und nach 56 Tagen 0.3 % Ubichinon-50 detektiert.

Die Auswertung der Chromatogramme ergab weiterhin, dass sich mehrere Abbauprodukte bilden, wovon 2 Verbindungen Konzentrationen über 10 % erreichen. Bei diesen Abbauprodukten handelt es sich um Ubichromenol-45 und das cis-Isomer von Ubichinon-50. Im energetisch günstigen Zustand liegt Ubichinon-50 als trans-Isomer vor. Zu den weiteren Bestrahlungsprodukten gehören Ubichinol-50 und Dehydroubichinon. Ubichinol-50 wurde nur 2mal in den Chromatogrammen bestimmt. Die Charakterisierung der entstehenden Abbauprodukte ist in Kapitel 8.5 niedergelegt. Im Kapitel 9.3.7 sind einige HPLC-DAD-Chromatogramme abgebildet.

Zwischen den Isomeren des Ubichinon-50 bildete sich ein Gleichgewicht aus. Die Konzentration des cis-Isomeren erreichte nach 14 tägiger Bestrahlung das Maximum von 14 % und nahm anschließend langsam wieder ab. Die Konzentration von Ubichromenol-45 wuchs stetig an und erreichte nach 56 Bestrahlungstagen einen prozentualen Anteil von 86 %. Die Abbildung 7-7 stellt graphisch die Veränderung des Gehaltes der 3 Verbindungen in Lösung dar. Die Signalflächen von Ubichromenol-45, cis-Ubichinon-50 und trans-Ubichinon-50 wurden addiert und jeweils auf 100 % normiert. Neben diesen Photodegradationsprodukten konnten in den Chromatogram-

men weitere Substanzen bestimmt werden, die für diese Grafik nicht bedeutsam sind. Des Weiteren ist es möglich, dass nicht alle Photodegradationsprodukte chromatographisch erfasst wurden.

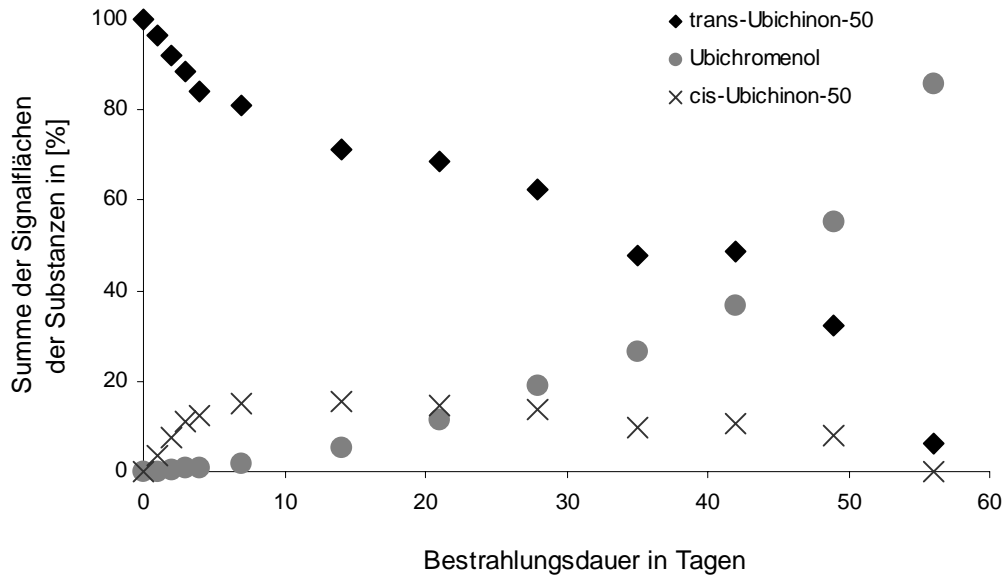
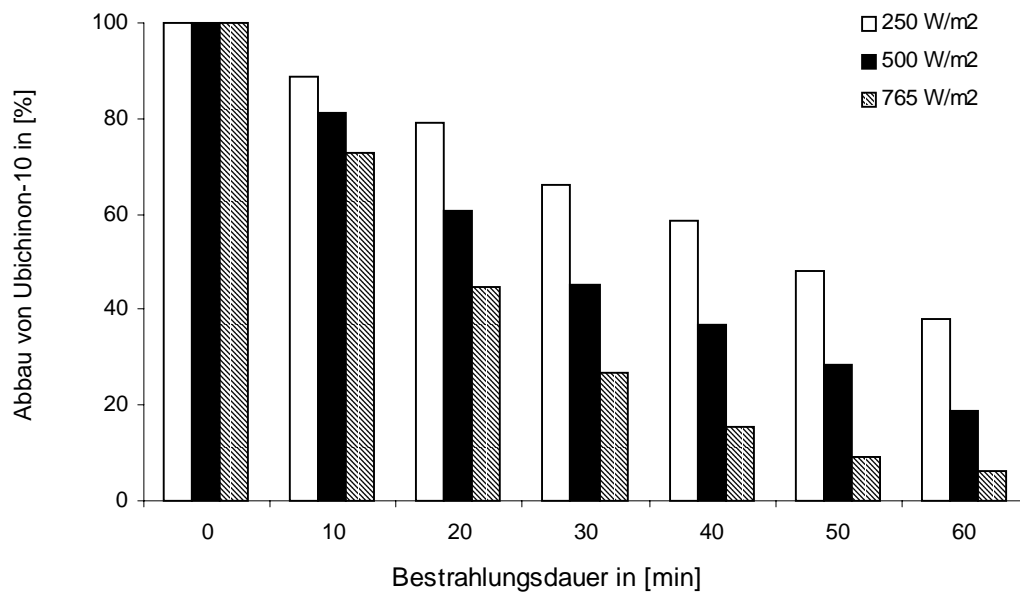


Abbildung 7-7.

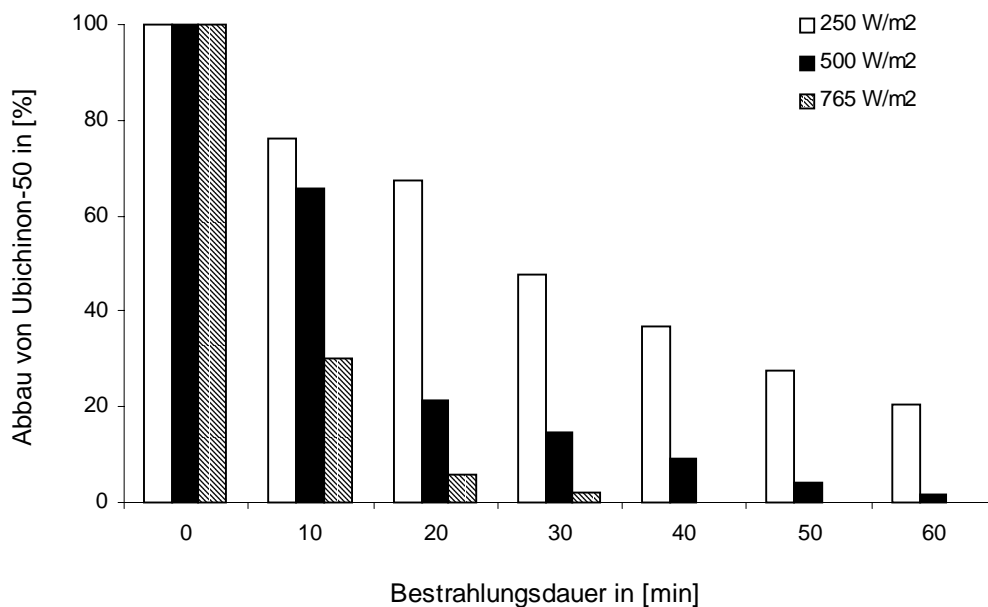
Darstellung der Veränderung von Ubichromenol-45, trans- und cis-Ubichinon-50 durch Sonnenlicht.

7.1.3 Einfluss der Lichtintensität

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Bestrahlungsintensitäten wurden Ubichinon-50-Lösungen in Ethanol und n-Hexan sowie Ubichinon-10-Lösungen in Ethanol mit 250 W/m^2 , 500 W/m^2 und 765 W/m^2 im Suntest CPS+ bestrahlt. In Intervallen von 10 Minuten wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten je ein Aliquot entnommen und flüssigchromatographisch der Gehalt der Ubichinone quantitativ bestimmt. Die Diagramme in 7-8 und 7-9 zeigen die Veränderung des Gehaltes von Ubichinon-50 und Ubichinon-10 in Ethanol bei verschiedenen Bestrahlungsintensitäten.

**Abbildung 7-8.**

Abbauverhalten von Ubichinon-10 in Ethanol durch verschiedene Lichtintensitäten im Suntest CPS+, Konzentration = 0.99 mg/ml.

**Abbildung 7-9.**

Abbauverhalten von Ubichinon-50 in Ethanol durch verschiedene Lichtintensitäten im Suntest CPS+, Konzentration = 0.532 mg/ml.

Ubichinon-50 in n-Hexan gelöst, ergab ein nahezu identisches Diagramm wie Ubichinon-50 in Ethanol. Mit zunehmender Lichtleistung stieg die Anzahl der zu detektierenden Signale im Chromatogramm und der Gehalt der Ubichinone verringerte sich. Durch Bestrahlen mit hoher Lichtleistung können energiereiche und kurzlebige Spezies entstehen. Die Verbindung Ubichinol-50 entstand bei 500 W/m^2 und 765 W/m^2 in höheren Konzentrationen.

Die Diagramme zeigen, dass Ubichinon-10 auf die Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung nicht mit einer so drastischen Konzentrationsabnahme reagiert wie Ubichinon-50. Die Anregung energetisch höherer Zustände des Ubichinon-10 benötigt mehr Energie im Vergleich zu Ubichinon-50.

7.2 Bestrahlung von Zellkultur

In Zellkultur wurde mit der LC/MS-Methode Ubichinon-50 und Ubichinol-50 quantitativ bestimmt. Diese Daten und die erarbeitete Probenvorbereitung sind Ausgangswerte für die Durchführung von Bestrahlungsexperimenten. Für die Bestrahlung der Zellkulturen wurde die Bestrahlungsleistung von 250 W/m^2 und 500 W/m^2 gewählt. Die Bestrahlungsdauer betrug 10 Minuten. Es wurden je Leistung 3 Petrischalen mit Zellkultur im Suntest CPS+ bestrahlt.

Ausgehend von 2mal 24 ml Zellsuspension wurde diese in 6mal 8 ml geteilt und in Petrischalen überführt. Bei den *in vitro* Bestimmungen wurde mit geschlossenen Systemen gearbeitet. 3 Petrischalen wurden mit 250 W/m^2 und 3 mit 500 W/m^2 bestrahlt. Die bestrahlten Zellen wurden in ein Vial überführt und die Petrischale mit 2 ml PBS-Lösung nachgewaschen; 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in $250 \mu\text{l}$ PBS-Lösung aufgenommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und nach Vorschrift in 6.1.4 aufgearbeitet. Nach der Extraktion der Zellkultur wurde die n-Hexanphase in ein Analysenvial überführt und am LC/MS-System analysiert. Die Zeit von der Entnahme der Fibroblasten aus dem Brutschrank bis zur Überführung ins Analysenvial betrug mit Bestrahlung ca. 3 Stunden.

In den bestrahlten Zellen wurde kein Ubichinol-50 detektiert. Die Tabelle 7-3 stellt die ermittelten Werte der Bestrahlung dar.

Tabelle 7-3.

Vergleich des Gehaltes von Ubichinon-50 in bestrahlter und unbestrahlter Zellkultur.

unbestrahlt	10 min 250 W/m^2	10 min 500 W/m^2
173.4 ng/ml	0.64 ng/ml	0.40 ng/ml
181.6 ng/ml	0.58 ng/ml	0.41 ng/ml
95.9 ng/ml	0.67 ng/ml	0.35 ng/ml

Die Bestrahlungsexperimente mit Zellkultur führten zu einer Reduktion des Ubichinon-50 Gehaltes von über 99 %. Den Fibroblasten wurde nach der Bestrahlung keine

Möglichkeit einer Regeneration gegeben. Folgende Versuchsreihen könnten diese miteinbeziehen. Die Zugabe von stabilisierend wirkenden Substanzen zu den primären Fibroblasten während der Bestrahlung kann ein weitere experimentelle Studie darstellen.

7.3 Differenzierung und Charakterisierung der entstehenden Produkte

Die Bestrahlungsexperimente mit Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 zeigten eine Abnahme des Eduktes und die Entstehung neuer Signale in den HPLC-DAD-Chromatogrammen. Neben der Entstehung neuer Signale änderte sich die Farbe der bestrahlten Lösungen. Bei Ubichinon-50 in n-Hexan veränderte sie sich von gelb bis gelborange nach orange-braun. Die orange-braune Flüssigkeit setzte sich am Boden ab und war mit n-Hexan nicht mehr mischbar. Mit mehreren spektroskopischen Methoden wurde versucht die entstehenden Substanzen zu charakterisieren. Die bestrahlten Lösungen wurden dafür flüssigchromatographisch getrennt und fraktioniert. Die Charakterisierung erfolgte mit Massenspektrometrie, IR- und NMR-Spektroskopie. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden beschrieben.

7.3.1 HPLC gekoppelt mit DAD

Während der Bestrahlungen wurden Aliquots entnommen und mit der HPLC-DAD-Methode chromatographisch untersucht. Durch die Detektion mit dem Photodiodenarraydetektor wurde für jedes Signal das zugehörige UV-Spektrum aufgezeichnet. Das UV-Spektrum kann Hinweise auf eine Strukturveränderung im Molekül geben, wenn diese mit einer Änderung der Absorption einhergeht.

Als Beispiel wurde Ubichinon-50, in n-Hexan 21 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt, ausgewählt. Das HPLC-DAD-Chromatogramm ist in 7-10 abgebildet. An den DAD wurde ein Fraktionssammler angeschlossen, die mobile Phase in Vials überführt und zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für die Fraktionierung der bestrahlten Lösung wurde die Substanzmenge, die auf die Säule gegeben wurde, verfünffacht. Die Auftrennung gestaltete sich wie folgt:

Fraktion	1	0.0 bis 3.9 Minuten
Fraktion	2	3.9 bis 4.5 Minuten
Fraktion	3	4.5 bis 5.1 Minuten
Fraktion	4	5.1 bis 6.2 Minuten

Fraktion	5	6.2 bis 7.5 Minuten
Fraktion	6	7.5 bis 9.4 Minuten
Fraktion	7	9.4 bis 10.2 Minuten
Fraktion	8	10.2 bis 12.1 Minuten
Fraktion	9	12.1 bis 13.5 Minuten
Fraktion	10	13.5 bis 14.2 Minuten
Fraktion	11	14.2 bis 16.0 Minuten

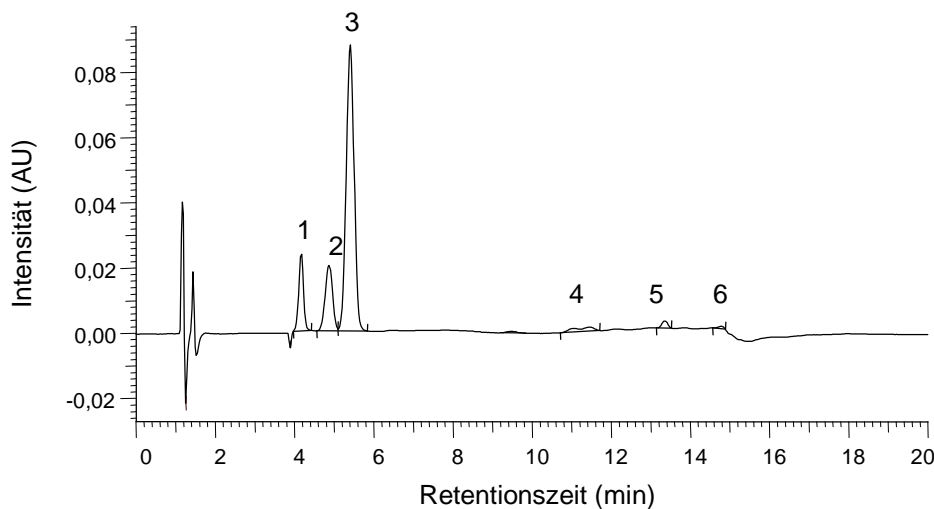


Abbildung 7-10.

Chromatographische Trennung einer bestrahlten Lösung von Ubichinon-50 in n-Hexan mit der Trennsäule GROM-SIL 120 NP-SI 2, 5 μm (150*4 mm).

Das UV-Spektrum des Signales 1 zeigt 3 lokale Absorptionsmaxima bei 245 nm, 271 nm und 327 nm. Die Substanz eluiert vor Ubichinon-50 (3) und ist demzufolge unpolarer. Vergleiche mit Literaturdaten [143] zeigten, dass es sich bei dieser Substanz um Ubichromenol-45 handelt. Ubichromenol-45 ist in der Literatur mehrfach beschrieben und entsteht durch Cyclisierung aus Ubichinon-50.

Das UV-Spektrum des Signales 2 ist identisch mit dem UV-Spektrum von Signal 3. Das Signal 3 charakterisiert die Ausgangsverbindung Ubichinon-50. Die beiden Verbindungen sind sich strukturell sehr ähnlich und eluieren in knapper Folge. Wie in 3.5 beschrieben, entstehen vielfach Isomere der Edukte bei photochemischen Reaktionen. Die Entstehung eines Stereoisomeres ist sehr wahrscheinlich. Die isoprenoide

Seitenkette des Ubichinon-50 enthält isolierte Doppelbindungen. Diese können unter Rotation um ihre C=C-Doppelbindung cis-trans-Isomerisierungen eingehen.

Die UV-Spektren von Signal 4, 5 und 6 zeigten eine Verschiebung des Absorptionsmaxima zu 271 nm. Diese Produkte sind polarer als Ubichinon-50. Genauere Aussagen über diese Verbindungen sind nicht möglich.

Außer Ubichinon-50 wurde auch Ubichinon-10 und Ubichinon-0 fraktioniert. Ubichinon-10 und Ubichinon-0 wurden 1 Stunde bei 500 W/m^2 bestrahlt, alle 10 Minuten Aliquots entnommen, chromatographisch getrennt und fraktioniert. Der chromatographische Lauf einer bestrahlten Ubichinon-10-Lösung wurde wie folgt separiert:

Fraktion	1	0.0 bis 3.8 Minuten
Fraktion	2	3.8 bis 4.3 Minuten
Fraktion	3	4.3 bis 5.3 Minuten
Fraktion	4	5.3 bis 6.6 Minuten
Fraktion	5	6.6 bis 7.9 Minuten
Fraktion	6	7.9 bis 12.5 Minuten
Fraktion	7	12.5 bis 16.3 Minuten

Die Chromatogramme der bestrahlten Lösungen von Ubichinon-10 und Ubichinon-0 sind in Kapitel 9.3.7 abgebildet.

Die Elutionskurven von bestrahlten Ubichinon-10 Lösungen zeigten mehrere Signale. Als Beispielchromatogramm ist in 7-11 die Trennung von Ubichinon-10 nach einem Bestrahlungszeitraum von 30 Minuten dargestellt. Möglich sind, wie bei Ubichinon-50, die Entstehung eines Ubichromenol-5 durch Cyclisierung, eine Reduktion zu Ubichinol-10, eine cis-trans-Isomerisierung zu cis-Ubichinon-10 und eine O-Demethylierung zu Dehydroubichinon-10.

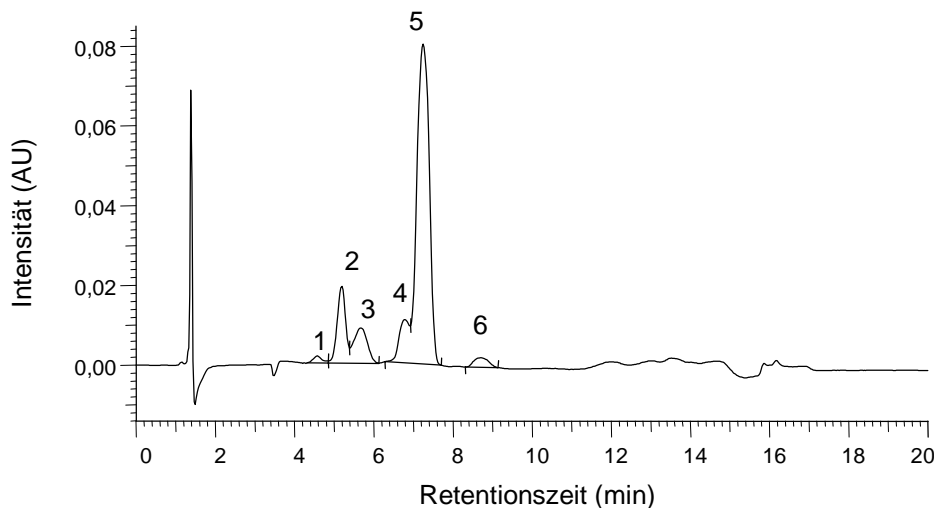


Abbildung 7-11.

Chromatographische Trennung einer bestrahlten Lösung von Ubichinon-10 in Ethanol mit der Trennsäule GROM-SIL 120 NP-Si 2, 5 μm (150*4 mm).

Das UV-Spektrum des Signales 5 (Ubichinon-10) hat ein lokales Absorptionsmaximum bei 268 nm. Bei Signal 2 handelt es sich dem UV-Spektrum nach, um das Cyclisierungsprodukt Ubichromenol-5. Dieses Signal hat lokale Absorptionsmaxima bei 239 nm, 271 nm und 326 nm und ist vom UV-Spektrum her vergleichbar mit dem Signal 1 aus Abbildung 8-11. Das Signal 1 hat lokale Absorptionsmaxima bei 239 nm und 266 nm; Signal 3 bei 239 nm und 271 nm. Signal 4 verfügt über ein nahezu identisches UV-Spektrum, wie Ubichinon-10. Bei Signal 4 könnte es sich wiederum um ein Stereoisomer der Ausgangsverbindung handeln. Das UV-Spektrum von Signal 6 zeigt lokale Absorptionsmaxima bei 239 nm und 264 nm. Hierbei könnte es sich um das Ubichinol-10 handeln.

Wie in 7.1.1 beschrieben, verändert sich Ubichinon-0 mit Einfluss der elektromagnetischen Strahlung innerhalb von 5 Minuten. Die detektierten Signale zeigten alle gleiche UV-Absorptionsmaxima bei 258 nm und 384 nm. Diese Verbindungen eluierten mit niedrigeren Retentionszeiten und sind unpolarer als Ubichinon-0. Bei der Fraktionierung wurde von 1.5 bis 8.5 Minuten (Fraktion 1), von 8.5 bis 14.0 Minuten (Fraktion 2) und von 14.0 bis 20.0 Minuten gesammelt. Als Probe wurde eine Ubichinon-0 Lösung in Ethanol nach 10 minütiger Bestrahlung ausgewählt.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem FIA Mode ins Massenspektrometer injiziert.

7.3.2 Charakterisierung via API-ES-Massenspektrometer

Mit Hilfe des FIA-Mode wurden die einzelnen Fraktionen der bestrahlten Lösungen von Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 mit MeOH ins API-ES-MS injiziert. Als Ionisierungshilfe wurde NH_4Ac dem Methanol zugesetzt. Jede Fraktion wurde im positiven und negativen Ionenmodus vermessen. Der aufgenommene Massenbereich lag zwischen $m/z = 100$ und $m/z = 1000$.

Ubichinon-0 hat ein Molekulargewicht von 183.2, Ubichinon-10 von 318.4 und Ubichinon-50 von 863.4. Als Quasi-Molekular-Ionen entstanden im positiven Ionisierungsmodus Protonen $[\text{M}+\text{H}]^+$, Ammonium $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ und Natrium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukte. Im negativen Ionisierungsmodus entstanden unter Abspaltung eines Protons die Quasi-Molekular-Ionen $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Die Tabelle 7-4 stellt die aufgezeichneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse des negativen Ionisierungsmodus der einzelnen Fraktionen der Ubichinone dar.

Tabelle 7-4.

m/z -Zahlen von Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 im negativen Ionisierungsmodus.

Fraktionen	Ubichinon-0	Ubichinon-10	Ubichinon-50
1	-	-	-
2	-	-	861.7
3	-	-	861.8
4	-	-	861.8
5	-	-	862.7
6	-	-	-
7	-	-	864.7
8	-	-	832.7, 847.7, 864.6, 893.9
9	-	-	832.6, 848.8, 863.5, 893.8
10	-	-	847.7, 817.1
11	-	-	847.6

Ubichinon-0 und Ubichinon-10 zeigten im MS mit negativer Ionisierung keine Signale. Im MS wurden ausschließlich ständig wiederkehrende Massen der Lösungsmittel und anderer Verunreinigungen detektiert.

Für Ubichinon-50 wurden im negativen Ionisierungsmodus mehrere m/z-Verhältnisse detektiert. m/z = 861.7 erhält man unter Abspaltung eines Protons aus dem Molekül Ubichinon-50. m/z = 864.7 entstand durch Abspaltung eines Protons aus dem Molekül Ubichinol-50. Diese Verbindung hat ein um 2 Wasserstoffatome höheres Molekulargewicht als Ubichinon-50 ($MW_{\text{Ubichinol-50}} = 865.6$). Die Massenspur 847.7 erhält man durch Abspaltung einer Methyl-Gruppe (m/z = 15) aus dem Quasi-Molekular-Ion von Ubichinon-50, die Massenspur 832.6 durch Abspaltung einer Methoxygruppe und die Massenspur 817.1 durch die Abspaltung einer Methyl- und Methoxygruppe. Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 893.9 lässt sich durch Anlagerung bzw. Addition einer Methoxygruppe an eine Doppelbindung des Moleküls Ubichinol-50 darstellen.

In der Tabelle 7-5 sind die detektierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse des positiven Ionisierungsmodus der einzelnen Fraktionen der Ubichinone dargestellt.

Tabelle 7-5.

m/z-Zahlen von Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 im positiven Ionisierungsmodus.

Fraktionen	Ubichinon-0	Ubichinon-10	Ubichinon-50
1	183.1, 168.0, 155.1 140.1	-	-
2	183.1	341.2, 319.2	864.0
3	-	377.2, 341.2, 319.1	880.7, 863.7
4	-	341.1, 319.1	880.6, 863.7
5	-	301.1	880.6, 863.7
6	-	-	885.5, 863.7
7	-	-	923.7, 887.7, 882.7, 866.7
8	-	-	917.6, 894.6
9	-	-	917.7, 912.7, 896.9
10	-	-	912.7, 896.8, 869.4, 847.8
11	-	-	917.7, 913.7, 895.7, 877.7

Die Fraktion 1 der Ubichinon-0-Lösung zeigt im positiven Ionisierungsmodus mehrere Massenspuren, unter anderem das Protonen-Addukt $[M+H]^+$ mit der Massenspur von

183.1. $m/z = 168.0$ erhält man durch Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der Ausgangsverbindung, $m/z = 155.1$ durch Abspaltung einer CO-Gruppe und $m/z = 140.1$ durch Abspaltung einer Methyl-Gruppe und einer CO-Gruppe. In der Abbildung 7-12 sind Strukturen, die sich aus den Quasi-Molekular-Ionen $[M+H]^+$ des Ubichinon-0 ableiten lassen, dargestellt.

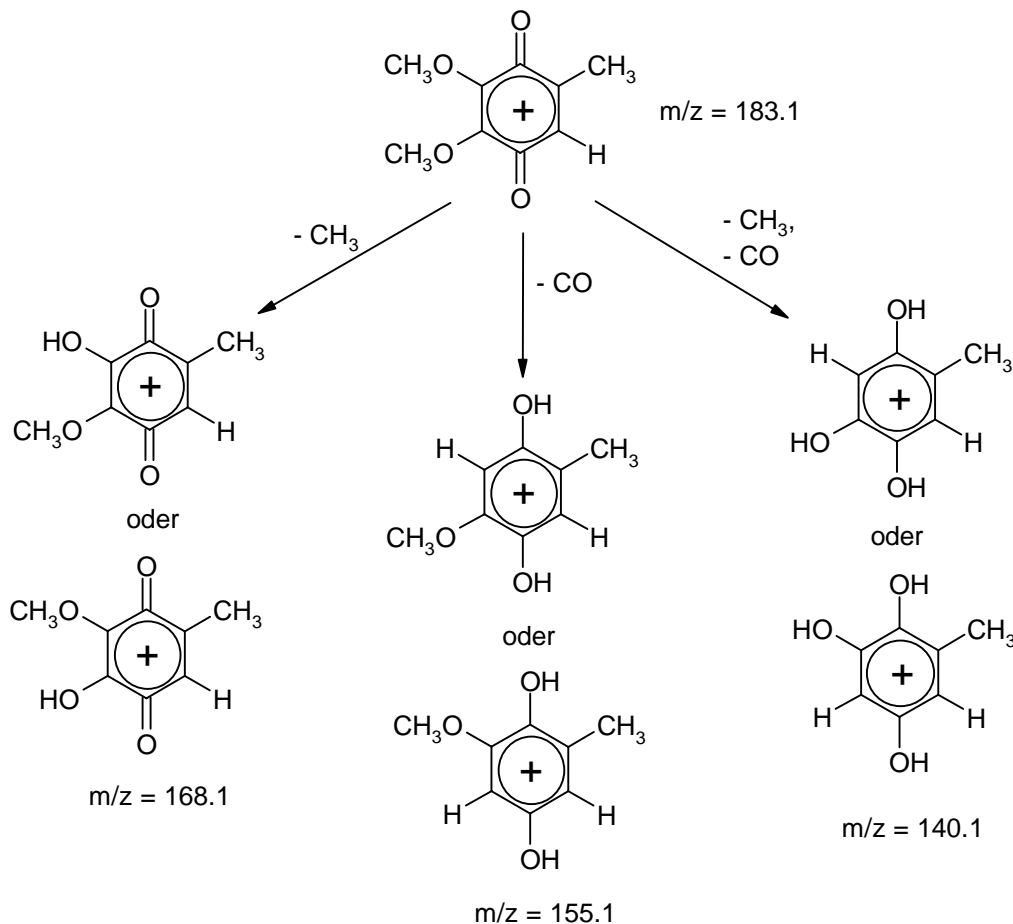
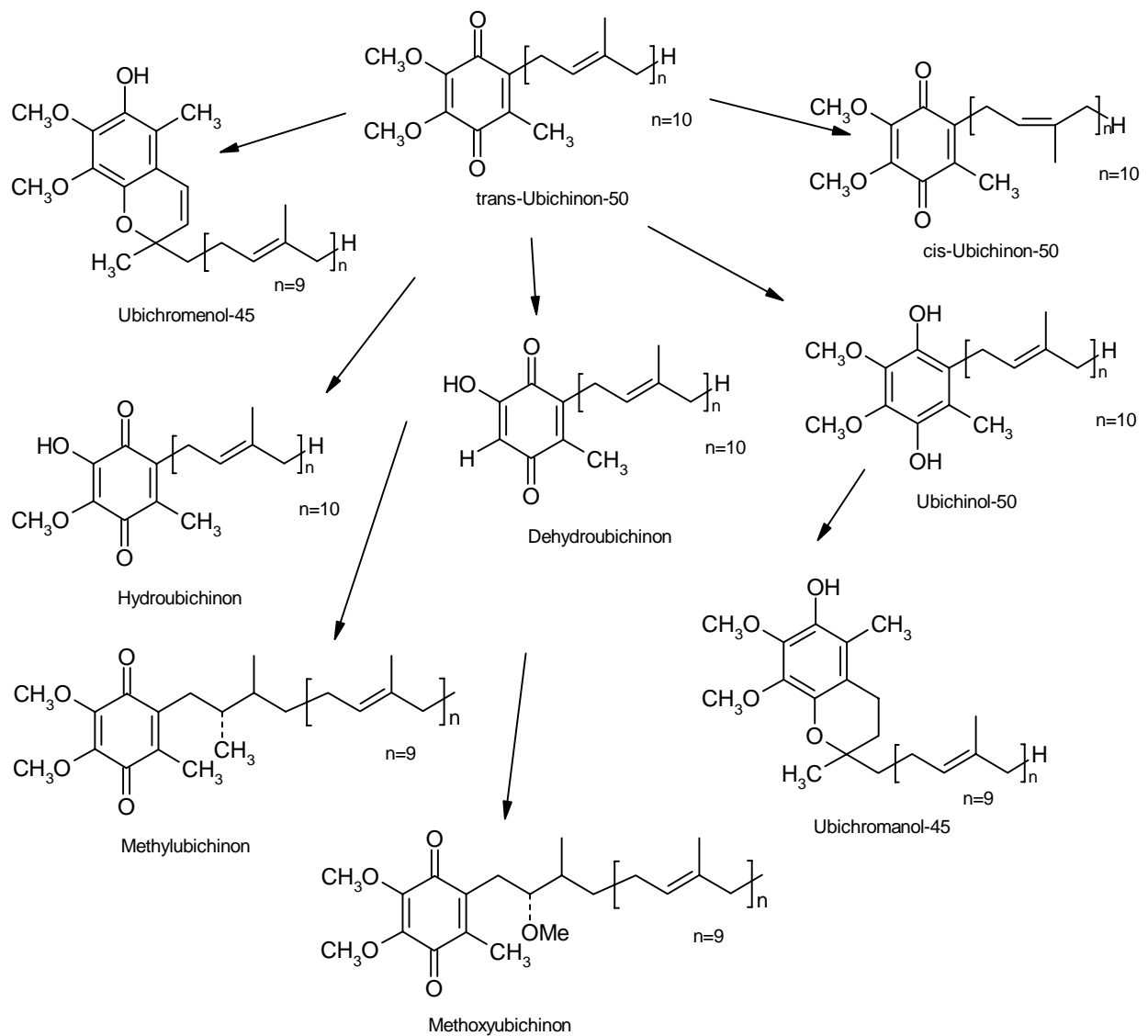


Abbildung 7-12.

Darstellung des Protonen-Adduktes von Ubichinon-0 und möglicher Photodegradationsprodukte in Form ihrer Protonen-Addukte.

Die Fraktionen 2 bis 4 von Ubichinon-10 zeigten im MS hauptsächlich das Protonen-Addukt $[M+H]^+ = 319.1$, Natrium-Addukt $[M+Na]^+ = 341.1$ und das Acetat-Addukt $[M+Ac]^+$. Die Massenspur 301.1 erhält man durch Abspaltung eines Wassermoleküls. Die Verbindungen, welche die Signale im Chromatogramm erzeugen, haben hauptsächlich das Molekulargewicht der Ausgangssubstanz. Demzufolge kann es sich um Isomere und Cyclisierungsprodukte handeln.

Das MS zeigte für die Fraktionen 2 bis 6 der bestrahlten und fraktionierten Ubichinon-50-Lösung die Masse 863.7 und die Massenspur 880.7. $m/z = 863.7$ steht für das Protonen-Addukt $[M+H]^+$ und die Masse 880.7 für das Ammonium-Addukt $[M+NH_4]^+$. Die Verbindung, die das Signal 1 in der Abbildung 7-10 darstellt, hat ein Molekulargewicht von 862.7. Mit den Informationen der UV-Spektroskopie und den aus der Literatur gewonnenen Daten, lässt sich feststellen, dass es sich um das Cyclisierungsprodukt Ubichromenol-45 handelt. Für die Fraktionen 3 bis 5 wurden im MS ebenfalls das Protonen- und das Ammonium-Addukt detektiert. Die Fraktion 4 und 5 enthielt die Ausgangsverbindung Ubichinon-50. Die Fraktion 3 enthielt die Verbindung, die das Signal 2 in der Abbildung 7-10 erzeugte. Die UV-Spektren der Signale 2 und 3 waren identisch. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Verbindung um ein Isomer handeln muss. Da Ubichinon-50 das energetisch günstigere trans-Isomer ist, muss es sich bei Signal 2, um das durch Lichtanregung entstandene cis-Isomer handeln. Für die Fraktion 7 zeigte das MS das Protonen $[M+H]^+$, das Ammonium $[M+NH_4]^+$, das Natrium $[M+Na]^+$ und das Acetat $[M+Ac]^+$ -Addukt für Ubichinol-50. Ubichinol-50 hat eine molekulare Masse von 865.4. Aus Ubichinol-50 kann sich durch Cyclisierung das Ubichromanol-45 bilden (s. 3.2.3). Diese Substanz verfügt über die gleiche molekulare Masse wie Ubichinol-50. In der Fraktion 8 wurden die m/z -Verhältnisse 894.6 und 917.6 detektiert. Die Massenspur von 917.6 ist das Natrium-Addukt von 894.6. Die Massenzahl 894.6 kann z. B. durch Addition einer Methoxy-Gruppe an die Doppelbindungen der isoprenoiden Seitenkette entstehen. In der Fraktion 9 wurde neben den Massenspuren aus Fraktion 8 noch $m/z = 912.7$ und 896.9 detektiert. Die Masse 912.7 stellt das Ammonium-Addukt von 894.6 dar. Bei der Massenzahl 896.9 kann es sich um die Anlagerung einer Methoxy-Gruppe an das Ubichinol-50 handeln. In der Fraktion 10 wurden die Massen 847.8, 869.4, 896.8 und 912.7 detektiert. Die Massen 896.8 und 912.7 sind aus der Fraktion 9 bekannt. Die Masse 847.8 wurde in der Fraktion 10 mit negativer Ionisierung ebenfalls bestimmt. Sie steht für die Abspaltung einer Methylgruppe aus dem Molekül. Die Massenzahl 869.4 stellt das Ammoniumaddukt von 847.8 dar. In Fraktion 11 wurde die Masse 877.7 neben 895.7, 913.8 und 917.7 detektiert. Eine Zuordnung der Massenzahl 877.7 ist schwierig. Es könnte die Anlagerung einer Methylgruppe an Ubichinon-50 sein. In der Abbildung 7-13 sind mögliche Photodegradationsprodukte dargestellt.

**Abbildung 7-13.**

Mögliche Strukturen der Photodegradationsprodukte nach Bestrahlung von Ubichinon-50.

Die Strukturen von Ubichromenol-45, Ubichinol-50, Hydroubichinon und Dehydroubichinon sind in der Literatur [143] erwähnt.

7.3.3 LC-Transform-Interface gekoppelt mit IR-Spektroskopie

Für die Kopplung von HPLC mit FTIR-Spektroskopie wurde das LC-Transform-Interface verwendet. Die Abbauprodukte, die bei der Bestrahlung von Ubichinon-50 entstanden, wurden auf die Germaniumscheibe aufgebracht und anschließend am IR-Mikroskop spektroskopisch untersucht. Für die Vernebelung des Eluenten am LC-Transform-Interface musste ein mit der HPLC-Methode abgestimmter Temperaturgradient entwickelt werden, um optimale Spots auf der Germanium-Scheibe zu erhalten. Die Rotationsgeschwindigkeit der Germaniumscheibe betrug 10° pro Minute. Die Germaniumscheibe wurde während des chromatographischen Laufes mit Trockeneis gekühlt. Die Geschwindigkeit des Vernebelungsgases (Druckluft) lag zwischen 2.2 und 2.5 l/min. Der Temperaturgradient wurde in bezug auf den n-Heptan-Gehalt der mobilen Phase optimiert. Die Flussrate der HPLC-Methode betrug 0.8 ml/min. Die Tabelle 7-6 stellt den Temperaturgradienten für das LC-Transform-Interface-System dar.

Tabelle 7-6.

Verwendeter Temperaturgradient am LC-Transform-Interface und Gradientenelution der HPLC-DAD-Methode.

Zeit in [min]	n-Heptan-Gehalt in [%]	Temperatur in [°C]
0.0	96	142
10.0	96	142
15.0	90	135
15.1	96	142
25.0	96	142

Die auf der Germanium-Scheibe gesammelten Spots wurden anschließend unter dem IR-Mikroskop spektroskopisch untersucht. Neben kristallinen Substanzflecken waren auch tropfenförmige, flüssige Substanzflecken auf der Germanium-Scheibe vorhanden. Die kristallinen Substanzflecken auf der Scheibe zeigen eine bessere Aufspaltung einzelner Banden im Spektrum als die tropfenförmigen Spots. Zu den Banden, die in den aufgenommenen Spektren identifizierbar sind, gehören die CH₂-Valenzschwingungen bei 2920 cm⁻¹, die Chinon-Schwingung bei 1650 cm⁻¹, die CH₂-Deformationsschwingungen bei 1445 cm⁻¹ und die Schwingungen der Methoxy-

Gruppe bei 1260 cm^{-1} . Die aufgenommenen IR-Spektren sind aufgrund des geringen Probenmaterials nicht sehr aussagekräftig. Das Vorhandensein von Ubichromenol-45 konnte bestätigt werden, da in diesem IR-Spektrum die Chinon-Schwingung fehlte und eine OH-Bande hinzukam. Die Charakterisierung weiterer Bestrahlungsprodukte war nicht möglich.

7.3.4 NMR-Spektroskopie

Von Ubichinon-50 und von der nicht näher charakterisierten orange-braunen öligen Flüssigkeit wurden ^1H -NMR-Spektren in CDCl_3 aufgenommen. Unbestrahltes Ubichinon-50 zeigt folgende Kopplungen:

- bei 1.3 ppm Dublett – Kopplungen der CH_3 -Gruppen
- bei 2.0 ppm Multipllett – Kopplungen von CH_2 -Gruppen in der isoprenoiden Seitenkette und der Methylgruppe am aromatischen Ring
- bei 3.2 ppm Dublett – Kopplungen der 1. CH_2 -Gruppe der isoprenoiden Seitenkette
- bei 4.0 ppm Dublett – Kopplungen der beiden Methoxy-Gruppen
- bei 4.9 ppm Multipllett – Kopplungen der 1. CH-Gruppe der isoprenoiden Seitenkette
- bei 5.1 ppm Multipllett – Kopplungen der 2. CH-Gruppe der isoprenoiden Seitenkette.

Die orange-braune, ölige Flüssigkeit zeigt ein anderes Kopplungsmuster. Wie in 7-14 abgebildet, ist kein Duplett mehr für die Kopplungen der Methoxy-Gruppen vorhanden. Weiterhin fehlen die Kopplungen der 1. CH_2 -Gruppe der Seitenkette, der 1. CH-Gruppe der Seitenkette und der Methyl-Gruppe am aromatischen Ring.

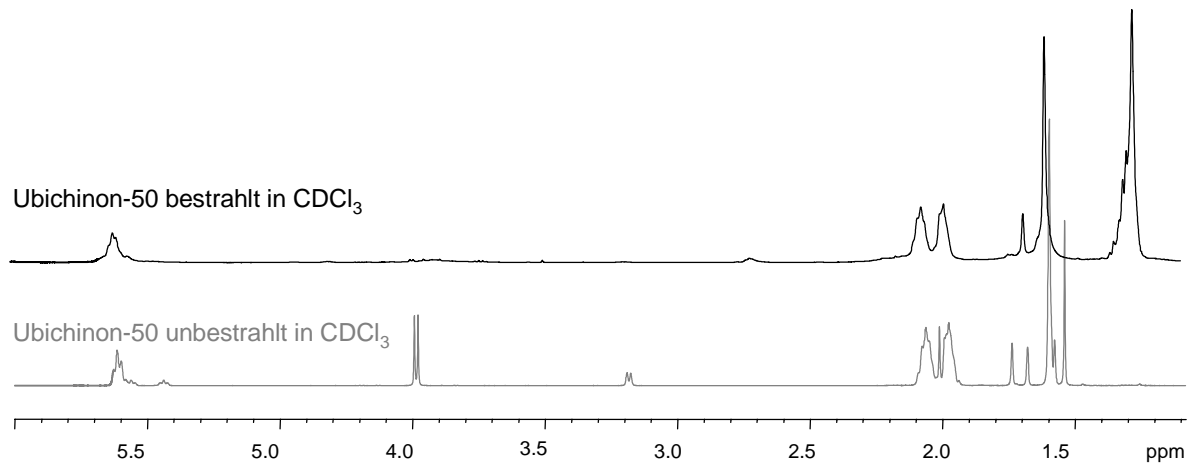


Abbildung 7-14.

¹H-NMR-Spektren von Ubichinon-50 bestrahlt und unbestrahlt.

Einige Aussagen der massenspektroskopischen Detektion können mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bekräftigt werden. Es existieren Photodegradationsprodukte, wo keine Methoxy-Gruppen mehr vorhanden sind. Ebenso ist wahrscheinlich, dass die Methyl-Gruppe vom aromatischen Ring abgespalten wird. Eine Aussage, um welche Substanz es sich bei der orange-braunen, öligen Flüssigkeit handelt, ist nicht möglich.

7.4 Experimente zur Stabilisierung

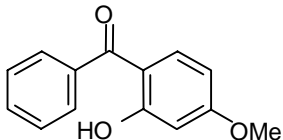
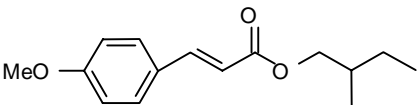
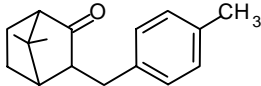
Die Lichtempfindlichkeit von Ubichinon-50 zog Stabilisierungsversuche nach sich, um den lichtbedingten Abbau zu minimieren. Ubichinon-50-Lösungen wurden hierfür mit mehreren UV-Filtern und Antioxidantien versetzt, bestrahlt und chromatographisch untersucht. Die Durchführung und die Resultate dieser Experimente werden in den nächsten Abschnitten zusammengefasst.

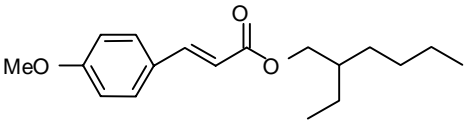
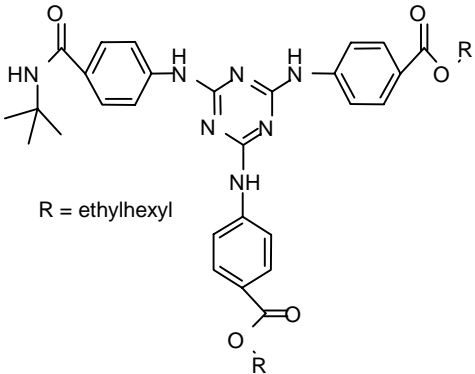
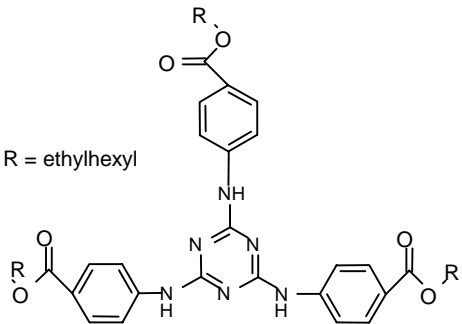
7.4.1 Experimente mit UV-Filtern

Die UV-Filter, die für die Stabilisierungsversuche eingesetzt werden, sollen 2 Bedingungen erfüllen; einerseits eine gute Löslichkeit in n-Hexan und andererseits lokale Absorptionsmaxima zwischen 270 und 290 nm. Es wurden 6 verschiedene UV-Filter ausgewählt. In der Tabelle 7-7 sind diese Lichtschutzfilter zusammengefasst.

Tabelle 7-7.

Darstellung der eingesetzten Lichtschutzfilter.

Handelsname	Name nach INCI	Lokale Absorptionsmaxima in [nm]	Strukturformel
Eusolex 4360	2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	204, 242, 284, 326	
Neo-Heliopan	p-Methoxy-zimtsäure-isoamylester	194, 210, 224, 290	
Eusolex 6300	3-(4'-Methyl)-benzyliden-bornan-2-on	194, 224, 230, 292	

Parsol MCX	p-Methoxy- zimtsäure-2- ethylhexyl- ester	210, 224, 290	
Lischu HEB	Diethylhexyl Butamido Triazone	194, 292, 304	
Uvinul T 150	Ethylhexyl Triazone	222, 294, 304	

Die Lichtschutzfilter wurden zusammen mit Ubichinon-50 eingewogen und in n-Hexan gelöst. Die Lösungen wurden in einer Quarzküvette im Suntest CPS+ bei 250 W/m² 20 Minuten bestrahlt. Alle 5 Minuten wurde ein Aliquot entnommen und mit HPLC-DAD analysiert. Die Lichtschutzfilter wurden in einer geringeren Konzentration als Ubichinon-50 eingesetzt. Folgende Zusammensetzungen wurden bestrahlt:

- 0.2026 mg/ml Ubichinon-50 + 0.009 mg/ml Eusolex 4360
- 0.1934 mg/ml Ubichinon-50 + 0.011 mg/ml Neo-Heliopan
- 0.2036 mg/ml Ubichinon-50 + 0.055 mg/ml Eusolex 6300
- 0.1970 mg/ml Ubichinon-50 + 0.025 mg/ml Parsol MCX
- 0.1872 mg/ml Ubichinon-50 + 0.055 mg/ml Lischu HEB
- 0.2032 mg/ml Ubichinon-50 + 0.088 mg/ml Uvinul T 150

Als Vergleich wurde eine 0.5876 mg/ml Ubichinon-50 haltige, unstabilisierte Lösung mitbestrahlt.

Die Ubichinon-50-Lösungen, die mit Eusolex 4360, Neo-Heliopan, Eusolex 6300 und Parsol MCX versetzt waren, zeigten keine stabilisierenden Effekte. Ubichinon-50 veränderte sich mit gleicher Geschwindigkeit wie die unstabilisierte Lösung. Die Ubichinon-50-Lösungen, denen Lischu HEB und Uvinul T 150 zugesetzt wurden, erzielten eine Verzögerung des Abbaus von Ubichinon-50. In 7-15 sind die Ergebnisse der Bestrahlung graphisch dargestellt.

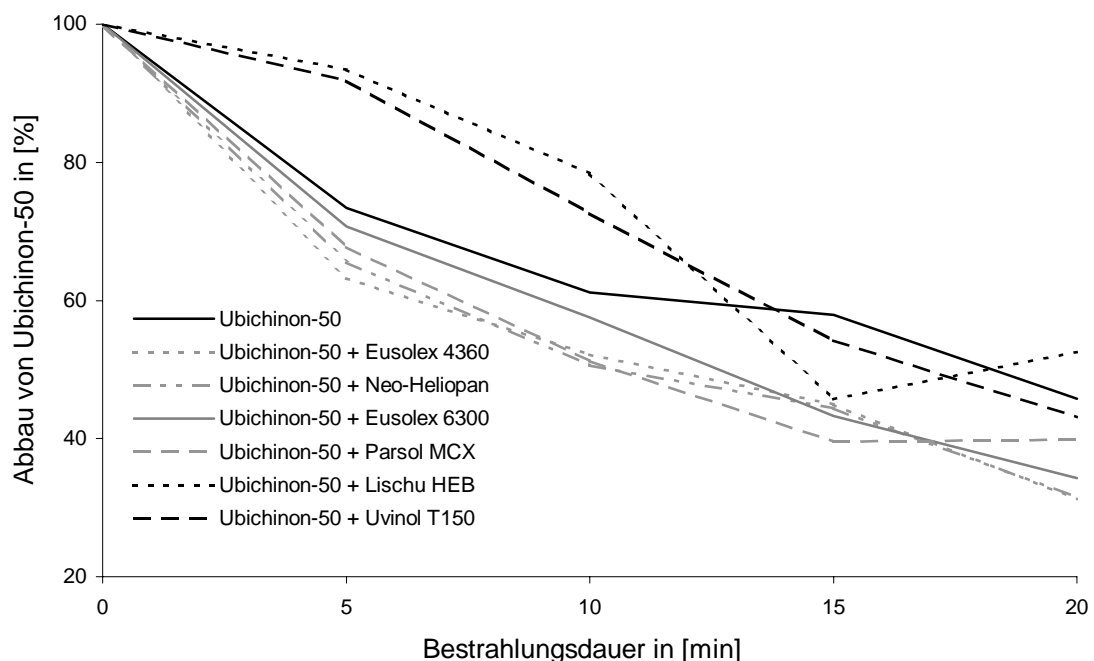


Abbildung 7-15.

Darstellung der Veränderung von Ubichinon-50 mit zugesetzten Lichtschutzfiltern während der Bestrahlung im Suntest CPS+ bei 250 W/m^2 .

Der stabilisierende Effekt von Lischu HEB und Uvinul T150 zeigte sich durch den erhöhten Ubichinon-50-Gehalt nach 5 und 10 Minuten. Nach dem Bestrahlungsintervall von 5 Minuten wurden noch über 90 % der Ausgangskonzentration von Ubichinon-50 detektiert. Nach 10 minütiger Bestrahlung wurden noch mehr als 70 % der Ausgangskonzentration von Ubichinon-50 nachgewiesen. Der stabilisierende Effekt der beiden Lichtschutzfilter lies nach 10 Minuten Bestrahlung nach. Die UV-Filter

wurden in geringeren Konzentrationen als Ubichinon-50 eingesetzt. Die Funktion der UV-Filter, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren, war schnell erschöpft und eine Stabilisierung war nicht mehr möglich.

7.4.2 Untersuchungen mit Antioxidantien

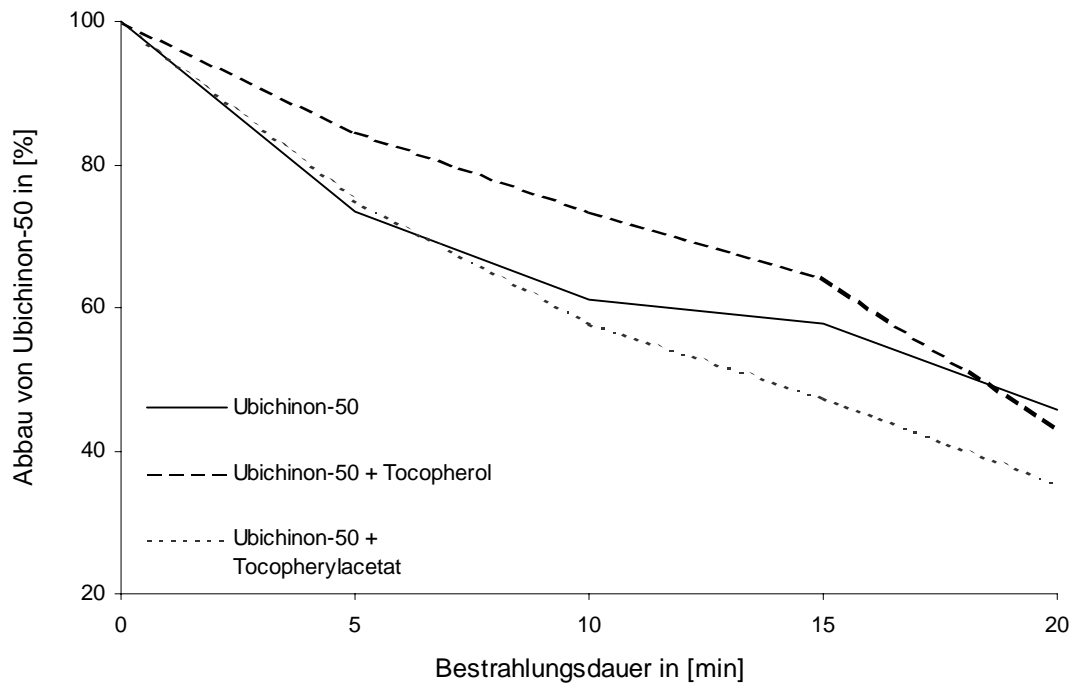
Für die Stabilisierungsversuche wurden als Antioxidantien Tocopherylacetat und α -Tocopherol ausgewählt. Diese Verbindungen lösen sich sehr gut in n-Hexan. α -Tocopherol hat ein lokales Absorptionsmaximum bei 290 nm, Tocopherylacetat bei 288 nm.

Die Antioxidantien wurden mit Ubichinon-50 eingewogen und in n-Hexan gelöst. Die Bestrahlung erfolgte wie unter 8.5.1 beschrieben. Die Antioxidantien wurden in einer geringeren Konzentration als Ubichinon-50 eingesetzt. Folgende Zusammensetzungen wurden bestrahlt:

- 0.2068 mg/ml Ubichinon-50 + 0.0776 mg/ml α -Tocopherol
- 0.1876 mg/ml Ubichinon-50 + 0.1236 mg/ml Tocopherylacetat.

Als Vergleich wurde eine 0.5876 mg/ml Ubichinon-50 haltige, unstabilisierte Lösung mitbestrahlt.

Die Ubichinon-50-Lösung, die mit Tocopherylacetat stabilisiert war, konnte den lichtbedingten Abbau nicht beeinflussen. Die Lösung mit α -Tocopherol zeigte eine leichte Tendenz der Stabilisierung. Im Diagramm 7-16 sind die Ergebnisse der Bestrahlung abgebildet.

**Abbildung 7-16.**

Darstellung der Veränderung von Ubichinon-50 mit zugesetzten Antioxidantien während der Bestrahlung im Suntest CPS+ bei 250 W/m^2 .

Die Auswertung der Chromatogramme, der bestrahlten Mischung aus α -Tocopherol und Ubichinon-50, zeigte ein anderes Phänomen. Durch die Zugabe von α -Tocopherol entstand kein Signal für Ubichromenol-45 im Chromatogramm. Das Cyclisierungsprodukt wurde in allen Chromatogrammen bereits nach 5 Minuten detektiert. Die Bildung der Bestrahlungsprodukte cis-Ubichinon-50 und Dehydroubichinon wurde nicht unterdrückt. Aufgrund dieser Beobachtung wurden weitere Experimente mit α -Tocopherol durchgeführt, die im nachfolgenden Kapitel beschrieben sind. In 7-17 ist das Ergebnis der chromatographischen Trennung einer bestrahlten Ubichinon-50-Lösung mit α -Tocopherol abgebildet.

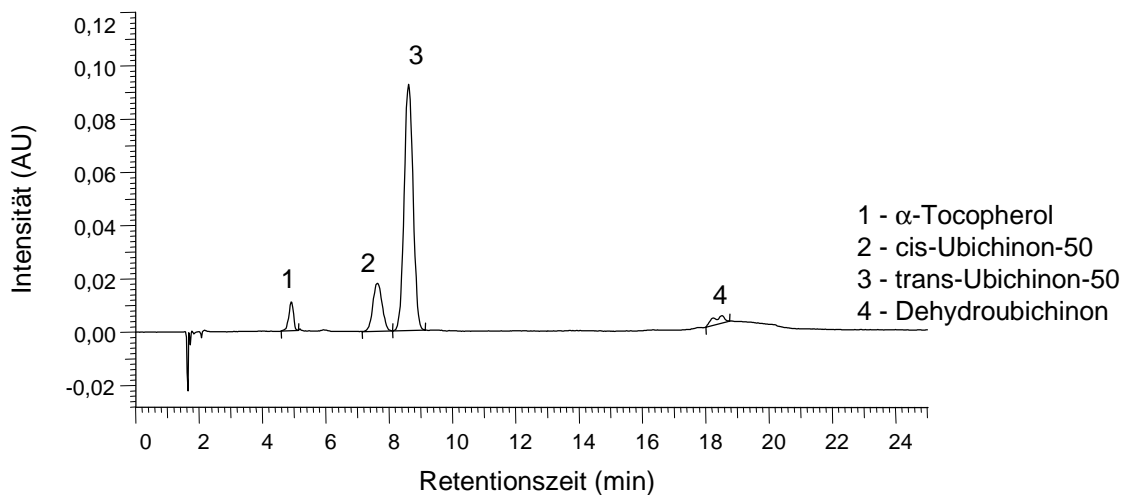


Abbildung 7-17.

Chromatographische Trennung einer bestrahlten Ubichinon-50-Lösung mit Zusatz von α -Tocopherol.

7.4.3 Experimente mit α -Tocopherol

Für weitere Untersuchungen wurde Ubichinon-50 mit den Lichtschutzfiltern Lischu HEB und Uvinul T150 sowie α -Tocopherol versetzt. Die Lösungen wurden im Suntest CPS+ 20 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt und alle 5 Minuten ein Aliquot entnommen und analysiert. Die Lösungen setzten sich zusammen aus:

- 0.205 mg/ml Ubichinon-50 + 0.044 mg/ml Uvinul T150 + 0.039 mg/ml α -Tocopherol
- 0.197 mg/ml Ubichinon-50 + 0.027 mg/ml Lischu HEB + 0.039 mg/ml α -Tocopherol.

Die Auswertung der Chromatogramme ergab einen stabilisierenden Effekt durch die Lichtschutzmittel wie in 7.4.1 beschrieben und eine verzögerte Umlagerung zu Ubichromenol-45 durch α -Tocopherol (siehe 8.5.2).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Ubichinon-50 mit verschiedenen α -Tocopherolkonzentrationen versetzt und bei 250 W/m^2 im Suntest CPS+ 20 Minuten bestrahlt. Alle 5 Minuten wurde ein Aliquot entnommen und mit HPLC-DAD das Abbauverhalten von Ubichinon-50 charakterisiert. Die Lösung 1 enthielt 0.904 mg/ml α -

Tocopherol und 1.032 mg/ml Ubichinon-50; Lösung 2 setzte sich aus 4.66 mg/ml α -Tocopherol und 0.992 mg/ml Ubichinon-50 zusammen und Lösung 3 bestand aus 8.896 mg/ml α -Tocopherol und 1.532 mg/ml. Die Tabelle 7-8 zeigt die quantitativ bestimmten Ubichinon-50-Gehalte. Die ermittelten Signalfächen wurden auf den t_0 -Wert bezogen.

Tabelle 7-9.

Darstellung der Ubichinon-50 Gehalte in [%] von stabilisiertem und unstabilisiertem Ubichinon-50.

Zeit in [min]	Ubichinon /Tocopherol = 1:0	Ubichinon /Tocopherol = 1:0.3	Ubichinon /Tocopherol = 1:0.9	Ubichinon /Tocopherol = 1:4.7	Ubichinon /Tocopherol = 1:5.8
0	100	100	100	100	100
5	73	85	79	77	100
10	61	73	60	64	81
15	58	64	44	62	72
20	46	43	52	59	67

Die Auswertung dieser Versuche zeigte kein Signal für Ubichromenol-45 in den Chromatogrammen. Eine Steigerung von 20 % des Gehaltes an Ubichinon-50 wurde im Vergleich zur unstabilisierten Lösung mit Lösung 3 erreicht. α -Tocopherol verfügt über einen stabilisierenden Effekt bei lichtbedingten Abbauprozessen von Ubichinon-50 und verhindert die Cyclisierung zu Ubichromenol-45.

7.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Veränderung von Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 durch elektromagnetische Strahlung laufen nach ähnlichen Mechanismen ab. Ubichinon-0 nimmt aufgrund seiner Struktur eine gewisse Sonderstellung ein. Cyclisierungsreaktionen und cis-trans-Isomerisierungen können hier nicht beobachtet werden. Bei den Verbindungen Ubichinon-10 und Ubichinon-50 treten diese Reaktionen ein. Bei allen 3 Substanzen kann die O-Demethylierung beobachtet werden.

Die verwendeten spektroskopischen Methoden führten zur Identifizierung und Charakterisierung einiger Photodegradationsprodukte. Die in der Literatur [139-144] bekannten Verbindungen wurden nachgewiesen sowie neue mögliche Strukturen aufgezeigt.

Die Bestrahlungsexperimente in Zellkultur zeigten, dass der Ubichinon-50-Gehalt durch Lichteinfluss in den Mitochondrien drastisch abnimmt. Die Zellen müssen sich regenerieren, um den Pool an Ubichinon-50 in den Mitochondrien wieder zu erneuern. Ein gleichbleibender Gehalt an Ubichinon-50 ist für die ablaufenden Prozesse in der Atmungskette bedeutsam.

An die Untersuchungen zu den lichtbedingten Abbauprozessen schlossen sich Experimente mit Verbindungen an, die eine Stabilisierung der Ubichinone, vor allem von Ubichinon-50, ermöglichen. Sehr geeignet für die Stabilisierung ist α -Tocopherol, welches auch Ubichinon-50 in humanen Zellen stabilisiert. α -Tocopherol besitzt die Fähigkeit, den Cyclisierungsprozess von Ubichinon-50 zu Ubichromenol-45 zu hemmen. Setzt man α -Tocopherol im Überschuss zu Ubichinon-50 ein, kann ein stabilisierender Effekt in Lösung nachgewiesen werden. Neben Tocopherol eignen sich auch einige UV-Filter zum Schutz von Ubichinon-50 vor elektromagnetischer Strahlung in Lösung.

8 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die dargelegten Untersuchungen und Experimente zeigen, dass lipophile Substanzen mit verschiedenen Detektionstechniken in kosmetischen Formulierungen und humanen Zellen quantifizierbar sind.

Für die Entwicklung flüssigchromatographischer Methoden zur Bestimmung neutraler Lipide existieren eine Vielzahl von Publikationen [67,89,93,117,118]. Als Detektionstechnik kommt vor allem der ELSD zum Einsatz. Die entwickelte HPLC-ELSD-Methode ermöglicht die Quantifizierung von Triglyceriden bis Tribehenin mit einem nichtwässrigen binären Gradienten aus Acetonitril und Aceton. Des Weiteren sind mit den gleichen chromatographischen Bedingungen Mono- und Diglyceride, Ester, langkettige Alkohole, Cholesterol und Cholesterylester nachweisbar. Die Differenzierung der Triglyceride garantiert die Charakterisierung nativer Fette, Öle und Wachse in kosmetischen Rohstoffen und Emulsionen. Die Proben können direkt nach dem Lösen, Mischen und Filtrieren analysiert werden. In Abhängigkeit vom zu untersuchenden Emulsionstyp kann eine Flüssig-Flüssig-Extraktion vorteilhaft sein, um die zu analysierenden Bestandteile von störenden Begleitstoffen zu isolieren. Die Einflüsse der Matrix werden so reduziert. Die relative Standardabweichung dieser Methode liegt unter 7 %. Die Nachweisgrenze für Triacylglycerine beträgt etwa 0.5 µg und für native Fette und Öle ca. 1.8 µg absolut. Diese Methode wurde im Analysenlabor etabliert und in der Routineanalytik eingesetzt.

Die Kopplungstechnik der LC/MS wurde im Verlaufe der vorliegenden Arbeit miteinbezogen. Die Vorteile gegenüber der HPLC-ELSD-Methode sind die zusätzlichen Strukturinformationen, die durch die Quasi-Molekular-Ionen erhalten werden. Die entwickelte LC/MS-Methode erlaubt die Bestimmung von Triglyceriden bis Tripalmitin. Alle weiteren unpolareren Verbindungen eluieren unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen nicht von der stationären Phase. Die chromatographischen Bedingungen der HPLC-ELSD sind nicht auf die LC/MS-Methode übertragbar. Für die Elektrospray-Ionisierung sind nicht alle Lösungsmittel geeignet. Die chromatographische Trennung der Triglyceride erfolgt isokratisch oder mit einem binären Gradienten aus Methanol und *tert*-Butyl-methyl-ether. Ein Vergleich zwischen beiden

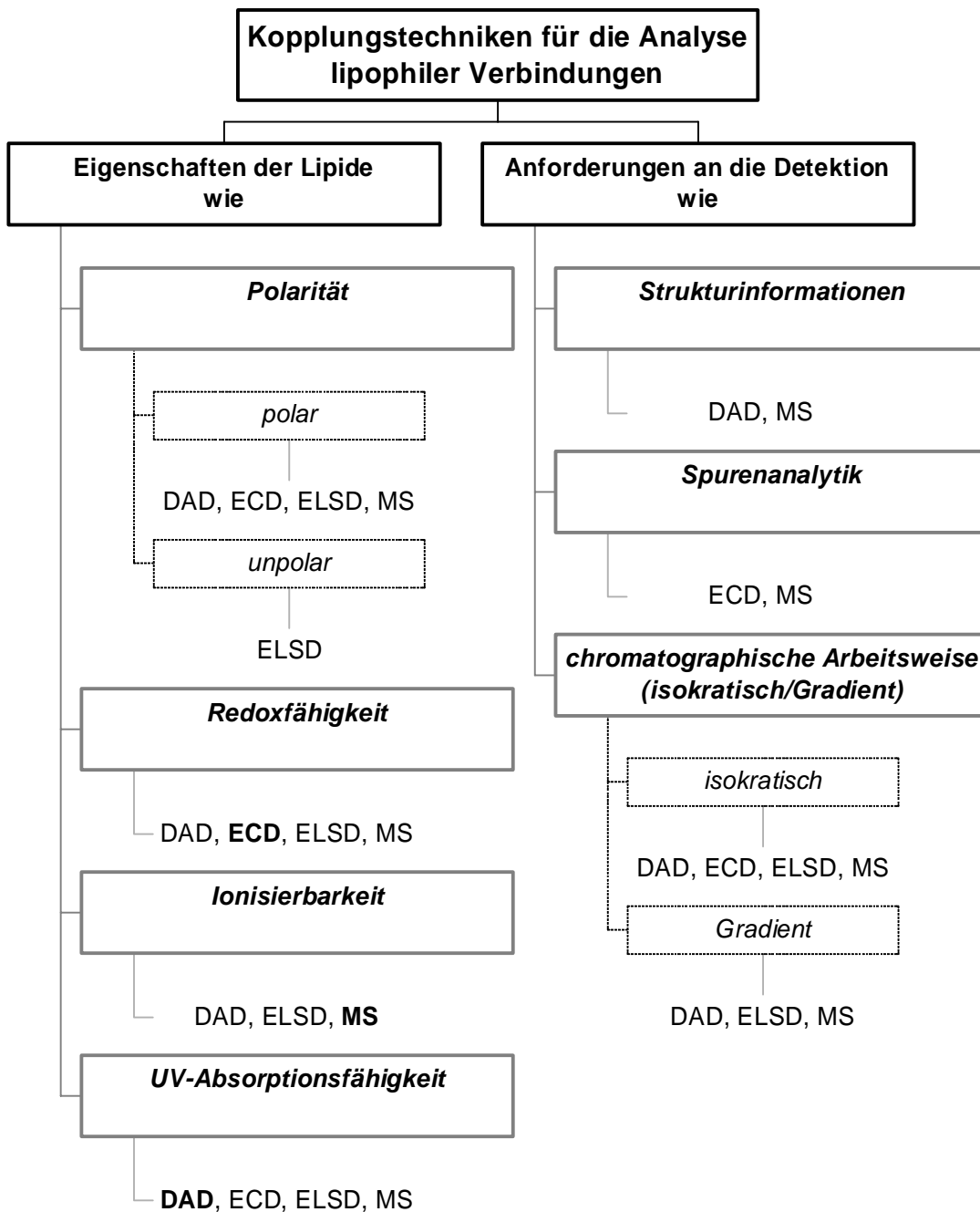
Methoden ist im Kapitel 5.1.3 dargestellt. Bei den Triglyceriden handelt es sich um schwer ionisierbare Verbindungen. Durch die Zugabe einer Ionisierungshilfe, wie Ammoniumacetat oder Natriumacetat entstehen als Quasi-Molekular-Ionen Ammonium- und Natrium-Addukte. Die LC/MS-Methode bietet eine Alternative zur HPLC-ELSD und erreicht Nachweisgrenzen von 0.02 µg im Scan Mode und weniger als 1 ng im SIM Mode. Die relative Standardabweichung liegt unter 5 %. Die LC/MS-Methode bietet die empfindlichere Detektion der Triglyceriden und ist in der Routineanalytik ebenso einsetzbar.

Beide flüssigchromatographischen Methoden sind als Ersatz für die gaschromatographische und IR-spektroskopische Bestimmung von Acylglycerinen geeignet. Die Quantifizierung dieser Verbindungen ist einfacher und kann auf direktem Wege über eine externe Standardkalibrierung erfolgen. Beide Methoden wurden im Analysenlabor etabliert.

Die spurenanalytische Bestimmung von Biochinonen in humanen Zellen ist ein weiterer wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Für die Identifizierung von Biochinonen, im besonderen von Ubichinon-50, wird die elektrochemische Detektion verwendet. Die Literatur [106,110,111,112] beschreibt die Quantifizierung von Biochinonen vor allem im Plasma und Gewebehomogenaten. Ein Nachweis des Ubichinon-50-Gehaltes in Zellen der Epidermis ist in der Literatur nicht dargelegt. Die Detektion im pg- und ng-Bereich ist aufgrund der Redoxfähigkeit der chinoiden Grundstruktur möglich. Die ablaufenden Oxidations- und Reduktionsprozesse in den elektrochemischen Zellen ermöglichen eine selektive und empfindliche Bestimmung von Ubichinon-50. Die Empfindlichkeit dieser Detektionstechnik führte bei hoher Matrixbelastung zu einer eingeschränkten Funktionsleistung. Für die Optimierung der Probengewinnung und -vorbereitung waren verschiedene Studien notwendig, die zu den dargelegten Ergebnissen führten. So ist neben Ubichinon-50 auch die oxidationsempfindliche reduzierte Spezies in Humanzellen nachweisbar. Als Alternative wurde im Verlaufe der Dissertation die LC/MS auf dieses Problem angewendet und eine Lösung entwickelt. Das Arbeiten im SIM Mode ermöglicht einen empfindlicheren Nachweis von Ubichinon-50 als die Kopplung der HPLC mit dem coulometrischen Detektor.

Neben den Untersuchungen von Ubichinon-50 in humanen Zellen, spielte der Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf Biochinone ebenso eine Rolle. In den Veröffentlichungen [139-144] wurden Photodegradationsexperimente von Ubichinon-50 dargestellt und die Ergebnisse aufgezeigt. Für die Durchführung dieser Studien konnten verschiedene analytische Methoden eingesetzt werden. Für die Trennung und Identifizierung bestrahlter Ubichinon-Lösungen existiert eine NP-HPLC-DAD-Methode. Biochinone sind aufgrund ihrer UV-Absorption für die Photodiodenarraydetektion geeignet. Die entstehenden Abbauprodukte werden mit IR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Methoden untersucht. Die Veränderungen von Ubichinon-0, Ubichinon-10 und Ubichinon-50 durch elektromagnetische Strahlung laufen nach ähnlichen Mechanismen ab. Für Ubichinon-50 wurden die literaturbeschriebenen Abbauprodukte (s. 3.5.2) bestätigt und weitere mögliche Strukturen aufgezeigt. Eine Stabilisierung von Ubichinon-50 erfolgt mit UV-Filtern und α -Tocopherol in Lösung. Die Cyclisierung zu Ubichromenol-45 wird durch die Zugabe von α -Tocopherol verhindert. Es entstehen keine zusätzlichen Photodegradationsprodukte und die beschriebenen Produkte, wie Ubichinol-50 und Dehydroubichinon, nehmen an Intensität nicht zu.

Die Abbildung 8-1 verdeutlicht, welche Kopplungstechniken für die Analyse lipophiler Substanzen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen. Das Entscheidungsschema soll helfen, eine selektive und empfindliche Detektionstechnik für die Analyse von Lipiden zu finden.

**Abbildung 8-1.**

Entscheidungsschema für die Verwendung von Kopplungstechniken bei der Analyse lipophiler Verbindungen.

Die Suche nach einer geeigneten Detektionstechnik für die Identifizierung und Charakterisierung lipophiler Substanzen in komplexen Matrices gestaltet sich oft schwierig. Die verwendeten Methoden müssen direkt, selektiv und empfindlich für den zu bestimmenden Analyten sein. Der Aufwand der Probenvorbereitung sollte minimal

sein. Für den Einsatz und die Entwicklung von flüssigchromatographischen Methoden im Analysenlabor sind folgende Überlegungen wichtig: Über welche molekülspezifischen Eigenschaften verfügt die zu bestimmende Verbindung? Was ist das Ziel der Bestimmung? Welche Detektionstechniken stehen zur Verfügung? Welcher Aufwand ist für die Bestimmung der Verbindung gerechtfertigt? Ist eine Methodenentwicklung erforderlich? Die Ergebnisse der Analysen sollen richtig, präzise und schnell verfügbar sein. Des Weiteren spielen die Kosten der Analysen eine wichtige Rolle. Finanziell- und zeitaufwendige Verfahren werden seltener eingesetzt. Zur Unterstützung der Forschung bzw. für die Forschung selbst und für analytische Hilfestellungen bei arbeits- und kostenintensiven Studien werden aufwendige analytische Mess- und Analysemethoden eingesetzt, entwickelt und bestehende optimiert.

In der Routineanalytik werden die Kopplung der Flüssigchromatographie mit dem DAD, dem ELSD und dem API-ES-MS verwendet. In den Anschaffungs- und Betriebskosten ist der DAD und der ELSD günstiger als das MS. Die Komplexität der zu untersuchenden Proben verlangen jedoch nach Detektionstechniken, die eine empfindliche Detektion ermöglichen und gleichzeitig noch Strukturinformationen liefern. Die Kopplung von Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie vereinfacht die Bestimmung vieler Verbindungen. Der Einzug dieser Detektionstechnik bildet eine Alternative zu den Kopplungen der Flüssigchromatographie mit Verdampfungs-Lichtstreu-Detektion, elektrochemischer Detektion und Photodiodenarraydetektion.

9 Anhang

9.1 Methoden

9.1.1 HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung von Acylglycerinen

Geräte: Interface D-6000, Pumpe L-6200, Autosampler AS-4000
(Fa. Merck, Darmstadt)

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor Sedex Model 55
(Fa. S.E.D.E.R.E., Frankreich)

Säule: LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm) und
LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm)
(Fa. Merck, Darmstadt)

Eluent: A – 100 % Acetonitril
B – 100 % Aceton

Modus: Gradient

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0	50
8	40
20	20
35	10
40	10
41	50
47	50

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 10 μl oder 20 μl

Detektor: Druck = 1.5 bar
Temperatur = 35°C

Empfindlichkeitsbereich 10

Probenvorbereitung:

Die Stammlösungen der Acylglycerine werden in Abhängigkeit von der Polarität in Aceton oder im Hexan/Ethanol-Gemisch angesetzt, d. h. die Triglyceride bis Tristearat lösen sich in Aceton. Alle unpolareren Triglyceride werden mit Hexan/Ethanol gelöst. Für die Fette, Öle und Wachse gelten folgende Löslichkeiten: Alle nativen pflanzlichen Öle, wie Mandelöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Nachtkerzenöl, Traubenkernöl, Maiskeimöl etc. lösen sich in Aceton. Jojobaöl löst sich als flüssiges Wachs ebenso in Aceton. Ausnahmen bilden Shea Butter und Shorea Butter, die sich nur in Dichlormethan vollständig lösen. Die technisch veränderten Öle, wie hydriertes Rizinusöl und hydriertes Rapsöl, lösen sich vollständig in Dichlormethan. Hydriertes Palmkernöl löst sich in *tert*-Butyl-methyl-ether. Die Bienenwachse lösen sich ausschließlich in Chloroform.

Für die quantitative Bestimmung der Fette, Öle und Wachse in Produkten existieren in Abhängigkeit von der kosmetischen Formulierung verschiedene Probenvorbereitungen.

Das kosmetische Mittel Duschöl ist ein nahezu wasserfreies, öliges System mit mehr als 54 % Ölanteil. Diese Produkte lösen sich sehr gut in Aceton. Nach Einwaage und Lösen des zu untersuchenden Produktes werden die Proben 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wird die Lösung mit einem 0.45 µm Spritzenfilter der Fa. Satorius filtriert, verdünnt und analysiert.

Die O/W-Emulsionen werden nach der Einwaage in Wasser oder Wasser/MeOH suspendiert, gemischt und 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Mit n-Hexan wird die Suspension extrahiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, die organische Phase abpipettiert und ins Vial überführt. Mit W/O-Emulsionen kann man nach dem gleichen Schema verfahren. Hier empfiehlt sich, die Extraktion mit Chloroform durchzuführen, da die W/O-Emulsionen mehr lipophile Bestandteile enthalten. Es bildet sich ebenfalls ein 2-Phasen-System aus. Die wässrige Phase befindet sich über der Chloroformphase.

9.1.2 HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung von Rizinusöl

Geräte: Interface D-6000, Pumpe L-6200, Autosampler AS-4000
(Fa. Merck, Darmstadt)

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor Sedex Model 55
(Fa. S.E.D.E.R.E., Frankreich)

Säule: LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (250*4 mm) und
(Fa. Merck, Darmstadt)

Eluent: A – 100 % Acetonitril
B – 100 % Aceton

Modus: Gradient

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0.0	70
5.0	70
20.0	10
25.0	10
25.1	70
33.0	70

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor: Druck = 1.5 bar
Temperatur = 35°C

Empfindlichkeitsbereich 10

9.1.3 LC/MS-Methode zur Bestimmung von Acylglycerinen

LC-System: HP-Serie 1100 mit Degaser, Pumpe, Autosampler und Säulenofen (Fa. Agilent Technology, USA)

Detektor: HP-Serie 1100 MSD, Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung (Fa. Agilent Technology, USA)

Für die Charakterisierung der Fette, Öle und Standards werden die folgenden chromatographischen Bedingungen verwendet:

Säule: GROM Sil 120 Octyl 5-CP, 5 μm (125*2 mm) (Fa. Grom, Herrenberg)

Eluent: A = 100 % MeOH + 30 μmol NH_4Ac oder NaAc
B = 100 % *tert*-Butyl-methyl-ether

Modus: isokratisch (92% A : 8 % B)

Flussrate: 300 $\mu\text{l}/\text{min}$

oder

Säule: LiChrosper 100 RP-8 endcapped, 5 μm (125*2 mm) (Fa. Merck, Darmstadt)

Eluent: A = 100 % MeOH + 30 μmol NH_4Ac oder NaAc
B = 100 % *tert*-Butyl-methyl-ether

Modus: isokratisch (95% A : 5 % B)

Flussrate: 300 $\mu\text{l}/\text{min}$

Säulentemperatur: 25°C

Injektionsvolumen: 5 μl

MSD-Einstellungen:

Mode: Scan (Massenbereich von 400 bis 1200)

Polarität: positiver Ionenmodus

Kapillarspannung: 3500 V

Vernebelungsdruck: 30 psi

Trockengas: 8.0 l/min; 300°C

Fragmentorspannung: 70 V

Standardherstellung:

Das Lösen der Standards ist abhängig von der Polarität der Verbindungen. Die Löslichkeit der Rohstoffe und Standards ist in 10.1.1 beschrieben. Für die Verdünnungen wird die mobile Phase verwendet.

Für den Nachweis der Fette und Öle in den Produkten und die Bestimmung von Standards werden einige chromatographische Änderungen vorgenommen:

Säule: LiChrosper 100 RP-8 endcapped, 5 µm (125*2 mm) (Fa. Merck, Darmstadt)

Eluent: A = 100 % MeOH + 30 µmol NH₄Ac oder NaAc
B = 100 % *tert*-Butyl-methyl-ether

Modus: Gradient

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0.0	95
2.0	95
7.0	56
12.0	56
12.1	95
20.0	95

Flussrate: 200 µl/min

MSD-Einstellungen:

Mode: SIM

Polarität: positiver Ionenmodus

9.1.4 HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung von Cholesterol, Cholesteryl- estern, Alkoholen und Estern

Geräte: Interface D-6000, Pumpe L-6200, Autosampler AS-4000
(Fa. Merck, Darmstadt)

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor Sedex Model 55
(Fa. S.E.D.E.R.E., Frankreich)

Säule: LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (250*4 mm) und
LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm)
(Fa. Merck, Darmstadt)

Eluent: A – 100 % Acetonitril
B – 100 % Aceton

Modus: Gradient

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0	50
8	40
20	20
35	10
40	10
41	50
47	50

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor: Druck = 1.5 bar
Temperatur = 35°C

Empfindlichkeitsbereich 10

9.1.5 HPLC-ELSD-Methode zur Bestimmung eines neutralen Lipidgemisches

Geräte: Interface D-6000, Pumpe L-6200, Autosampler AS-4000

(Fa. Merck, Darmstadt)

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor Sedex Model 55

(Fa. S.E.D.E.R.E., Frankreich)

Säulen: LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (250*4 mm) und

LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm (250*4 mm)

(Fa. Merck, Darmstadt);

Reposil-Pur 120 ODS 3, 5 μm (150*4 mm)

(Dr. A. Maisch, Ammerbruch);

5 μm Hypersil BDS C18 (250*4 mm)

(Life Sciences International, Barcelona)

Eluent: A – 100 % Aceton

B – 100 % Acetonitril

Modus: Gradient (für jede stationäre Phase wurde der Gradient der mobilen Phase angepasst)

Gradient für LiChrospher 100 RP-18, 5 μm

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0	30
6	30
12	90
18	90
20	95
24	95
25	30
30	30

Gradient für LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 μm

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0	20
5	20

15	95
22	95
23	20
30	20

Gradient für Reprosil-Pur 120 ODS 3, 5 µm und
5 µm Hypersil BDS C18

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0	20
6	30
12	90
18	90
20	95
24	95
25	20
30	20

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor: Druck = 1.5 bar

Temperatur = 45°C

Empfindlichkeitsbereich 10

Standardherstellung:

Die Standards werden in einen 20 ml Messkolben eingewogen und mit Aceton aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt ca. 1 mg/ml pro Substanz.

9.1.6 HPLC-ECD-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50

Geräte:	Interface D-6000, Pumpe L-6000, Autosampler AS-2000 (Fa. Merck, Darmstadt) Coulchem [®] II (Fa. ESA, USA) Guard Cell – Model 5020 (Fa. ESA, USA) Conditioning Cell – Model 5021 (Fa. ESA, USA) Analytical Cell – Modell 5011 (Fa. ESA, USA)
Säulen:	PRONTOSIL 120-3-C18-SH (150*4 mm) (Fa. Bischoff Analysentechnik, Leonberg)
Eluent:	MeOH/Ethanol/2-Propanol (450:88.5:50, v/v/v)
Modus:	isokratisch
Leitsalz:	0.639 g (w/v) Lithiumperchlorat (Fa. Sigma-Aldrich, Seelze)
Flussrate:	0.6 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektor:	Schutzzelle: U = +/- 600 mV Konditionierungszelle: U = +/- 600 mV Messzelle: Spannung 1: U = -250 mV Spannung 2: U = + 600 mV Die Stromstärkebereiche in der Messzelle sind variabel wählbar. Messzelle: Stromstärke 1: I = 200 nA Stromstärke 2: I = 100 nA

Standardherstellung:

Die Stammlösung von Ubichinon-50 wird mit n-Hexan hergestellt (ca. 1.5 mg/ml). Aus der Stammlösung werden durch unabhängige Verdünnungsschritte folgende Verdünnungen hergestellt: 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:50000, 1:100000, 1:200000, 1:500000 und 1:1000000. Die Stammlösung ist vor Licht geschützt und kühl aufzubewahren.

Die Probenvorbereitung richtet sich nach den zu untersuchenden humanen Zellen und wird dementsprechend durchgeführt.

9.1.7 RP-HPLC-DAD-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50

Geräte: Interface D-6000, Pumpe L-6000, Autosampler AS-2000,
DAD D-4500 (Fa. Merck, Darmstadt)

Säulen: LiChrospher 100 RP-8, 5 µm (125*4 mm) (Fa. Merck,
Darmstadt)

Eluent: A – 100 % MeOH

Modus: isokratisch

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor: 274 nm, 268 nm

9.1.8 NP-HPLC-DAD-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50

Geräte: Interface D-6000, Pumpe L-6000, Autosampler AS-2000,
DAD D-4500 (Fa. Merck, Darmstadt)

Säule: GROM-SIL NP-Si 2, 5 µm (150*4 mm) (Fa. Grom, Herrenberg)

Eluent: A – 100 % n-Heptan
B – 100 % Ethylacetat

Modus: Gradient

Zeit in Minuten	% Anteil von A
0.0	96
10.0	96
15.0	90
15.1	96
25.0	96

Flussrate: 0.8 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor: 274 nm, 268 nm

Standardherstellung:

Die Stammlösung von Ubichinon-50 wird in n-Hexan angesetzt (ca. 1.2 mg/ml). Die Probenvorbereitung richtet sich nach den zu untersuchenden Proben. Die Stammlösung ist vor Licht geschützt und kühl aufzubewahren.

9.1.9 LC/MS-Methode zur Bestimmung von Ubichinon-50

LC-System: HP-Serie 1100 mit Degaser, Pumpe, Autosampler und Säulenofen (Fa. Agilent Technology, USA)

Detektor: HP-Serie 1100 MSD, Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung (Fa. Agilent Technology, USA)

Säule: LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm (125*2 mm) (Fa. Merck, Darmstadt)

Eluent: MeOH + NaAc

Modus: isokratisch

Temperatur: 25°C

Fluß: 0.2 ml/min

Injektionsvolumen: 5 µl

MSD-Einstellungen:

Mode: SIM

SIM [m/z]: 885.7 für [Ubichinon-50+Na]⁺
887.7 für [Ubichinol-50+Na]⁺

Polarität: positiver Ionisierungsmodus

Kapillarspannung: 4000 V

Vernebelungsdruck: 18 psig

Trockengas: 7.0 l/min; 350°C

Fragmentorspannung: 200 V

Gain: 1.0

Peak width [min]: 0.25

Standardherstellung:

Es werden ca. 12 mg Ubichinon-50 in einen 10 ml Messkolben eingewogen und in n-Hexan gelöst. Die Lösung wird 5 Minuten mit Ultraschall behandelt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Stammlösung ist vor Licht zu schützen. Die Verdünnungen werden durch unabhängige Schritte aus der Stammlösung hergestellt und mit Methanol verdünnt.

9.2 Tabellenanhang

9.2.1 HPLC-ELSD-Daten der Triglycerid-Standards

Die Totzeit des chromatographischen Systems beträgt 2.5 Minuten.

Tabelle 9-1.
HPLC-ELSD-Rohdaten der Standard-Substanzen.

Bezeichnung des Standards	C in [mg/ml]	t _R in [min]	Signalfläche
1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol	0.108	14.63	1389404
1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	0.091	20.54	674002
1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	0.110	21.36	744366
1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol	0.129	17.24	2111765
1,2-Dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	0.104	22.10	1643684
1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	0.192	28.97	1664644
1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	0.134	27.49	895274
1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol	0.400	24.79	9697032
1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	0.075	30.17	380209
Tri-11-Eicosenoin	0.098	34.33	1829100
Triarachin	0.962	43.44	795424
Tricaprin	0.974	6.68	4977355
Tricaprylin	0.974	4.15	6702882
Trierucin	0.962	38.77	1016693
Trilaurin	0.974	12.02	4578474
Trilinolein	1.163	17.17	1336240
Trilinolein	0.267	17.47	3252911
Trilinolenin	1.163	10.69	884078
Trimyristin	0.974	19.75	4825930
Trimyristin	0.126	20.05	639367
Triolein	1.163	24.93	1857342
Tripalmitin	0.974	27.23	4793732
Tristearin	1.163	34.76	1620239

Tristearin	0.115	35.84	628912
------------	-------	-------	--------

Das Triglycerid Tribehenin eluiert nicht von der stationären Phase.

9.2.2 LC/MS-Daten der Triglycerid-Standards

Die folgende Tabelle gibt die Werte wider, die durch die Trennung auf der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped ermittelt wurden.

Tabelle 9-2.

LC/MS-Rohdaten der Standard-Substanzen.

Bezeichnung des Standards	c in [$\mu\text{g/ml}$]	t_R in [min]	Signalfläche
1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol	20.160	3.358	5264820
1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	9.100	5.918	2179280
1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	11.000	5.669	2438280
1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol	12.900	3.758	3467980
1,2-Dimyristoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	11.600	5.160	1803630
1,2-Dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	10.040	4.983	2240000
1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	19.200	7.805	2492850
1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	13.400	6.880	2279540
1-Lauroyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	11.840	5.164	2868050
1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol	4.000	6.398	1059170
1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	7.500	7.635	1541280
Tri-11-Eicosenoin	9.880	8.911	1328750
Tricaprin	10.004	2.139	4739150
Tricaprylin	10.004	1.681	4817240
Trilaurin	10.004	2.917	2791840
Trilinolein	11.625	5.356	1984860
Trilinolein	10.680	5.237	1622990
Trilinolenin	11.625	3.832	1793820
Trimyristin	10.004	4.261	2154850
Trimyristin	12.600	4.308	3329800
Triolein	11.625	7.454	1771180

Tripalmitin	10.004	6.700	539733
Tripalmitolein	9.700	4.755	2063060

Die folgende Tabelle gibt die Werte wider, die durch die Trennung auf der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP ermittelt wurden.

Tabelle 9-3.
LC/MS-Rohdaten der Standard-Substanzen.

Bezeichnung des Standards	c in [$\mu\text{g/ml}$]	t_R in [min]	Signalfläche
1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol	20.160	3.990	2999230
1,2-Dilinoeoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	9.100	7.361	2641020
1,2-Dilinoeoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	11.000	7.237	3105620
1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol	12.900	4.693	3543960
1,2-Dimyristoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	11.600	6.711	1985470
1,2-Dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	10.040	7.610	1667610
1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	19.200	12.550	3484920
1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	13.400	10.761	1523240
1-Lauroyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	11.840	6.569	6080850
1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoeoyl-rac-glycerol	4.000	8.556	1329400
1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	7.500	13.651	384709
Tri-11-Eicosenoin	9.880	n.d.	n.d.
Tricaprin	10.004	2.232	4654860
Tricaprylin	10.004	1.672	5659010
Trilaurin	10.004	3.292	3579260
Trilinoein	11.625	6.306	2431630
Trilinoein	10.680	6.318	2175680
Trilinolenin	11.625	4.254	2315540
Trimyristin	10.004	5.701	1991770
Trimyristin	12.600	5.833	2686070
Triolein	11.625	10.150	2391240
Tripalmitin	10.004	n.d.	n.d.
Tripalmitolein	9.700	5.650	2647770

Die Substanzen Tripalmitin und Tri-11-Eicosenoin sind nicht von der stationären Phase eluierbar.

9.2.3 HPLC-Daten weiterer Standard-Substanzen und kosmetischen Rohstoffe

Tabelle 9-4.

HPLC-ELSD-Rohdaten von Standard-Substanzen und Rohstoffen.

Bezeichnung des Standards	c in [mg/ml]	t _R in [min]	Signalfäche
Arachidylalkohol (Standard)	0.113	9.49	3321191
Behenylalkohol (Rohstoff, 3 Verbindungen)	0.367	7.61 9.60 12.04	188121 3034503 24830995
Behenylalkohol (Standard)	0.162	11.81	7568233
Cetearylalkohol (Rohstoff, 2 Verbindungen)	0.291	6.06 7.62	2293437 6477206
Cetyl Palmitate (Rohstoff, 4 Verbindungen)	0.2035	14.00 16.88 19.85 22.71	702980 441921 372887 383044
Cetylalkohol (Rohstoff)	0.280	6.06	8541534
Cholesterol (Rohstoff)	0.273	18.04	2656101
Cholesterol (Standard)	0.500	17.37	454903
Cholesteryloleat (Standard)	0.500	28.44	954091
Cholesterylpalmitat (Standard)	0.277	30.63	4723675
Decyl Oleate (Rohstoff, 2 Verbindungen)	0.2285	8.99 11.11	137551 6702471
Myristyl Myristate (Rohstoff)	0.1175	14.96	4186856
Myristylalkohol (Rohstoff)	0.265	4.92	119723
Octyldodecanol (Rohstoff)	0.079	6.48	1158628
Ölsäure (Standard)	0.500	4.92	593602
Ölsäuremethylester (Standard)	0.500	4.64	147062
Triolein (Standard)	0.500	25.22	1241183

9.2.4 Darstellung von m/z-Verhältnisse der Triglyceride und Ester als Quasi-Molekular-Ionen $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ und $[M+Na]^+$

Die Triglyceride bilden als Quasi-Molekular-Ionen $[M+NH_4]^+$ und $[M+Na]^+$. Enthalten die Triglyceride oxidierte Fettsäuren entstehen nur $[M+H]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Addukte als Quasi-Molekular-Ionen. Die Wachsester lassen sich im Massenspektrometer anhand von $[M+H]^+$ -, $[M+NH_4]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Addukten identifizieren. Die Abkürzungen der Triglyceride leiten sich von den mit Glycerin veresterten Fettsäuren ab. Für die Fettsäuren werden die Trivialnamen abgekürzt und es ergibt sich folgende Nomenklatur: **Ca** – Caprylsäure, **C** – Caprinsäure, **La** – Laurinsäure, **M** – Myristinsäure, **Po** – Palmitoleinsäure, **P** – Palmitinsäure, **Ln** – Linolensäure, **L** – Linolsäure, **O** – Ölsäure, **S** – Stearinsäure, **Ri** – Ricinolsäure, **Hs** – Hydroxystearinsäure, **A** – Arachinsäure, **G** – Gadolinsäure, **Ei** – Eicosensäure, **Ar** – Arachidonsäure, **B** – Behensäure, **E** – Erucasäure, **Dd** – Docosadiensäure.

Tabelle 9-5.

Quasi-Molekular-Ionen der Triglyceride und Ester.

Kurzform der Triglyceride	MW	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+Na]^+$
CaCaCa	470		488	493
CaCaC	498		516	521
CaCC	526		544	549
CCC	554		572	577
CCLa	582		600	605
CaCaL	606		624	629
CaCaO	608		626	631
ClLa	610		628	633
CaCL	634		652	657
LaLaLa	638		656	661
LaLaM	666		684	689
LaLaPo	692		710	715
LaMM	694		712	717
LaLaL	718		736	741
LaLaO	720		728	743

MMM	722	740	745
LaML	746	764	769
MMPo	748	766	771
LaMO	748	766	771
MMP	750	768	773
MML	774	792	794
MMO	776	794	799
MPPo	776	794	799
MPP	778	796	801
MpoL	800	818	823
PoPoPo	800	818	823
PoPoP	802	820	825
PoPP	804	822	827
PPP	806	824	829
PoPoL	826	844	849
PoPLn	826	844	849
PPLn	828	846	851
PoPL	828	846	851
PPL	830	848	853
PoPO	830	848	853
PPO	832	850	855
MOS	832	850	855
PLnLn	850	868	873
PLnL	852	870	875
PLL	854	872	877
PlnO	854	872	877
PoLO	854	872	877
PLO	856	874	879
PoOO	856	874	879
POO	858	876	881
PLS	858	876	881
POS	860	878	883
LnLnLn	872	890	895
RiPL	872	873	895

LnLnL	874		892	897
LnLL	876		894	899
LnLnO	876		894	899
LLL	878		896	901
LnLO	878		896	901
LLO	880		898	903
LnOO	880		898	903
LOO	882		900	905
LLS	882		900	905
OOO	884		902	907
LOS	884		902	907
OOS	886		904	909
POG bzw. POEi	886		904	909
OSS	888		906	911
POA	888		906	911
PSG bzw. PSEi	888		906	911
SSS	890		908	913
PRiRi	890	891		913
PHsHs	894	895		917
LnLG bzw. LnLEi	906		924	929
LLG bzw. LLEi	908		926	931
LLA	910		928	933
LOG bzw. LOEi	910		928	933
LnRiRi	912	913		935
OOG bzw. OOEi	912		930	935
PLE	912		930	935
LRiRi	914	915		937
PAG bzw. PAEi	914		932	937
OSG bzw. OSEi	914		932	937
ORiRi	916	917		939
SOA	916		934	939
SSG bzw. SSEi	916		934	939
SRiRi	918	919		941
SHsHs	922	923		945

RiRiRi	932	933		955
LnLE	934		952	957
LLE	936		954	959
HsHsHs	939	939		961
LOE	938		956	961
LnLB	938		956	961
ArGG bzw. ArEiEi	962		980	985
GGG bzw.	968		986	991
EiEiEi				
LGB bzw. LEiB	968		986	991
OGE bzw. OEiE	968		986	991
AAA	974		992	997
GGDd bzw. EiEiDd	994		1012	1017
LEE	994		1012	1017
GGE bzw.	996		1014	1019
EiEiE				
OEE	996		1014	1019
EGDd bzw. EEiDd	1022		1040	1045
EEE	1052		1070	1075
BBB	1058		1076	1081
Ölsäure-Gadolinylester	578	579	596	601
Gadolinsäure-				
Gadolinylester	608	609	626	631
Gadolinsäure-Erucylester	634	635	652	657
Erucasäure-Erucylester	662	663	680	685

9.2.5 HPLC-ECD und LC/MS-Daten für Ubichinon-50

Tabelle 9-6.

Darstellung der y-Werte für die Kalibrierfunktion von Ubichinon-50 mit HPLC-ECD.

c in [ng/ml]	Signalfläche 1	Signalfläche 2	Signalfläche 3	Mittelwert
11.4	18073	19151	21113	19446
22.8	33638	36458	34568	34888
57.0	53171	51678	54588	53146
114.0	141601	136121	147698	141805
228.0	244776	237967	261761	248168

Tabelle 9-7.

Darstellung der y-Werte für die Kalibrierfunktion von Ubichinon-50 mit LC/MS.

c in [ng/ml]	Signalfläche 1	Signalfläche 2	Signalfläche 3	Signalfläche 4	Signalfläche 5	Signalfläche 6
0.57	9414	8468	7785	7165	8726	7686
1.14	14966	14631	15536	15927	15389	15354
2.28	17790	18276	18354	18114	18642	17496
5.70	72405	72450	72042	72927	73117	73885
11.4	134875	136008	137274	13646	135502	134841
22.8	181229	182879	182800	181927	180097	177203
57.0	578306	565609	577484	569348	575574	585390
114.0	1121590	1105860	1108600	1115400	1114000	1112860

Tabelle 9-8.

LC/MS-Rohdaten für die Bestimmung von Ubichinol-50 in primären Fibroblasten.

Probennummer	Signalfläche 1	Signalfläche 2	Signalfläche 3	y_m	s_x	V [%]
1	119870	105964	-	112917	6953	6.16
2	72955	78579	66141	72558	5086	7.01
3	29914	26626	24726	27089	2143	7.91
4	21805	23722	33532	26353	5136	19.45

5	29609	34763	40566	34979	4476	12.80
6	27980	20730	18829	22513	3943	17.51

Tabelle 9-9.

LC/MS-Rohdaten für die Bestimmung von Ubichinon-50 in primären Fibroblasten.

Proben- nummer	Signal- fläche 1	Signal- fläche 2	Signal- fläche 3	y_m	s_x	V [%]
1	1319740	898017	-	1108879	210862	19.02
2	857676	808109	661609	775798	83241	10.73
3	563545	589811	616292	589883	21534	3.65
4	1641840	1709510	1733020	1694790	38652	2.28
5	1607930	1923790	1792440	1774720	129557	7.30
6	920048	958167	937244	938486	15587	1.66

9.2.6 HPLC-DAD Daten für Ubichinon-50

Die Stammlösung von Ubichinon-50 in n-Hexan hat eine Konzentration von 1.82 mg/ml. Es werden 10 Verdünnungen daraus hergestellt und 6mal ins HPLC-DAD-System injiziert.

Tabelle 9-10.

HPLC-DAD-Rohdaten für die Standardkalibrierung mit Ubichinon-50 in n-Hexan.

c in [$\mu\text{g/ml}$]	Signal- fläche 1	Signal- fläche 2	Signal- fläche 3	Signal- fläche 4	Signal- fläche 5	Signal- fläche 6
1.82	13420	12960	15080	13880	12320	14160
3.64	17920	18040	16740	18040	17220	18600
9.10	76160	73080	75140	76320	77240	75260
18.2	122560	125400	124280	121560	127760	118800
36.4	167000	167720	168160	165120	160400	157000
91.0	666578	670532	637569	674800	617241	621429
182.0	1267984	1274151	1270079	1295574	1125561	1123289
364.0	2498828	2543485	2591083	2360826	2364191	2367964

910.0	4858047	4933363	4803124	4837048	4795350	4802082
1820.0	9730346	9641434	9790396	9755716	9847282	9875117

Die Stammlösung von Ubichinon-50 in Ethanol hat eine Konzentration von 0.532 mg/ml. Es werden 7 Verdünnungen daraus hergestellt und doppelt injiziert.

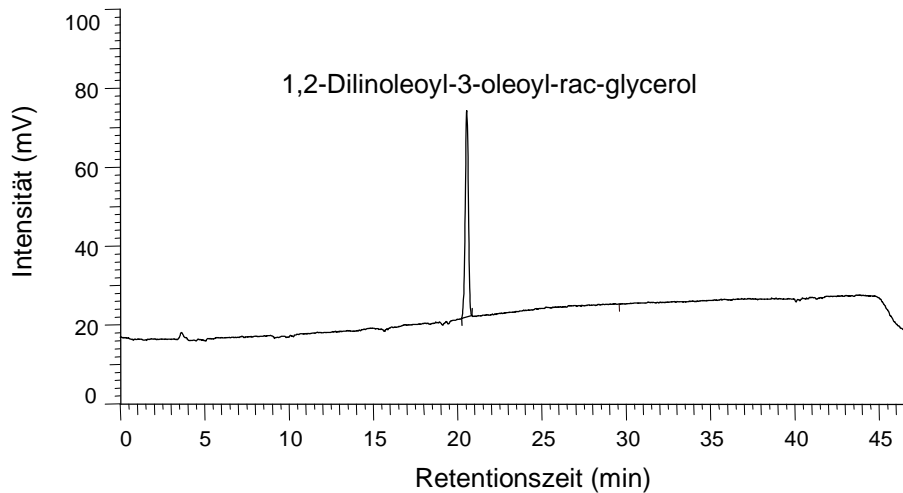
Tabelle 9-11.

HPLC-DAD-Rohdaten für die Standardkalibrierung von Ubichinon-50 in Ethanol.

c in [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Signalfläche 1	Signalfläche 2	Mittelwert y_m
5.32	56080	54120	55100
10.64	76220	74840	75530
26.60	291960	293000	292480
53.20	520000	518280	519140
106.40	1051480	1051140	1051310
266.00	2172160	2160940	2166550
532.00	4346160	4342720	4344440

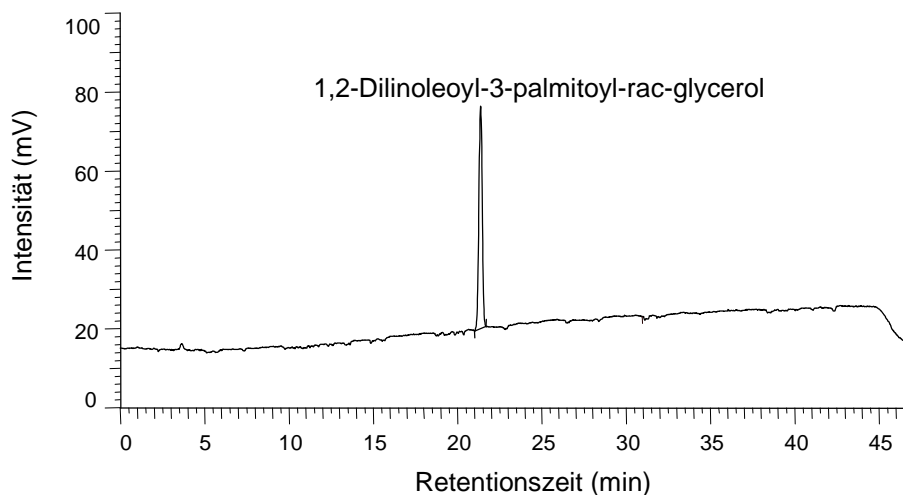
9.3. Chromatogramme und Spektren

9.3.1 HPLC-ELSD-Chromatogramme der Standards



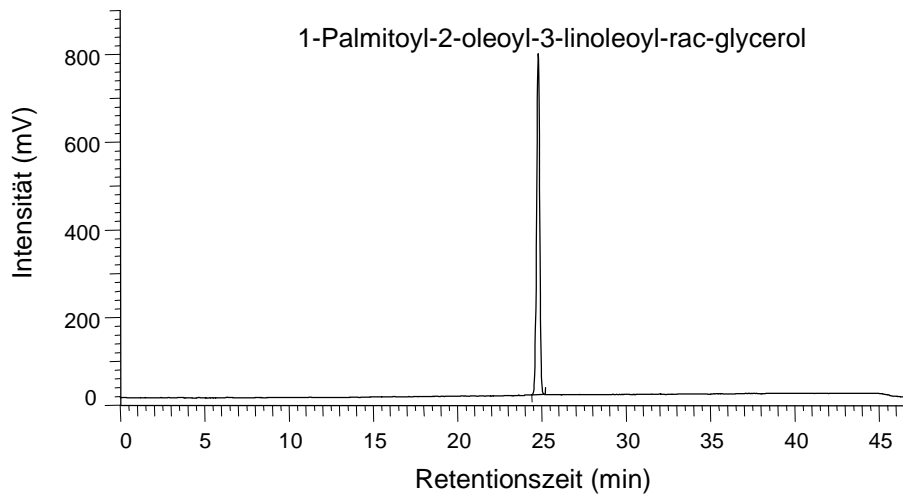
Chromatogramm 9-1.

Triglycerid LLO; Bruttoretentionszeit = 20.54 min; Konzentration = 0.091 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

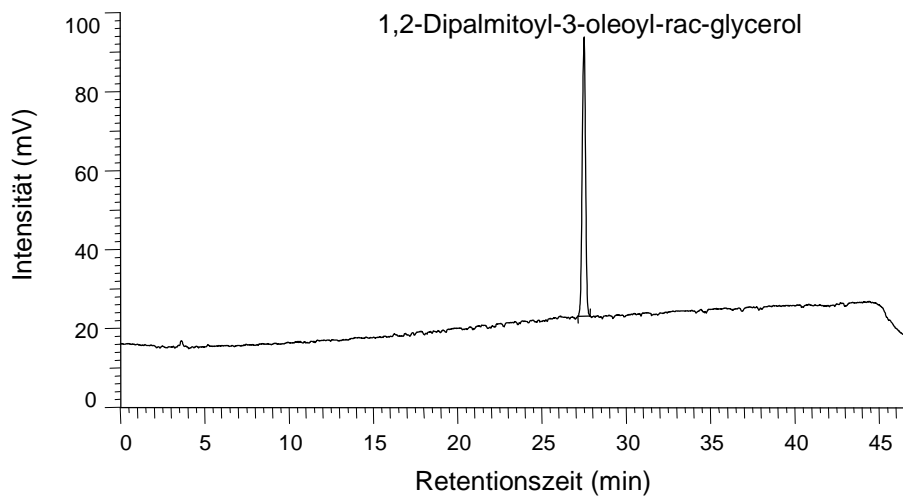


Chromatogramm 9-2.

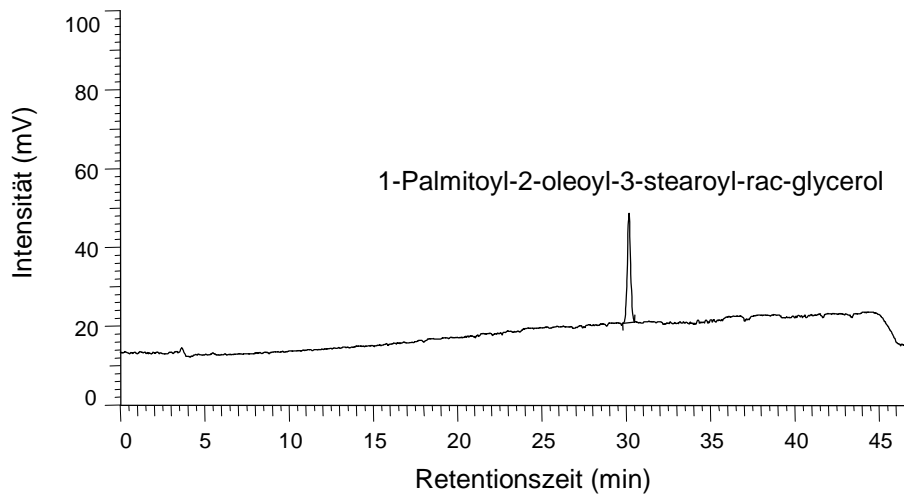
Triglycerid PLL; Bruttoretentionszeit = 21.36 min; Konzentration = 0.110 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-3.**

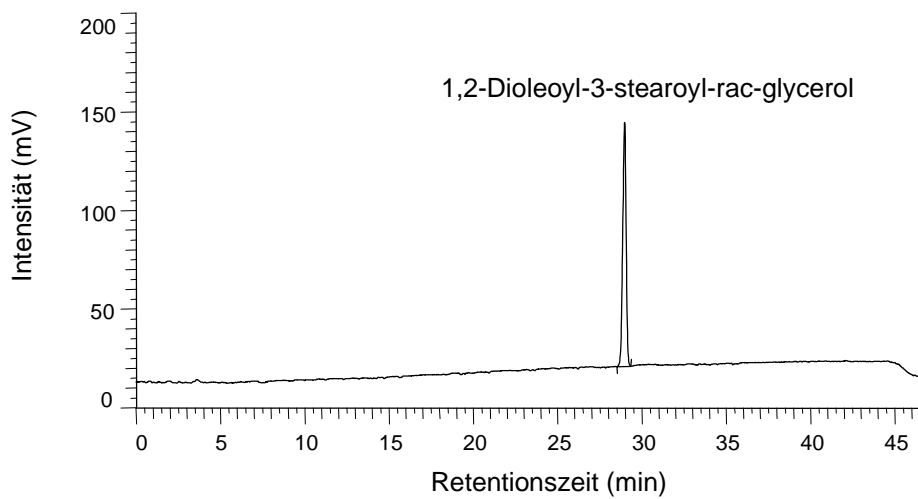
Triglycerid POL; Bruttoretentionszeit = 24.79 min; Konzentration = 0.40 mg/ml
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-4.**

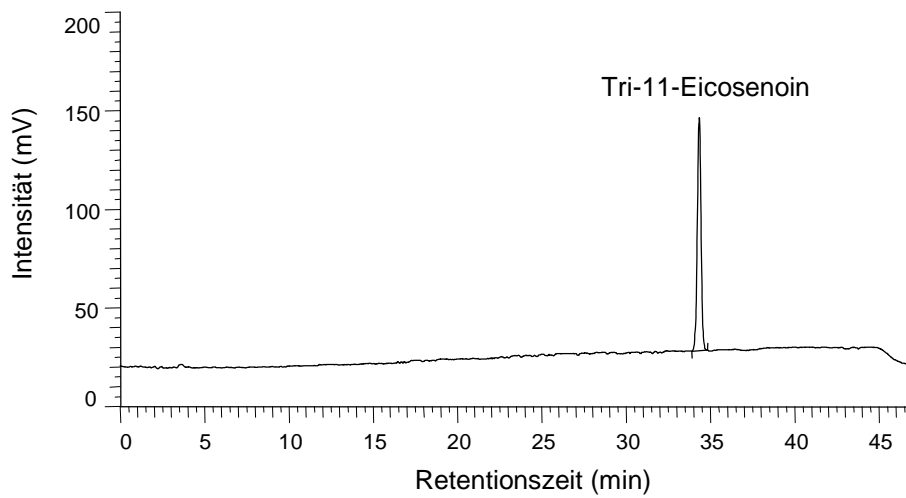
Triglycerid PPO; Bruttoretentionszeit = 27.49 min; Konzentration = 0.134 mg/ml
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-5.**

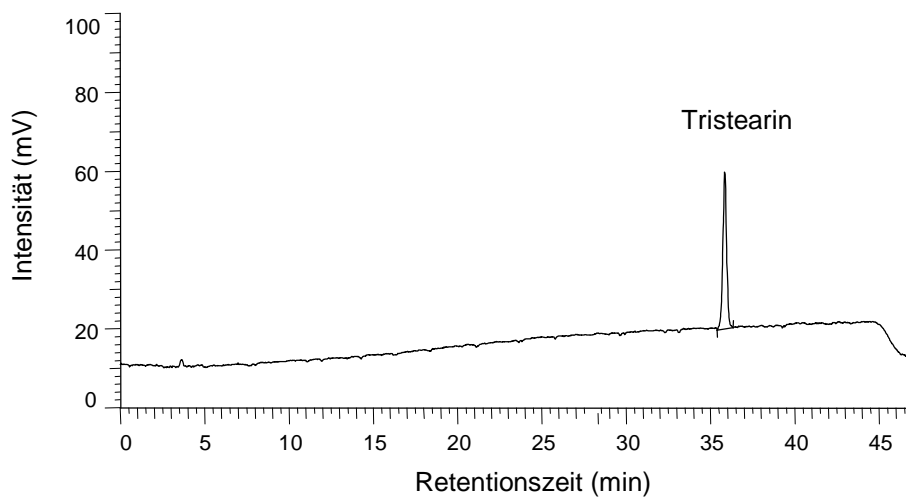
Triglycerid POS; Bruttoretentionszeit = 30.17 min; Konzentration = 0.075 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-6.**

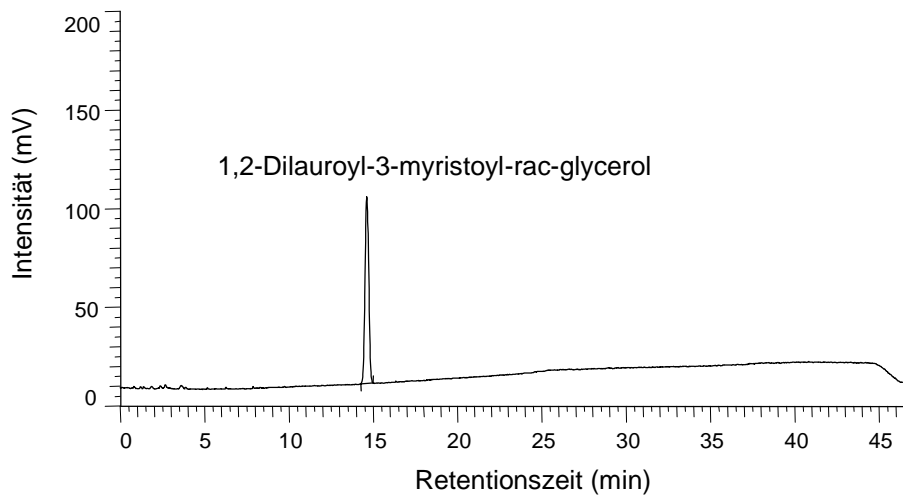
Triglycerid OOS; Bruttoretentionszeit = 28.97 min; Konzentration = 0.192 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-7.**

Triglycerid EiEiEi; Bruttoretentionszeit = 34.33 min; Konzentration = 0.098 mg/ml; Injektionsvolumen = 10 μ l

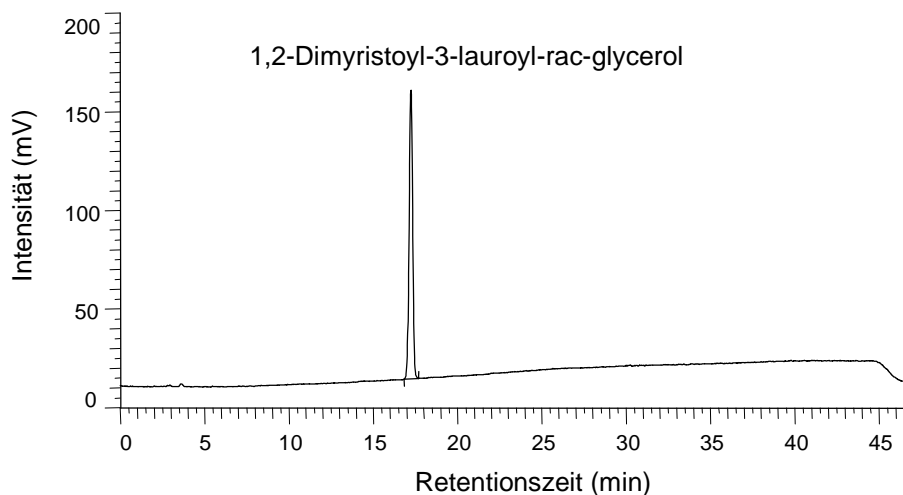
**Chromatogramm 9-8.**

Triglycerid SSS; Bruttoretentionszeit = 35.84 min; Konzentration = 0.115 mg/ml; Injektionsvolumen = 10 μ l



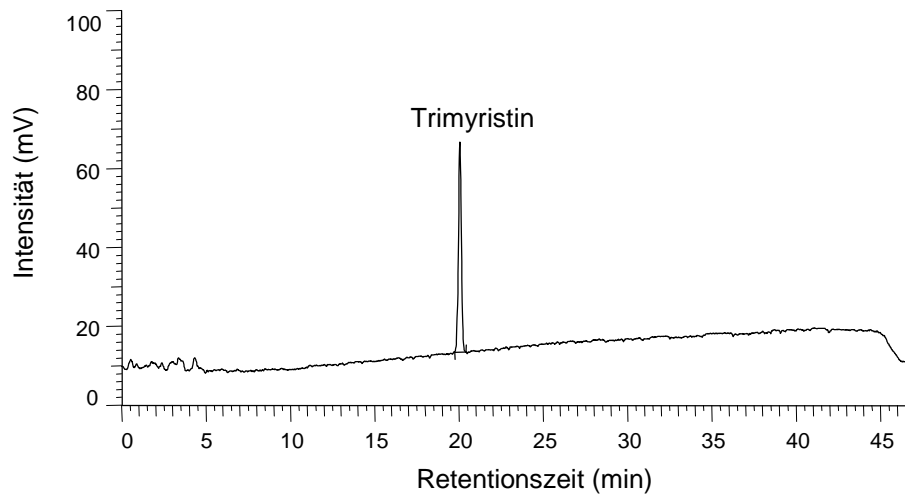
Chromatogramm 9-9.

Triglycerid LaLaM; Bruttoretentionszeit = 14.63 min; Konzentration = 0.108 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

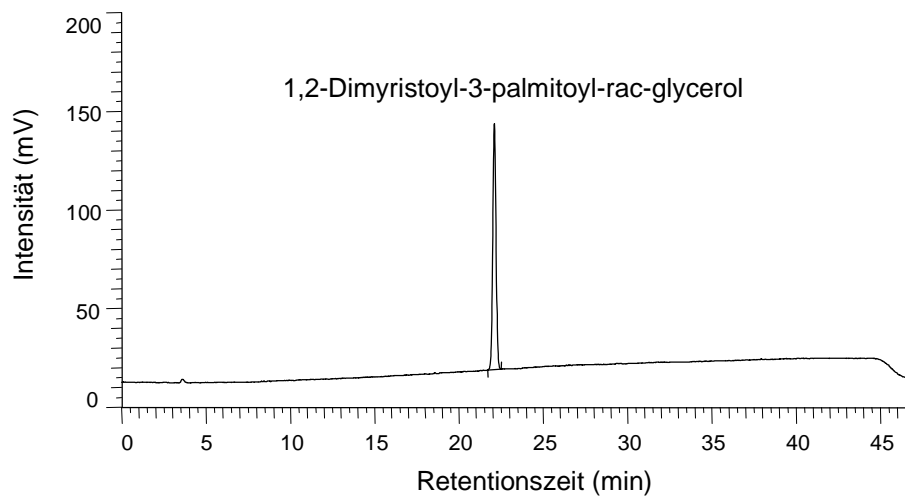


Chromatogramm 9-10.

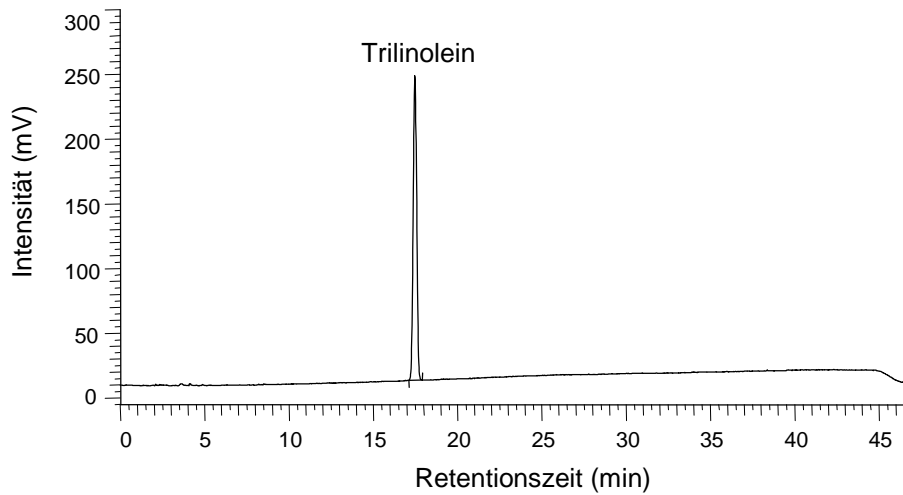
Triglycerid LaMM; Bruttoretentionszeit = 17.24 min; Konzentration = 0.129 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-11.**

Triglycerid MMM; Bruttoretentionszeit = 20.05 min; Konzentration = 0.126 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l

**Chromatogramm 9-12.**

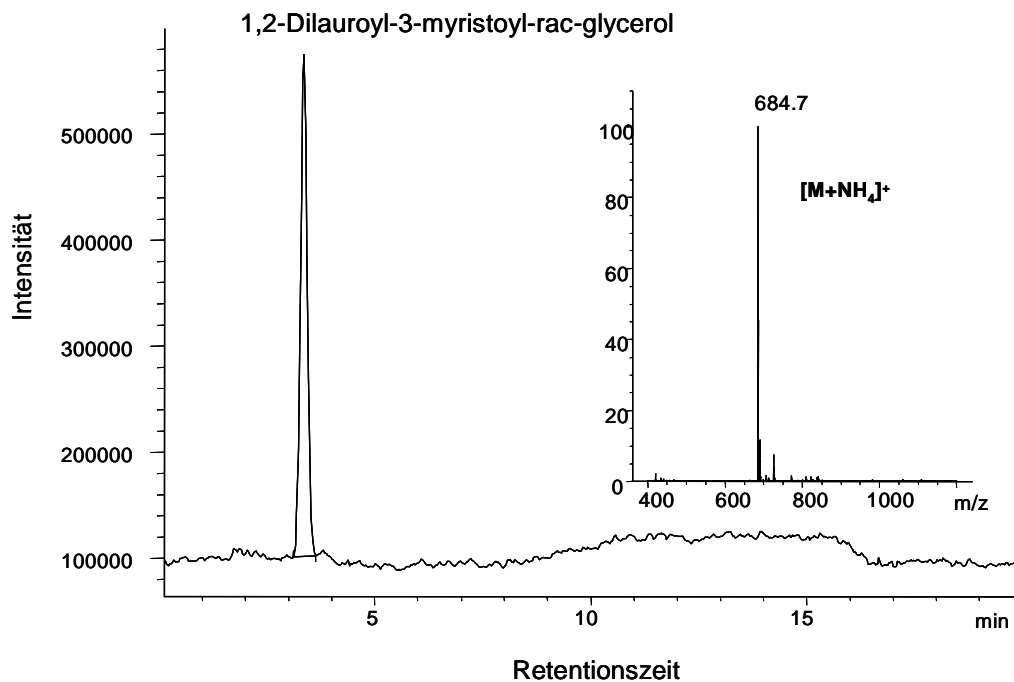
Triglycerid MMP; Bruttoretentionszeit = 22.10 min; Konzentration = 0.104 mg/ml;
Injektionsvolumen = 10 μ l



Chromatogramm 9-13.

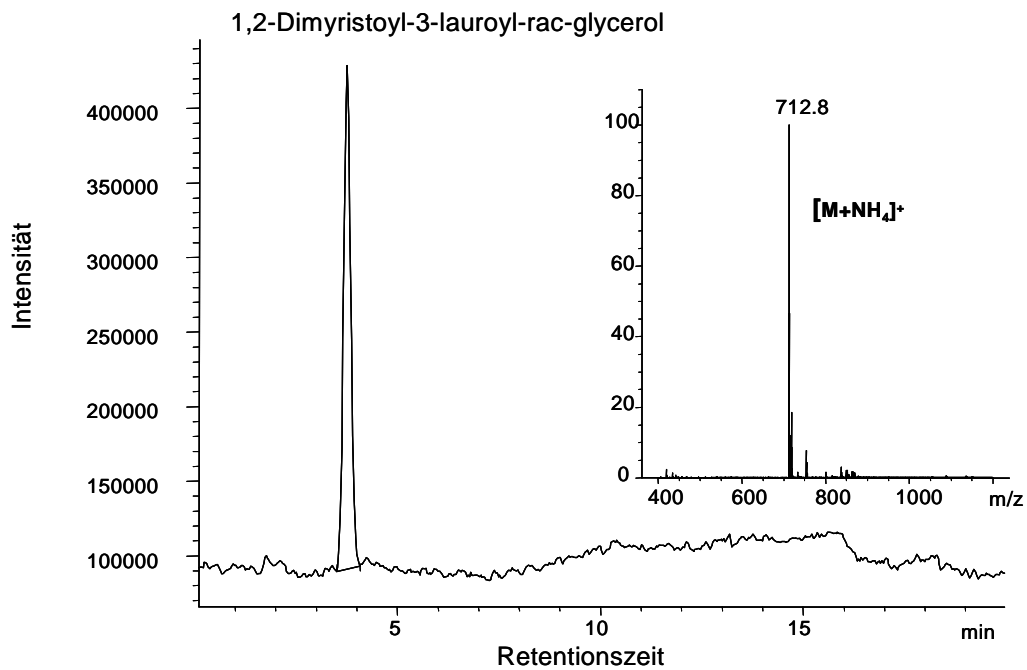
Triglycerid LLL; Bruttoretentionszeit = 17.47 min; Konzentration = 0.267 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l

9.3.2 TIC-Chromatogramme und Massenspektren der Standards

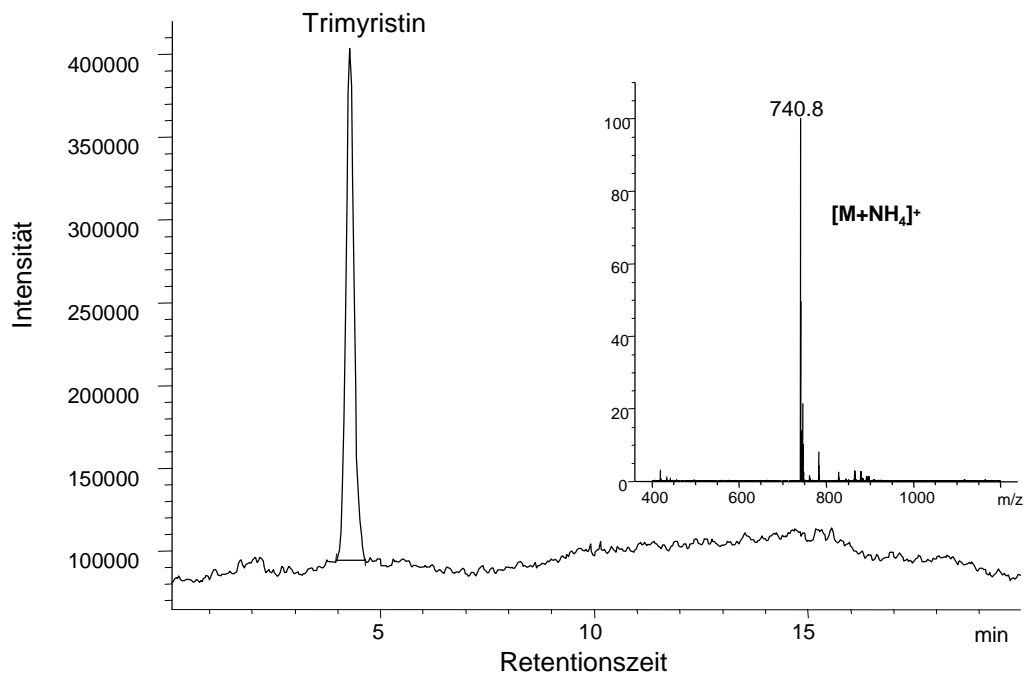


TIC und MS 9-1.

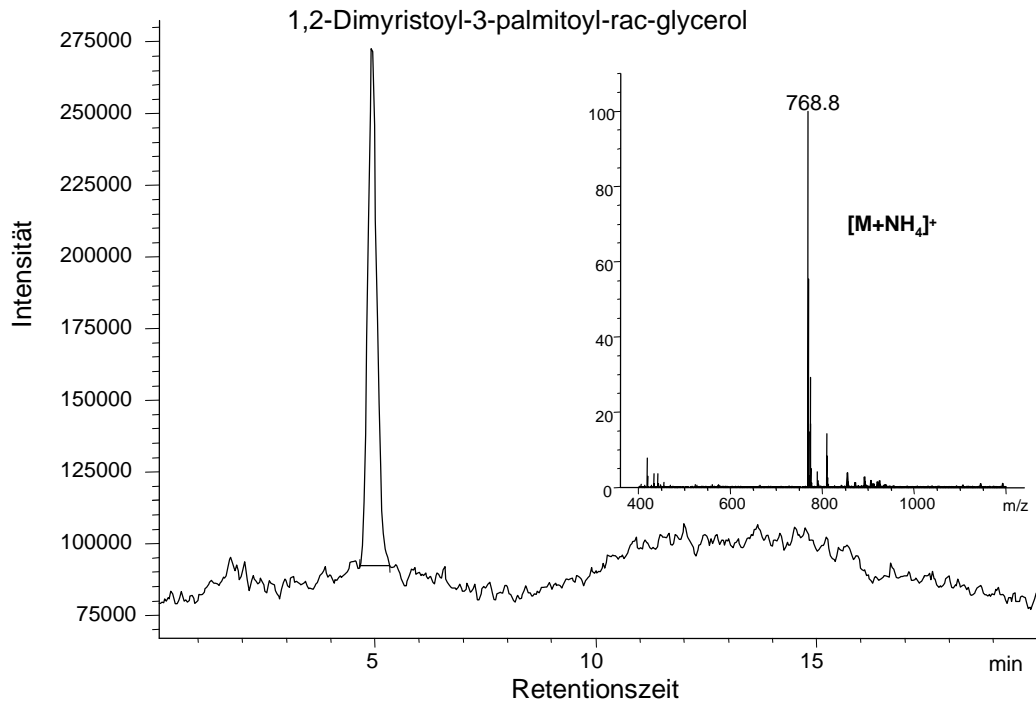
Triglycerid LaLaM; Bruttoretentionszeit = 3.358 min; Konzentration = 20.16 μ g/ml; Injektionsvolumen 5 μ l

**TIC und MS 9-2.**

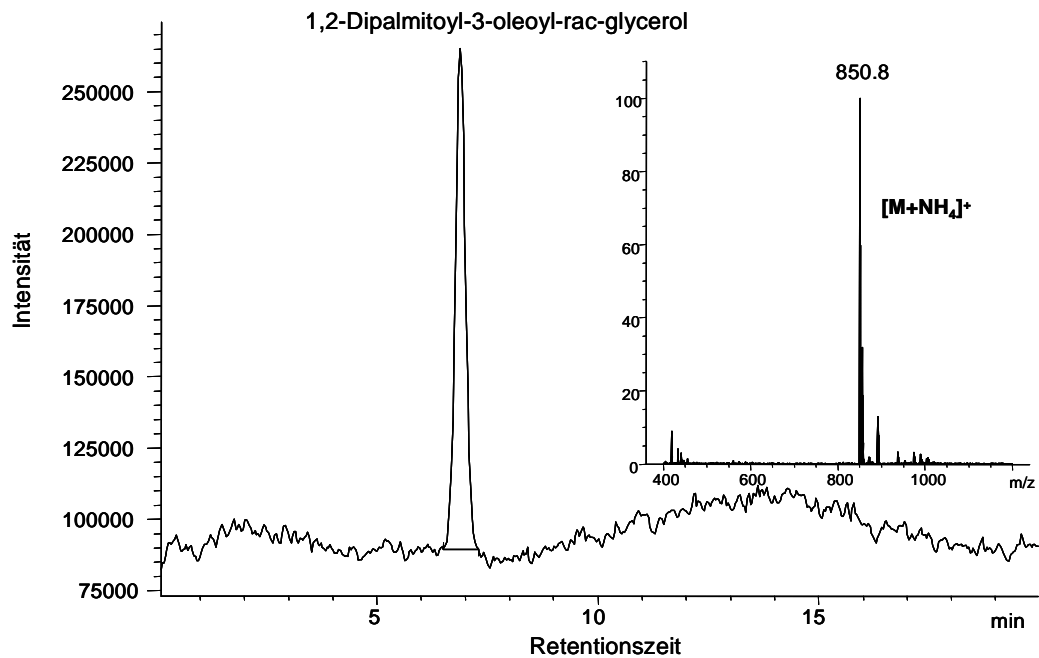
Triglycerid MMLa; Bruttoretentionszeit = 3.770 min; Konzentration = 25.80 µg/ml; Injektionsvolumen 5 µl

**TIC und MS 9-3.**

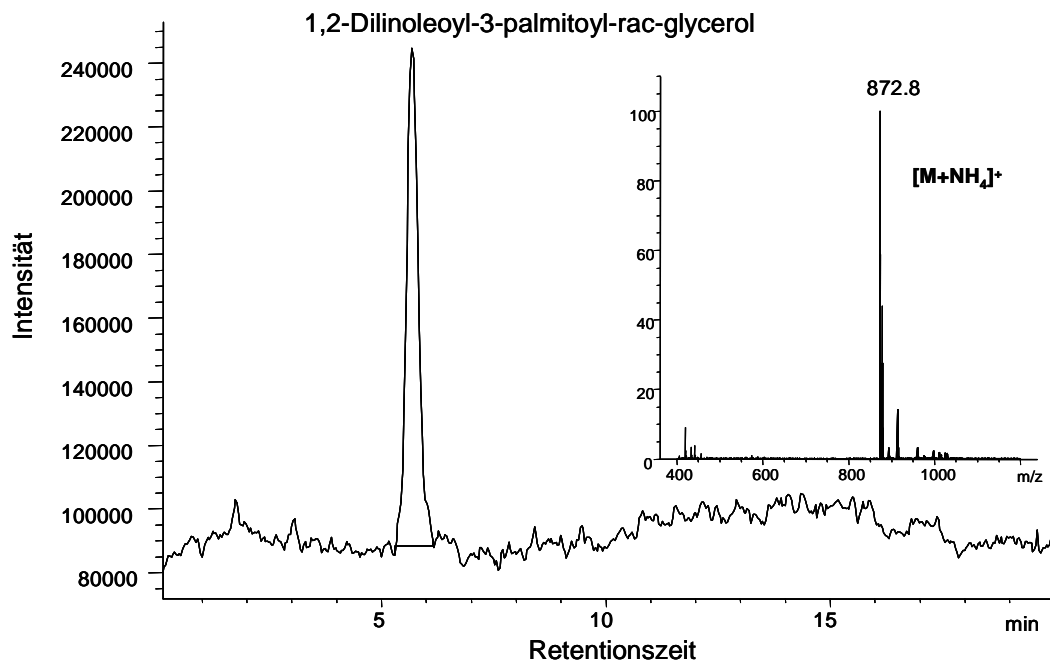
Triglycerid MMM; Bruttoretentionszeit = 4.283 min; Konzentration = 25.20 µg/ml; Injektionsvolumen 5 µl

**TIC und MS 9-4.**

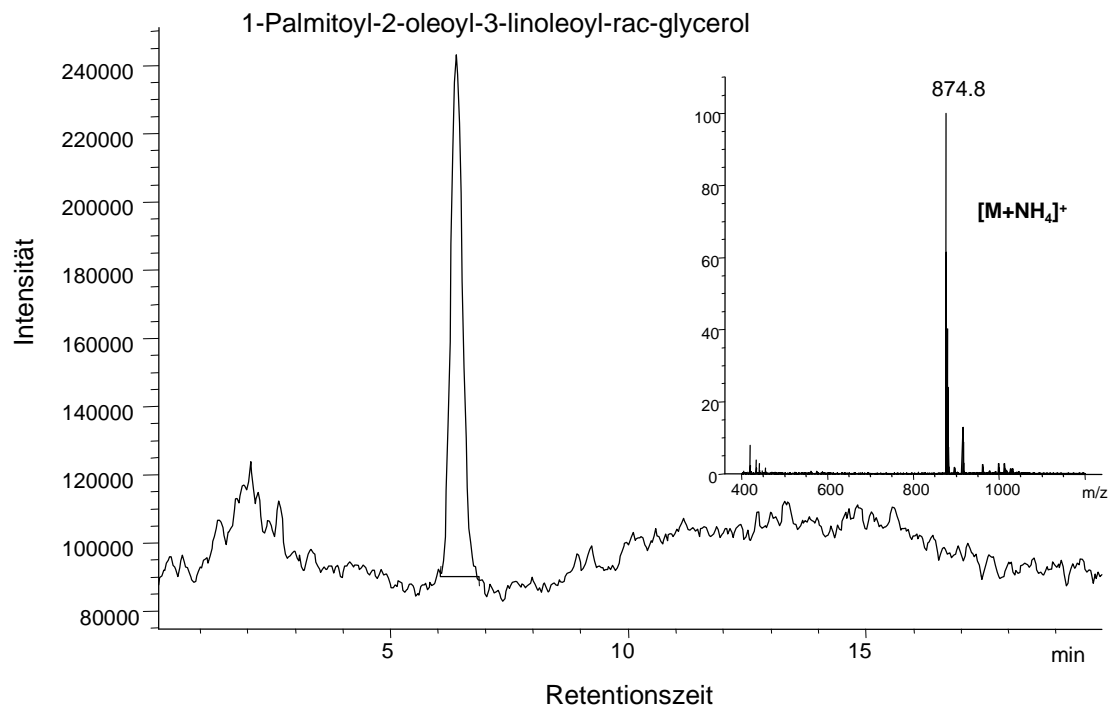
Triglycerid MMP; Bruttoretentionszeit = 4.941 min; Konzentration = 20.08 $\mu\text{g/ml}$;
Injektionsvolumen 5 μl

**TIC und MS 9-5.**

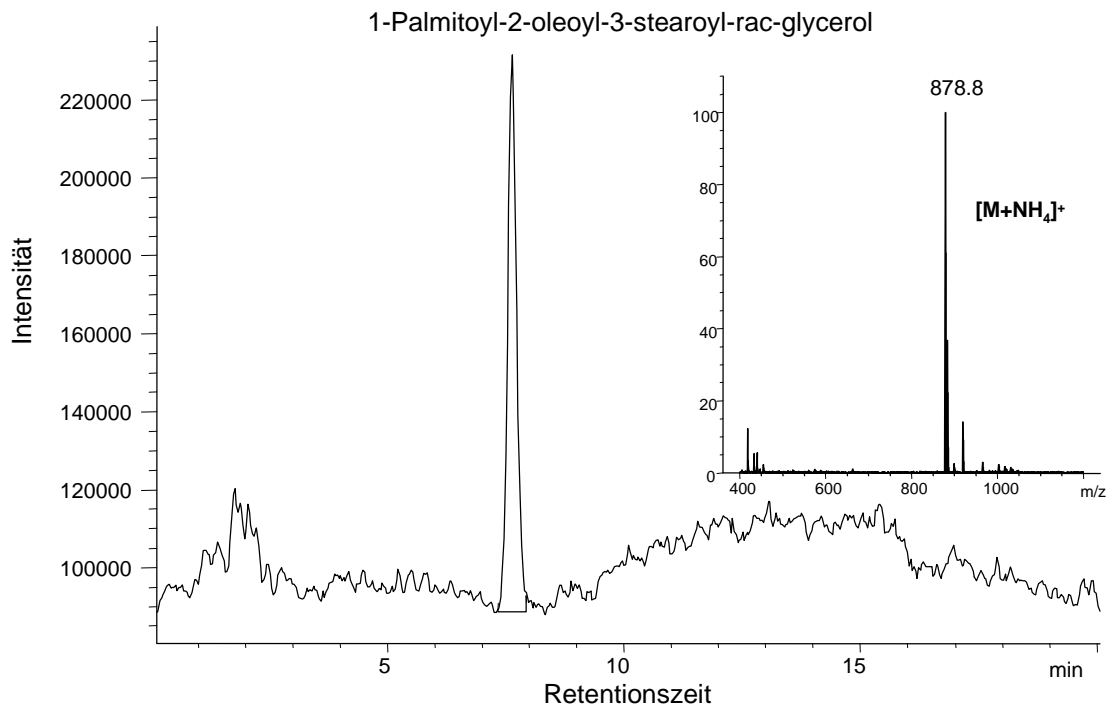
Triglycerid PPO; Bruttoretentionszeit = 6.891 min; Konzentration = 26.80 $\mu\text{g/ml}$;
Injektionsvolumen 5 μl

**TIC und MS 9-6.**

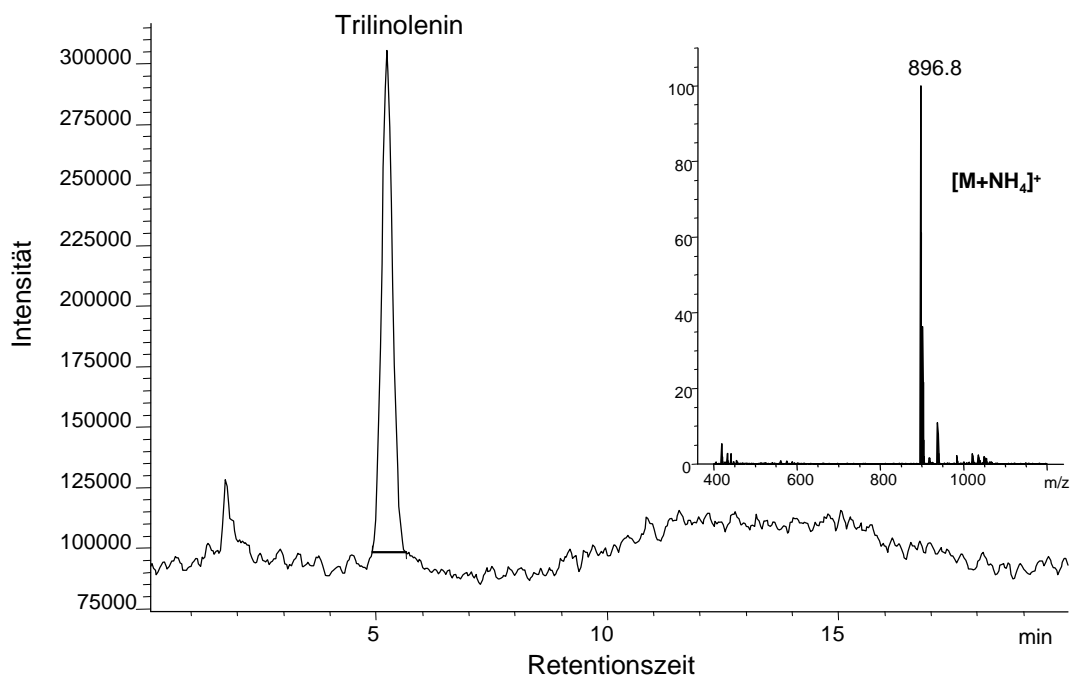
Triglycerid LLP; Bruttoretentionszeit = 5.684 min; Konzentration = 22.00 µg/ml; Injektionsvolumen 5 µl

**TIC und MS 9-7.**

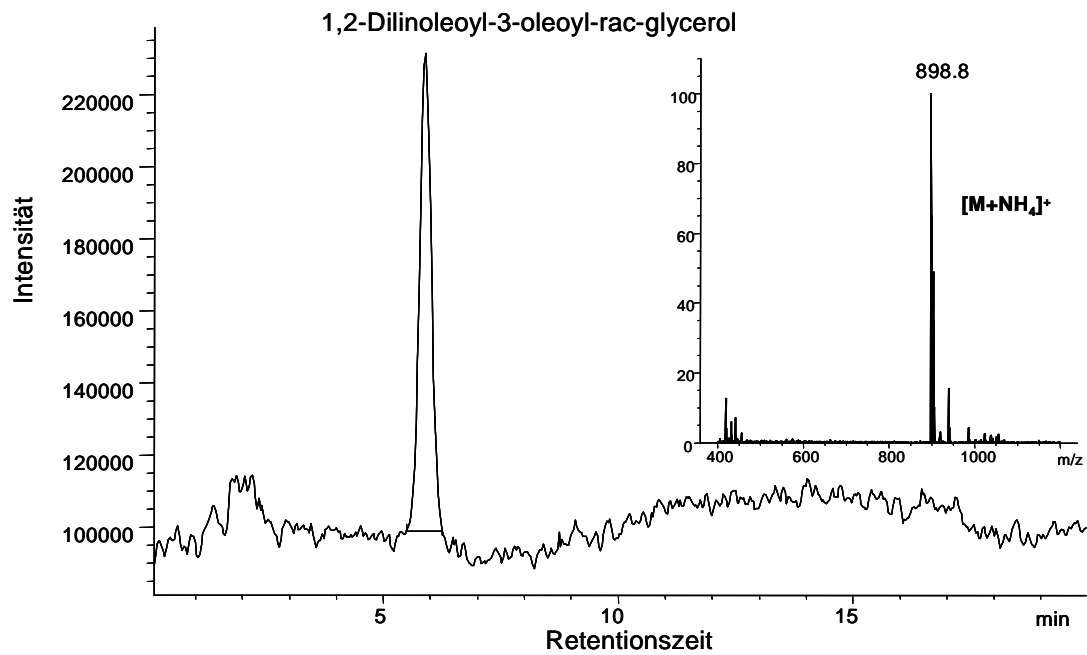
Triglycerid POL; Bruttoretentionszeit = 6.387 min; Konzentration = 40.00 µg/ml; Injektionsvolumen 5 µl

**TIC und MS 9-8.**

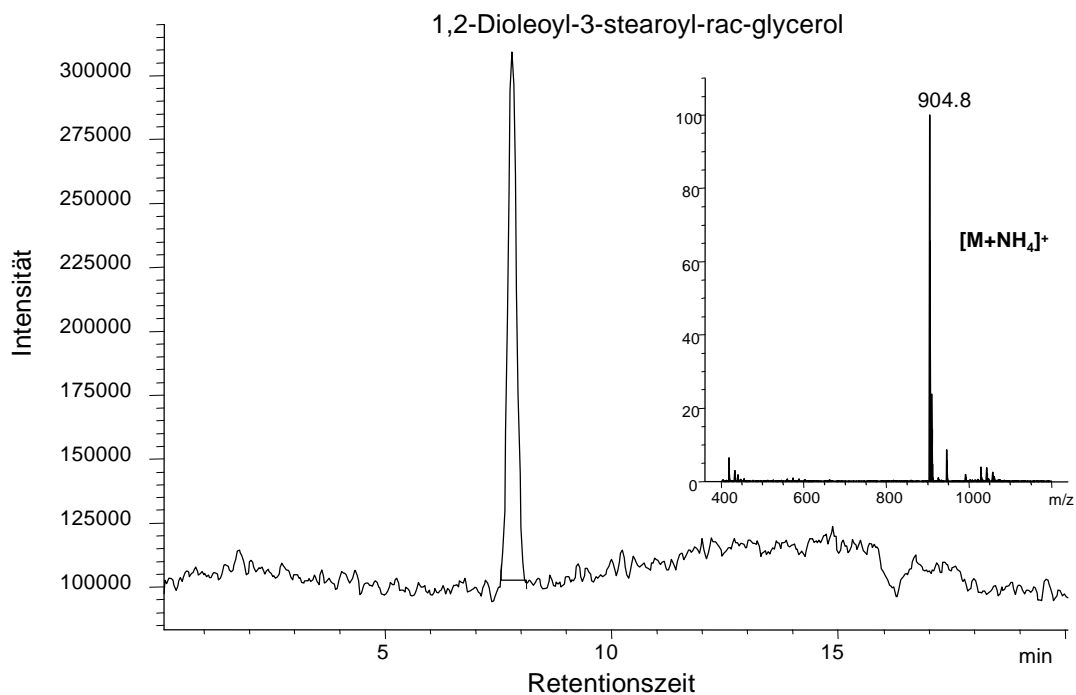
Triglycerid POS; Bruttoretentionszeit = 7.634 min; Konzentration = 15.00 $\mu\text{g/ml}$;
Injektionsvolumen 5 μl

**TIC und MS 9-9.**

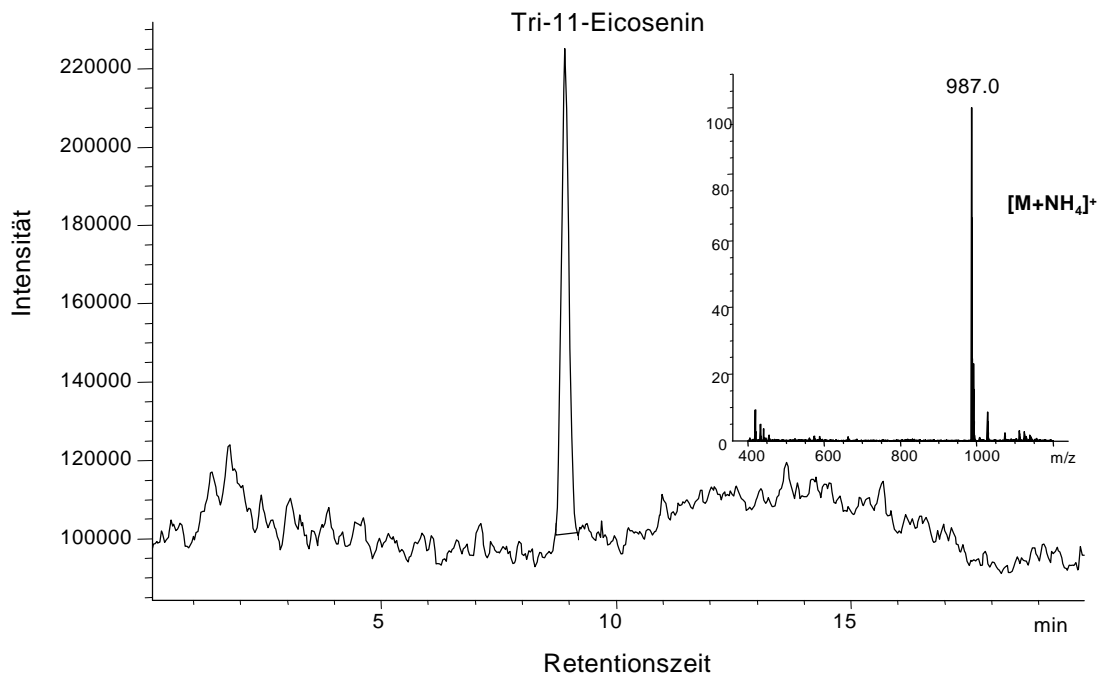
Triglycerid LLL; Bruttoretentionszeit = 5.235 min; Konzentration = 21.36 $\mu\text{g/ml}$;
Injektionsvolumen 5 μl

**TIC und MS 9-10.**

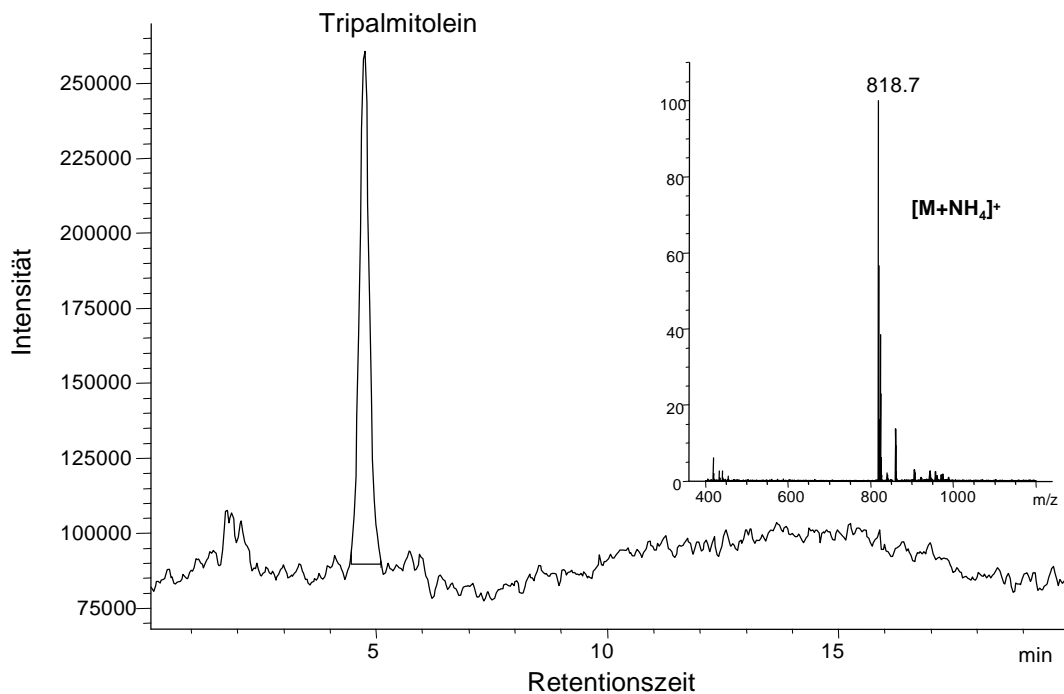
Triglycerid LLO; Bruttoretentionszeit = 5.900 min; Konzentration = 18.20 $\mu\text{g/ml}$;
Injektionsvolumen 5 μl

**TIC und MS 9-11.**

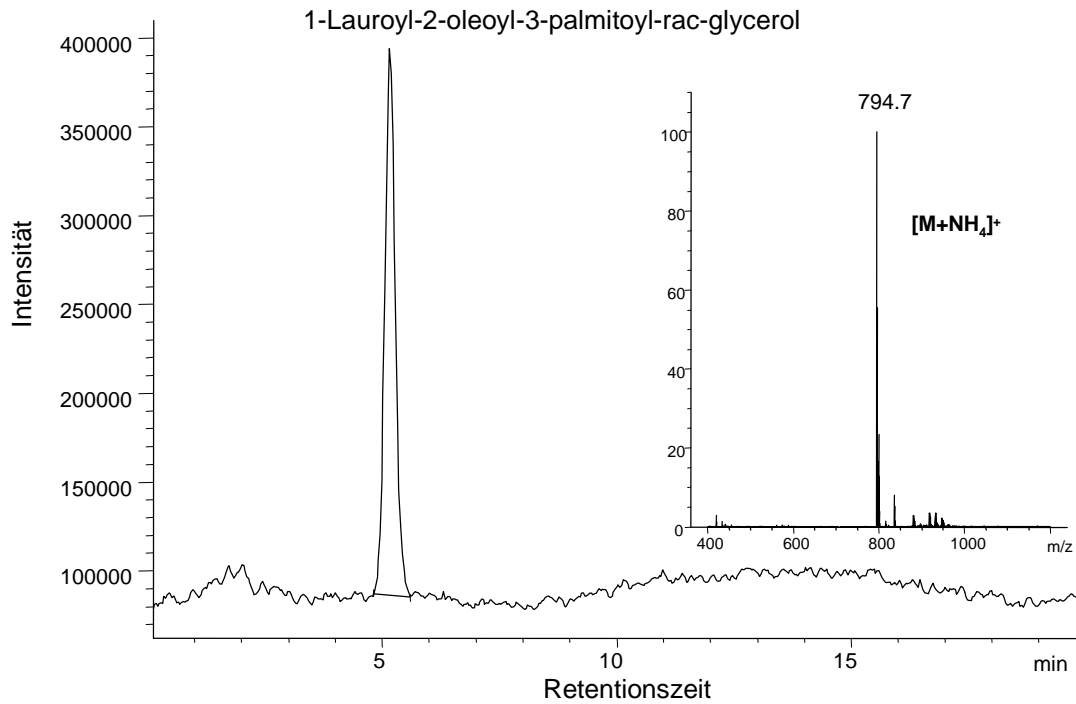
Triglycerid OOS; Bruttoretentionszeit = 7.804 min; Konzentration = 38.40 $\mu\text{g/ml}$;
Injektionsvolumen 5 μl

**TIC und MS 9-12.**

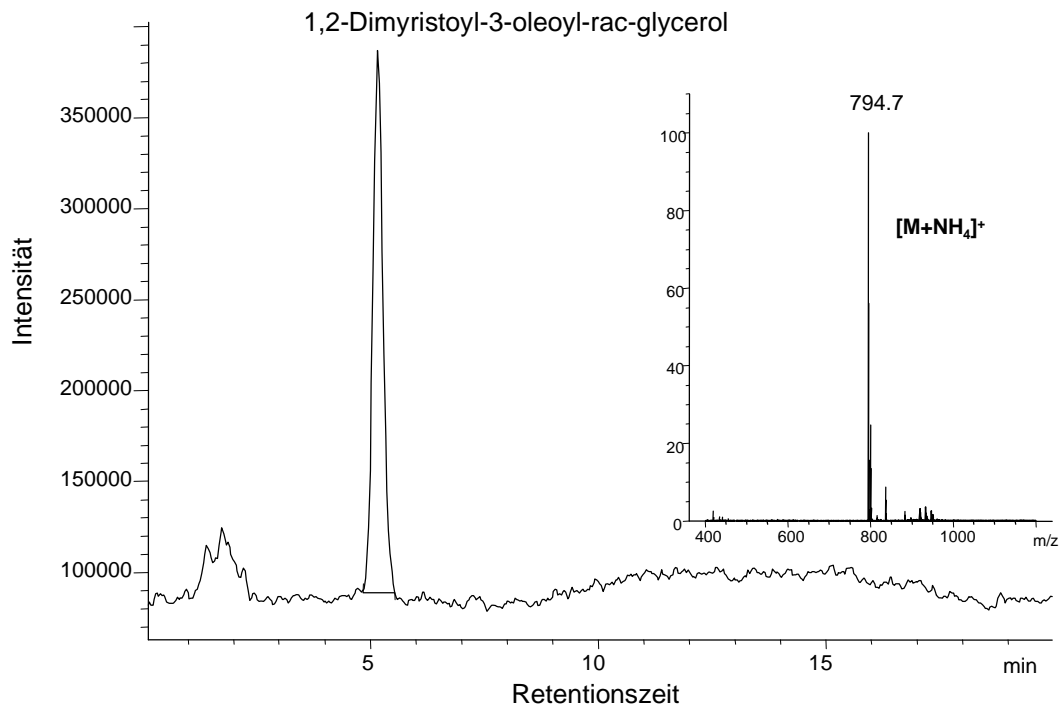
Triglycerid EiEiEi; Bruttoretenionszeit = 8.918 min; Konzentration = 19.76 µg/ml;
Injektionsvolumen 5 µl

**TIC und MS 9-13.**

Triglycerid PoPoPo; Bruttoretenionszeit = 4.743 min; Konzentration = 19.40 µg/ml;
Injektionsvolumen 5 µl

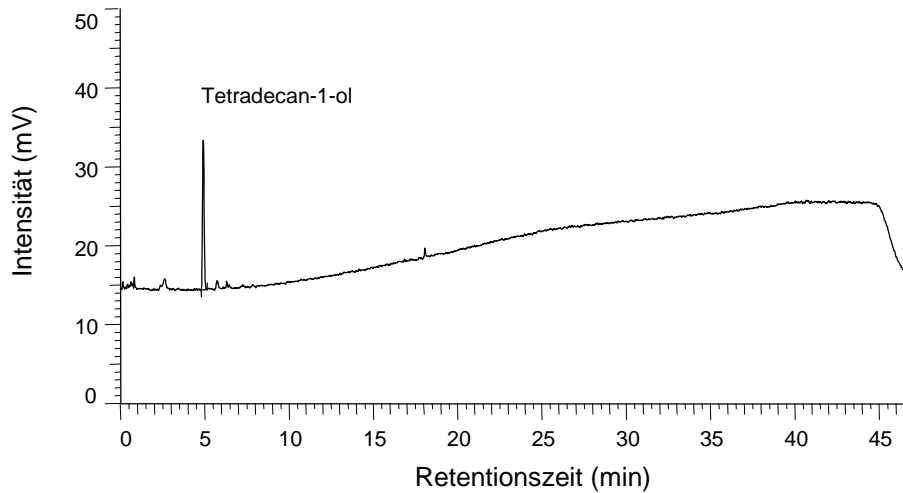
**TIC und MS 9-14.**

Triglycerid LaOP; Bruttoretentionszeit = 5.165 min; Konzentration = 29.60 µg/ml; Injektionsvolumen 5 µl

**TIC und MS 9-15.**

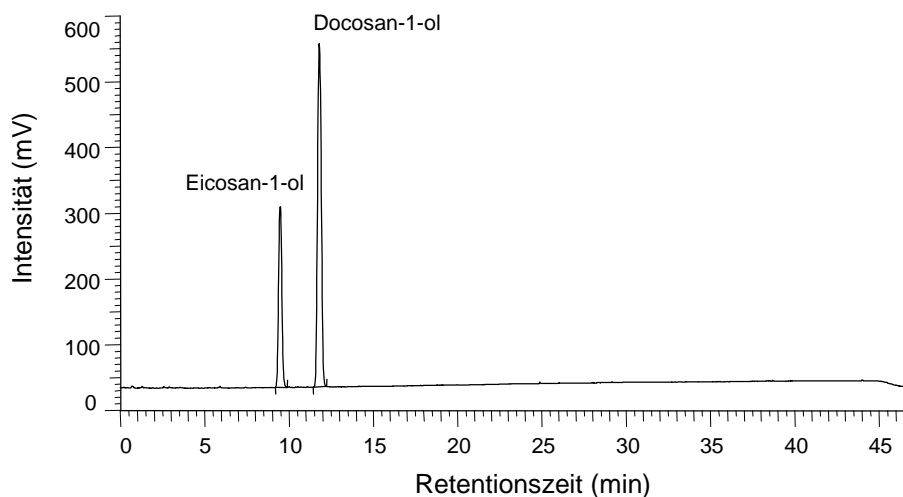
Triglycerid MMO; Bruttoretentionszeit = 5.161 min; Konzentration = 23.20 µg/ml; Injektionsvolumen 5 µl

9.3.3 HPLC-ELSD-Chromatogramme neutraler Lipide und kosmetischer Rohstoffe



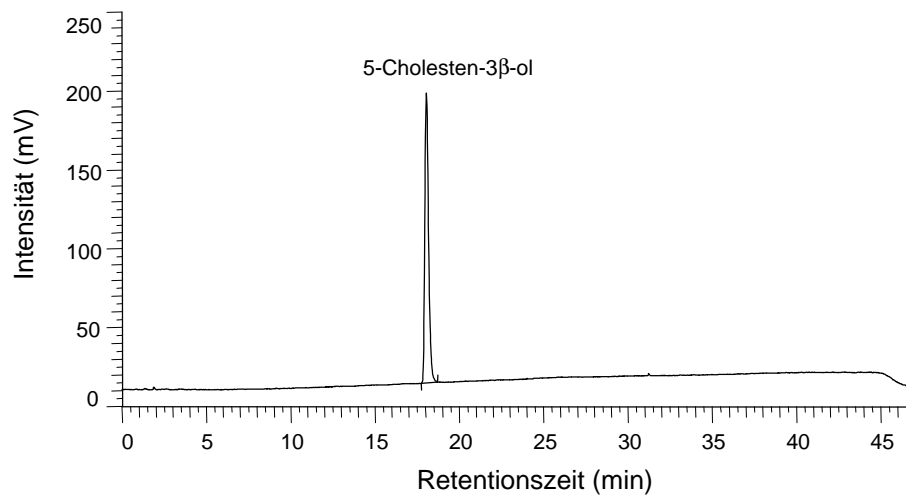
Chromatogramm 9-14.

Rohstoff Myristylalkohol; $t_B = 4.92$ min; Konzentration = 0.265 mg/ml; Injektionsvolumen 20 μ l

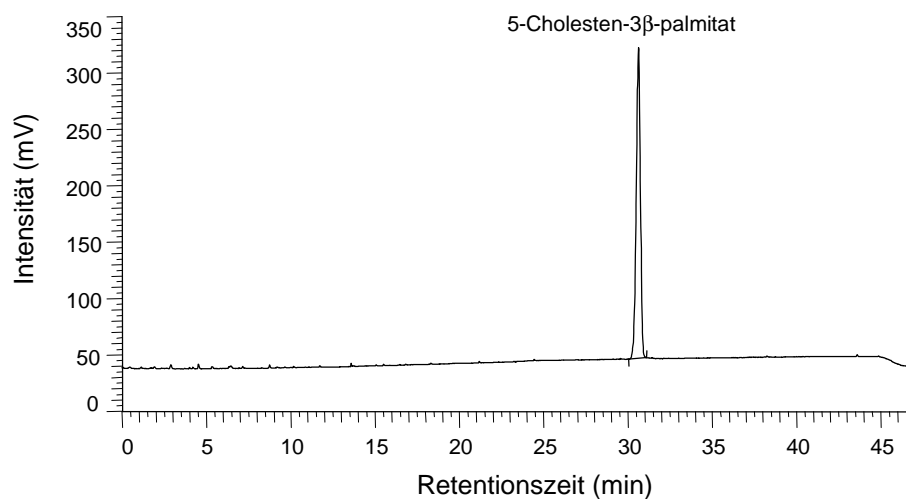


Chromatogramm 9-15.

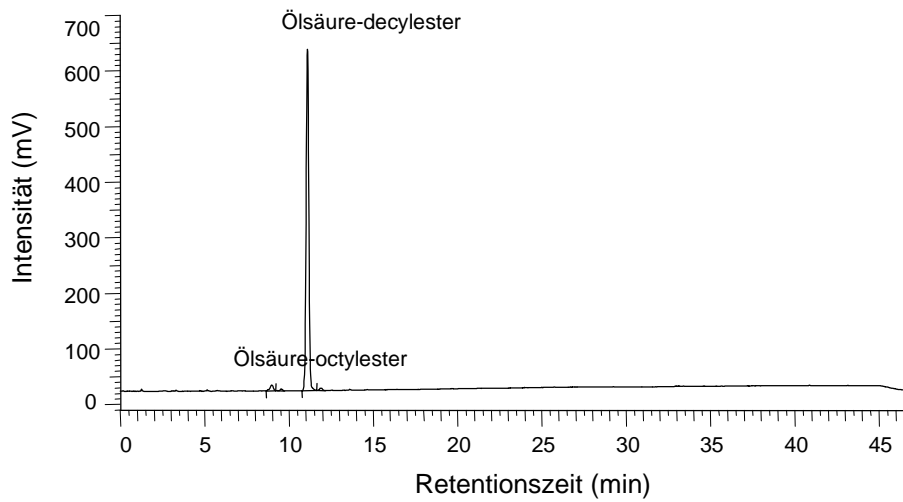
Standardmischung aus Arachidylalkohol und Behenylalkohol. Arachidylalkohol ($t_B = 9.49$ min, $c = 0.1135$ mg/ml), Behenylalkohol ($t_B = 11.81$ min, $c = 0.162$ mg/ml), Injektionsvolumen 20 μ l

**Chromatogramm 9-16.**

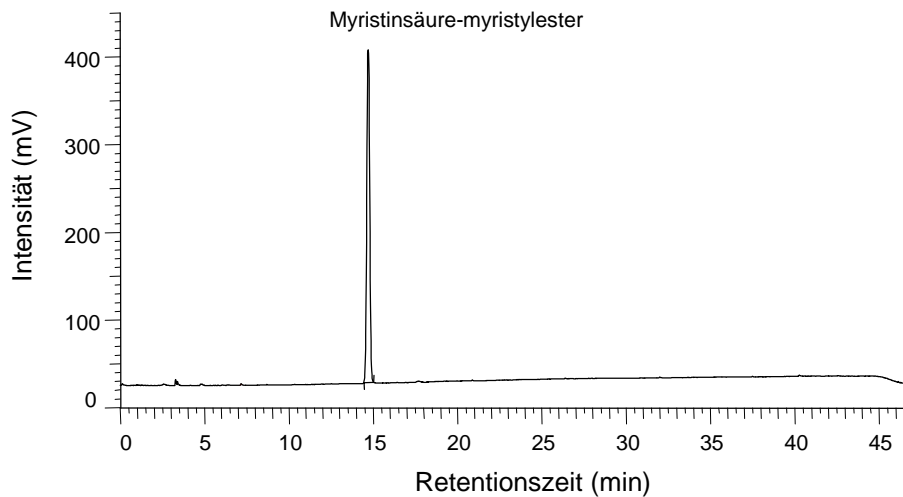
Rohstoff Cholesterol; $t_B = 18.04$ min, Konzentration = 0.273 mg/ml, Injektionsvolumen = 20 μ l

**Chromatogramm 9-17.**

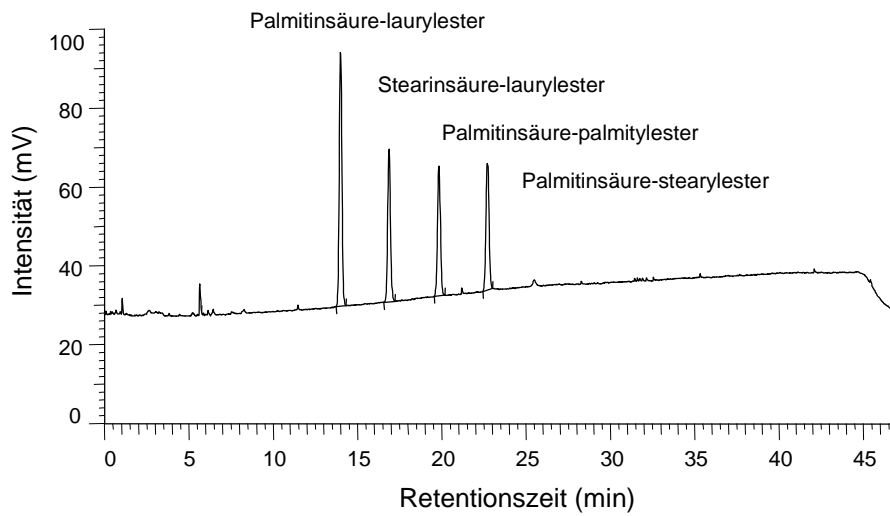
Standard Cholesterylpalmitat; $t_B = 30.63$ min; Konzentration = 0.277 mg/ml; Injektionsvolumen = 20 μ l

**Chromatogramm 9-18.**

Rohstoff Decyl Oleate; $c_{\text{gesamt}} = 0.2285 \text{ mg/ml}$, t_B (Ölsäure-octylester) = 8.99 min, t_B (Ölsäure-decylester) = 11.11 min, Injektionsvolumen = 20 μl

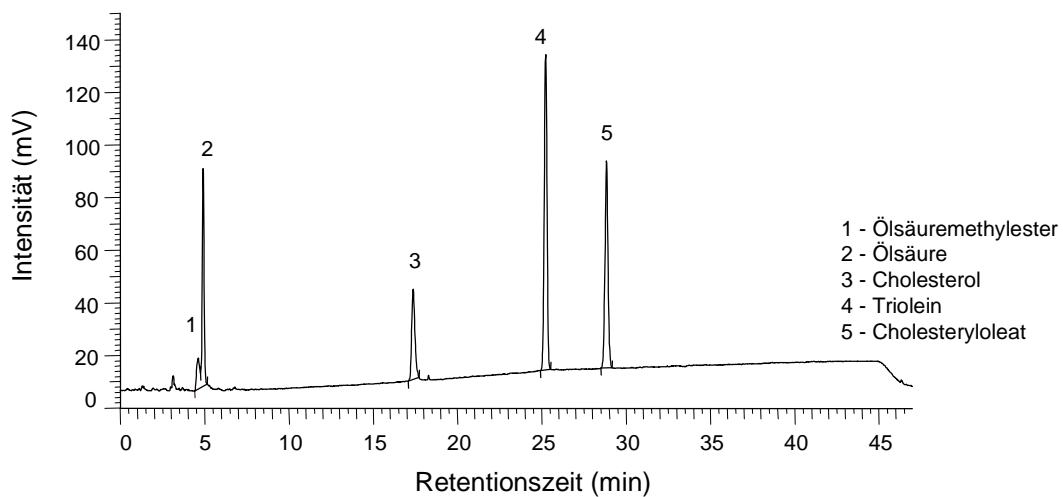
**Chromatogramm 9-19.**

Rohstoff Myristyl Myristate; $t_B = 14.69 \text{ min}$, Konzentration = 0.1175 mg/ml; Injektionsvolumen = 20 μl



Chromatogramm 9-20.

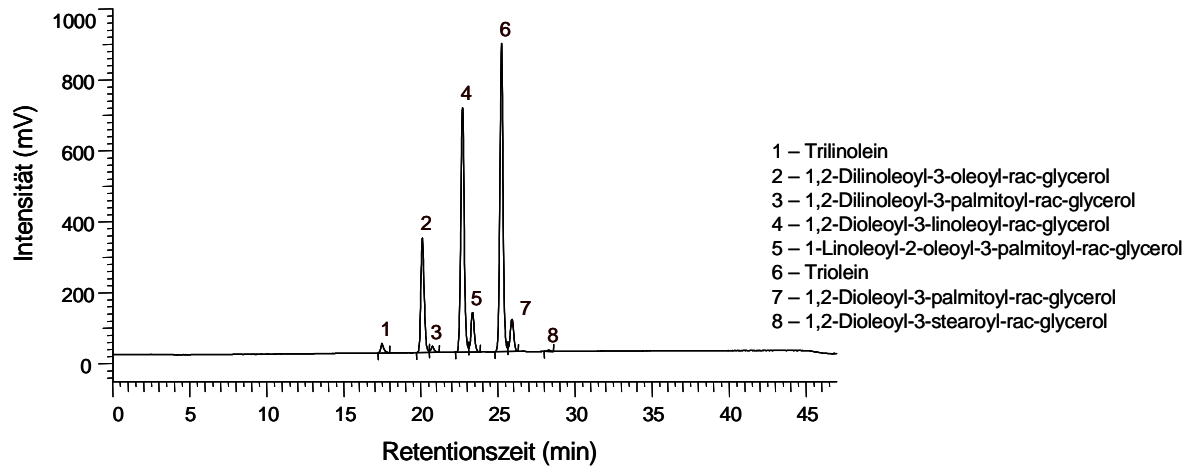
Rohstoff Cetyl Palmitate; $c_{\text{gesamt}} = 0.2035 \text{ mg/ml}$; t_B (Palmitinsäure-laurylester) = 14.00 min, t_B (Stearinsäure-laurylester) = 16.88 min, t_B (Palmitinsäure-palmitylester) = 19.85 min, t_B (Palmitinsäure-stearylester) = 22.71 min, Injektionsvolumen = 20 μl



Chromatogramm 9-21.

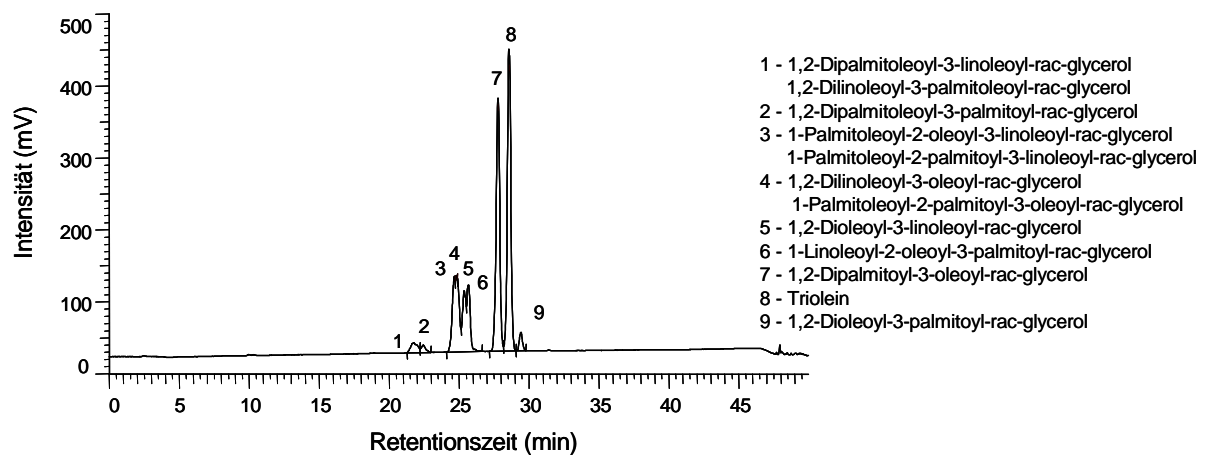
Standard Lipid-Mix; $c_{\text{gesamt}} = 0.500 \text{ mg/ml}$; $t_{B1} = 4.64 \text{ min}$, $t_{B2} = 4.92 \text{ min}$, $t_{B3} = 17.37 \text{ min}$, $t_{B4} = 25.22 \text{ min}$, $t_{B5} = 28.84 \text{ min}$, Injektionsvolumen = 20 μl

9.3.4 HPLC-ELSD-Chromatogramme der Fette, Öle und Wachse



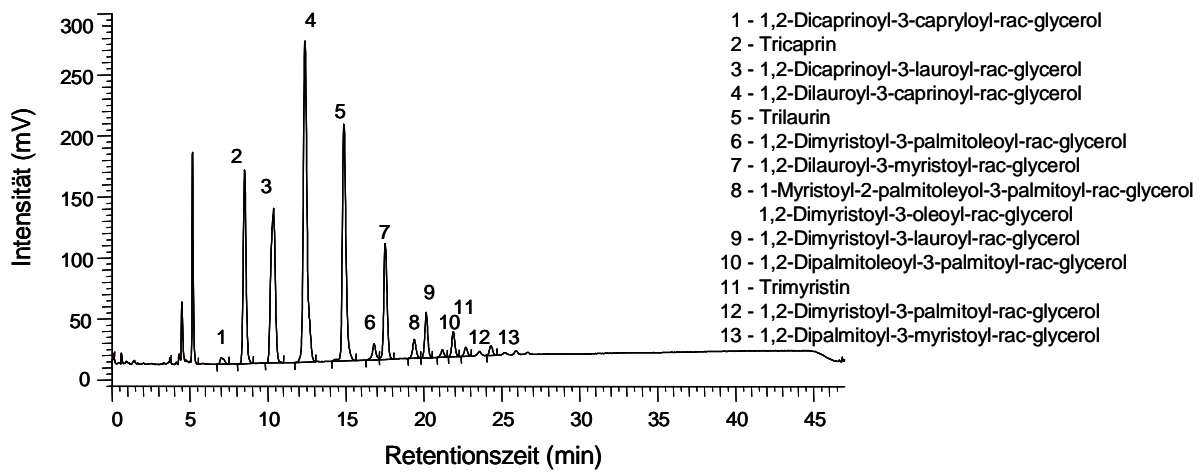
Chromatogramm 9-22.

Chromatographische Trennung von Aprikosenkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.949 mg/ml



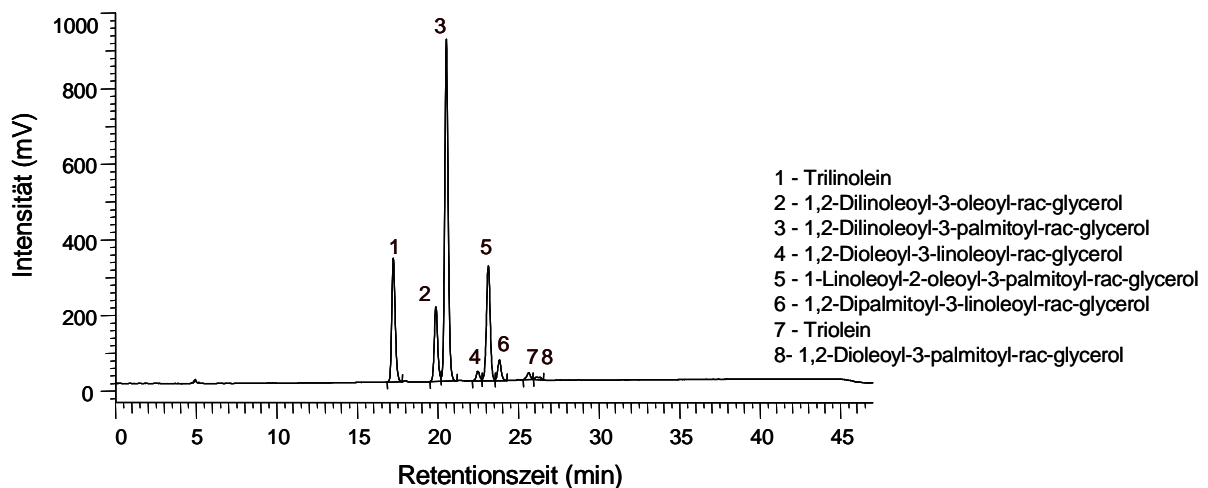
Chromatogramm 9-23.

Chromatographische Trennung von Avocadoöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 1.074 mg/ml



Chromatogramm 9-24.

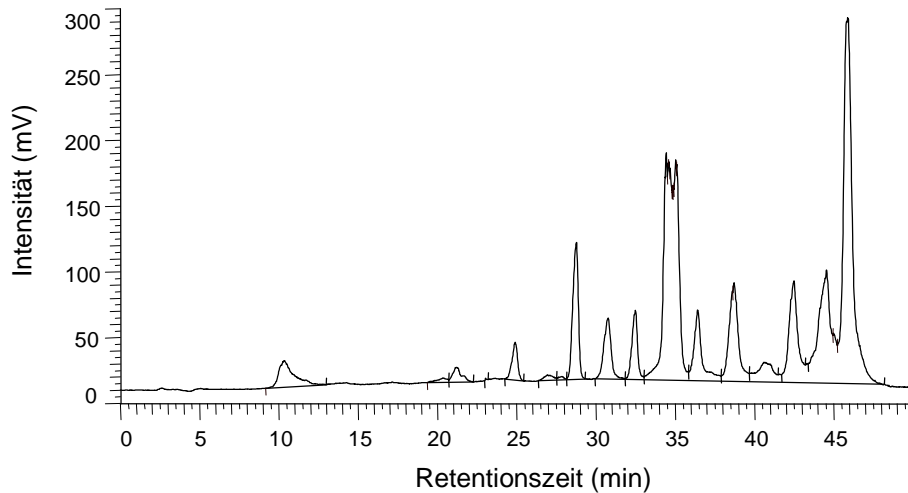
Chromatographische Trennung von Babassuöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.781 mg/ml



Chromatogramm 9-25.

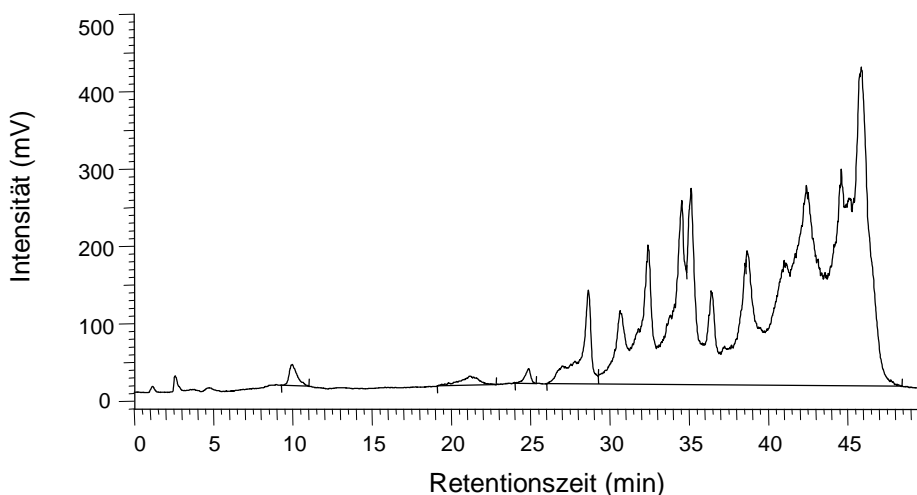
Chromatographische Trennung von Baumwollsaamenöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.994 mg/ml

Die folgenden 3 Chromatogramme zeigen verschiedene Chargen von Bienenwachs. Bienenwachs besteht aus ca. 70 Estern von C₁₆- bis C₃₆- Säuren und C₂₄- bis C₃₆- Alkoholen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Rohstoffen sind sichtbar. Die Rohstoffe wurden in Chloroform gelöst.



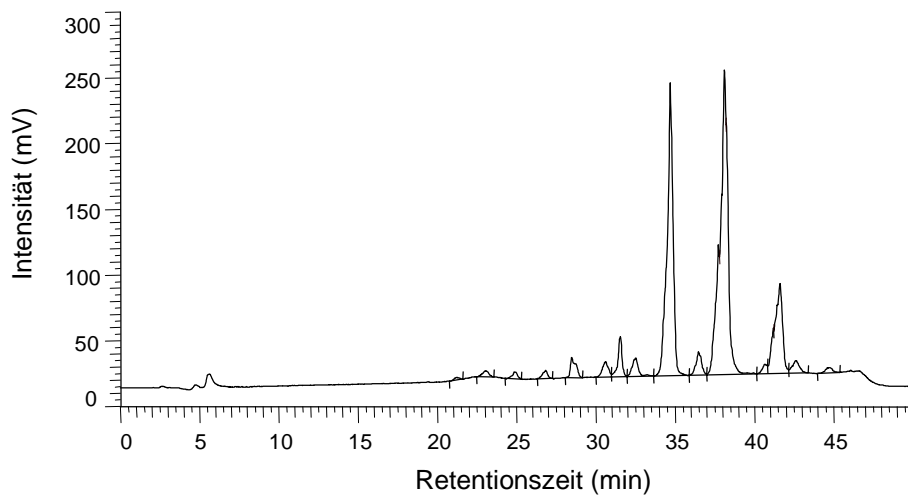
Chromatogramm 9-26.

Chromatographische Trennung von natürlichem Bienenwachs (Bienenwachs gelb) mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 1.254 mg/ml



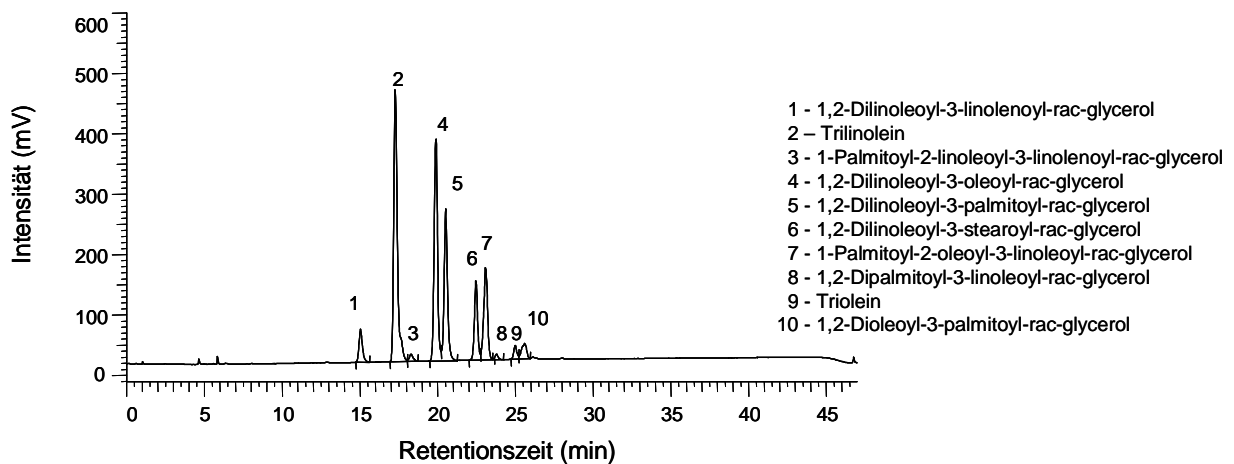
Chromatogramm 9-27.

Chromatographische Trennung von natürlichem Bienenwachs (Perle Natur) mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 1.128 mg/ml



Chromatogramm 9-28.

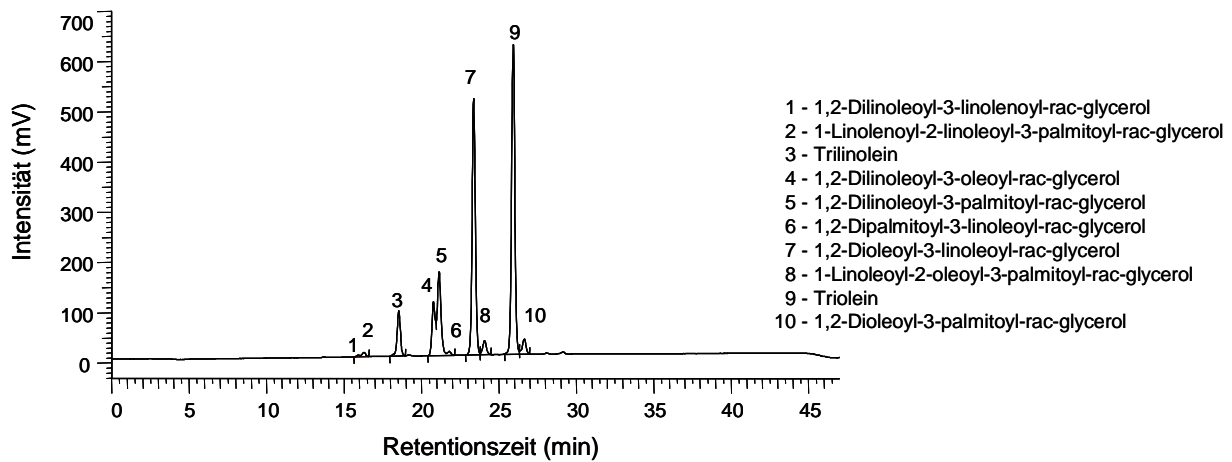
Chromatographische Trennung von synthetischem Bienenwachs mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm). Konzentration = 1.285 mg/ml



Chromatogramm 9-29.

Chromatographische Trennung von Calendulaöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 1.042 mg/ml

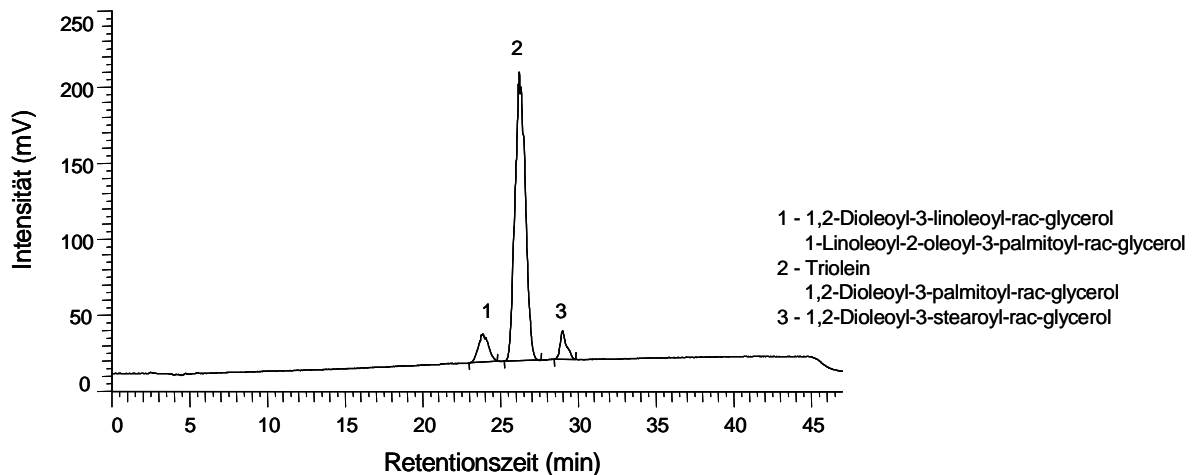
Das Calendulaöl setzt sich aus den gleichen Triglyceriden wie Sojaöl zusammen, da aus der Calendula-Pflanze ölige Extrakte (mit Sojaöl) gewonnen wurden.



Chromatogramm 9-30.

Chromatographische Trennung von Canola Öl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.872 mg/ml

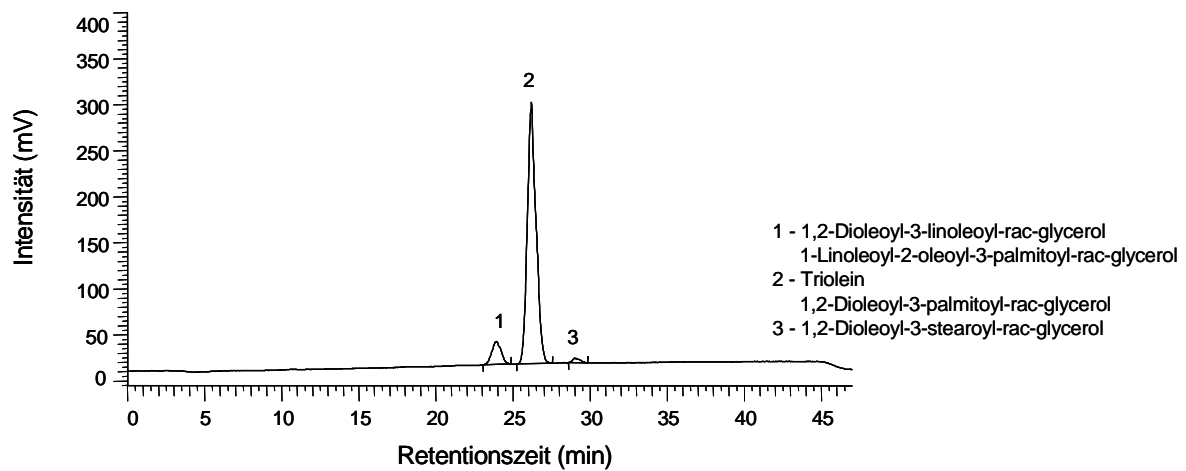
Das Canola Öl (Lipex 120) ist ein raffiniertes, gebleichtes und desodoriertes pflanzliches Öl aus den Samen der Pflanze *Brassica napus* oder *campestris*. Es ist unter dem Namen Canola oil oder Rapeseed oil (Rüböl, Rapsöl) bekannt.



Chromatogramm 9-31.

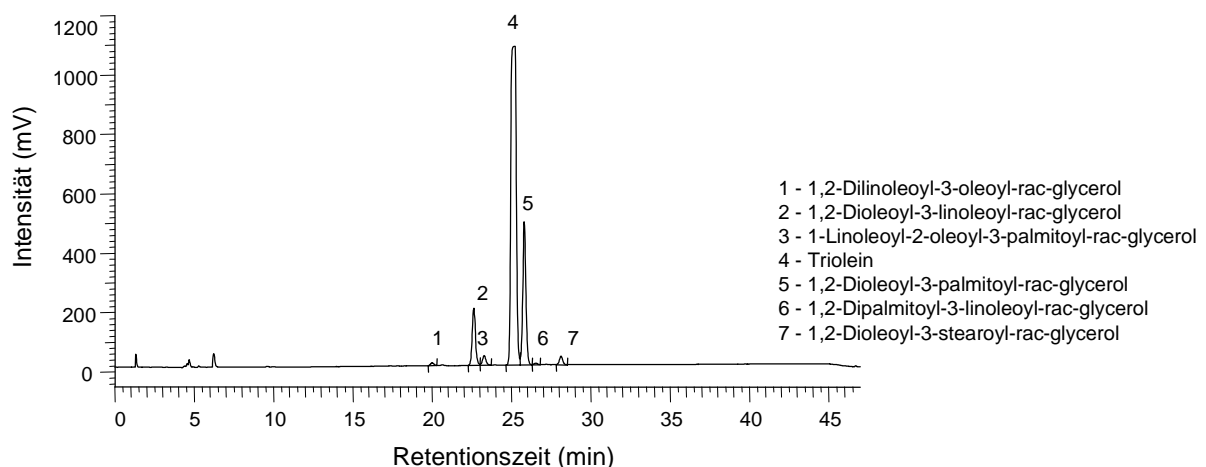
Chromatographische Trennung von Canola Öl petitioned mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.597 mg/ml

Canola Öl petitioned (Akorex L) ist ein partiell hydriertes, desodoriertes pflanzliches Öl aus den Samen der Pflanze *Brassica napus* oder *campestris*.



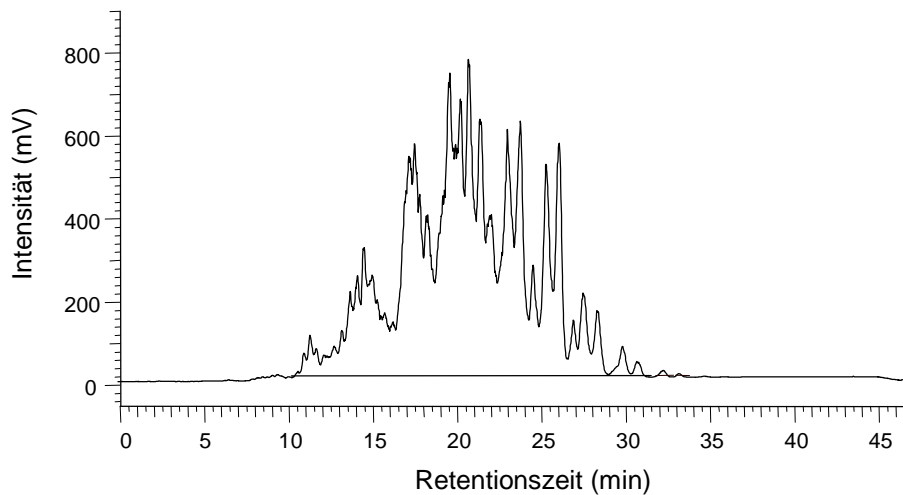
Chromatogramm 9-32.

Chromatographische Trennung von Canola Öl unsaponifiablen mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.640 mg/ml Canola Öl unsaponifiablen (Lipex Canola-U) ist sich ein raffiertes, fraktioniertes und desodoriertes pflanzliches Öl aus den Samen der Pflanze Brassica napus oder campestris.



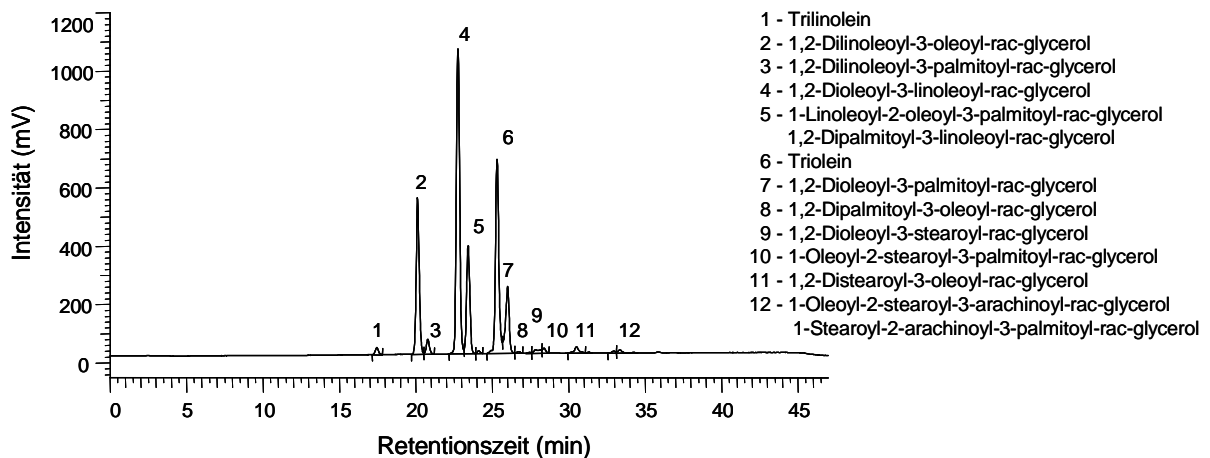
Chromatogramm 9-33.

Chromatographische Trennung von Camellia Öl (Sasanqua Öl) mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.981 mg/ml



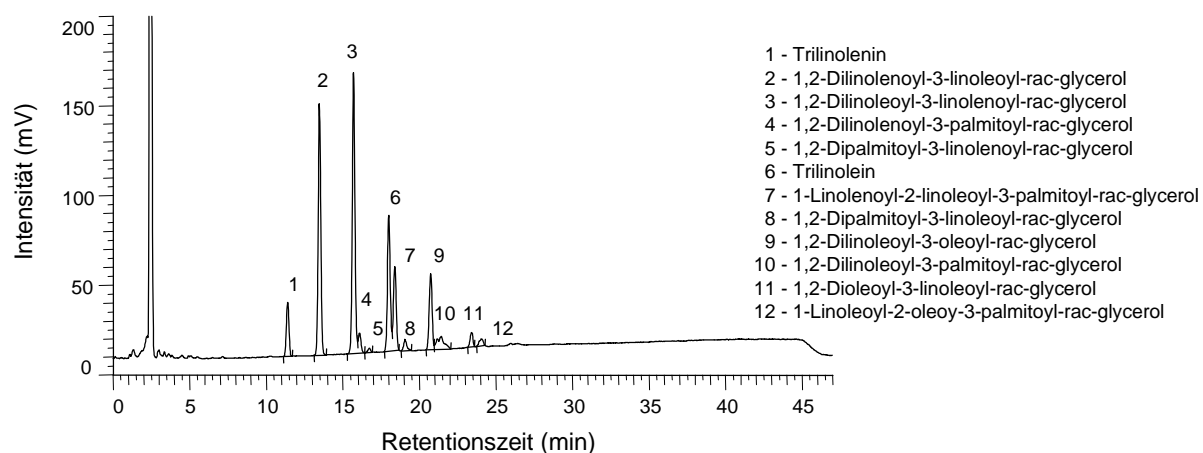
Chromatogramm 9-34.

Chromatographische Trennung von Dorschlebertran mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 8.05 mg/ml



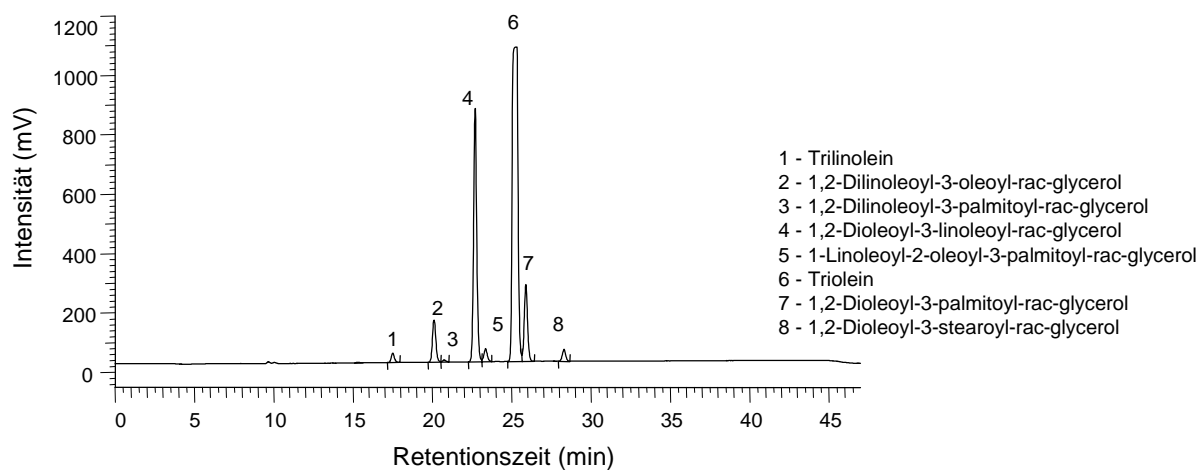
Chromatogramm 9-35.

Chromatographische Trennung von Erdnussöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 1.337 mg/ml



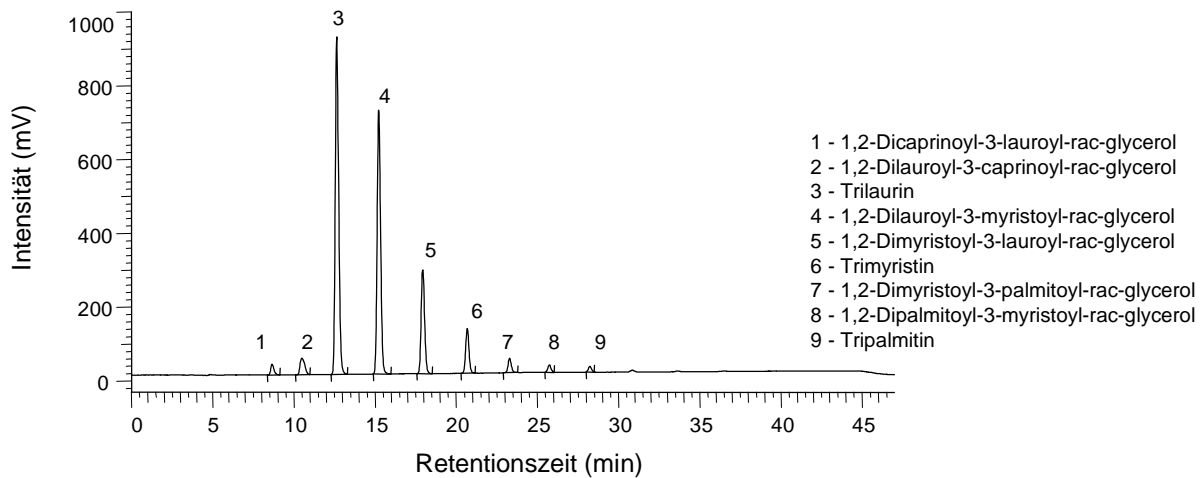
Chromatogramm 9-36.

Chromatographische Trennung von Hagebuttenkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μ m (250*4 mm), Konzentration = 0.415 mg/ml



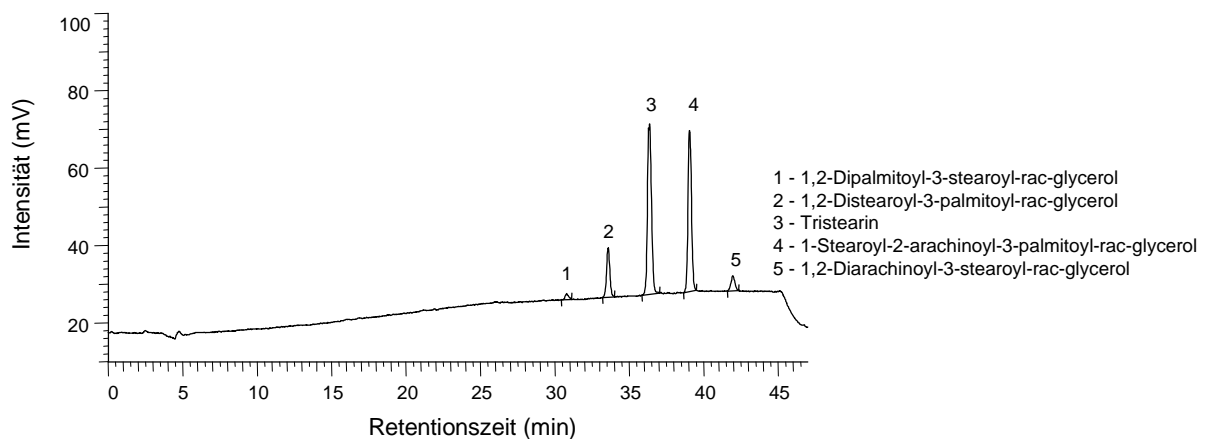
Chromatogramm 9-37.

Chromatographische Trennung von Haselnussöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μ m (250*4 mm), Konzentration = 1.181 mg/ml



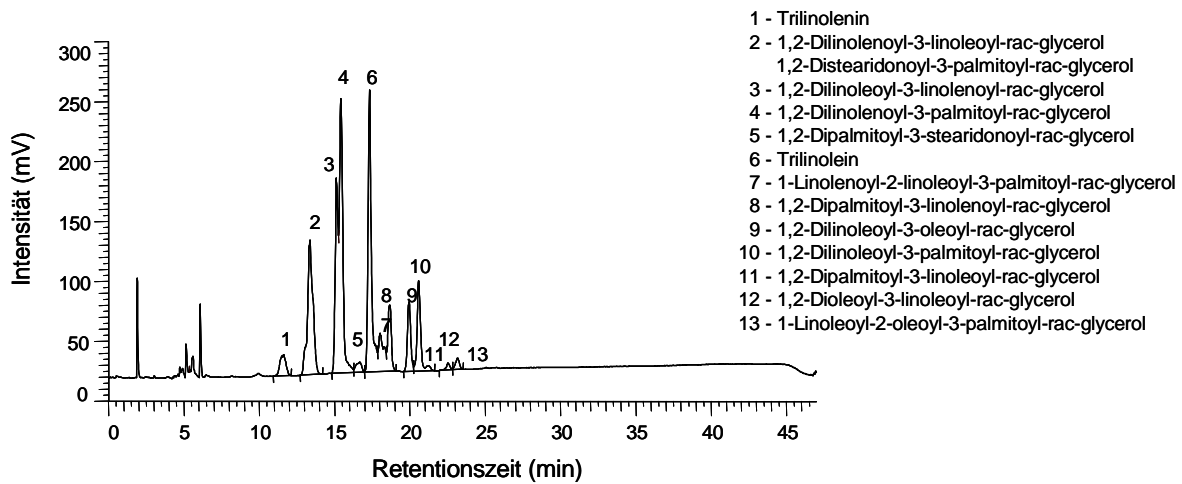
Chromatogramm 9-38.

Chromatographische Trennung von hydriertem Palmkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.898 mg/ml Hydriertes Palmkernöl (Lipex 402) ist ein fraktioniertes, hydriertes und desodoriertes Palmkernöl.



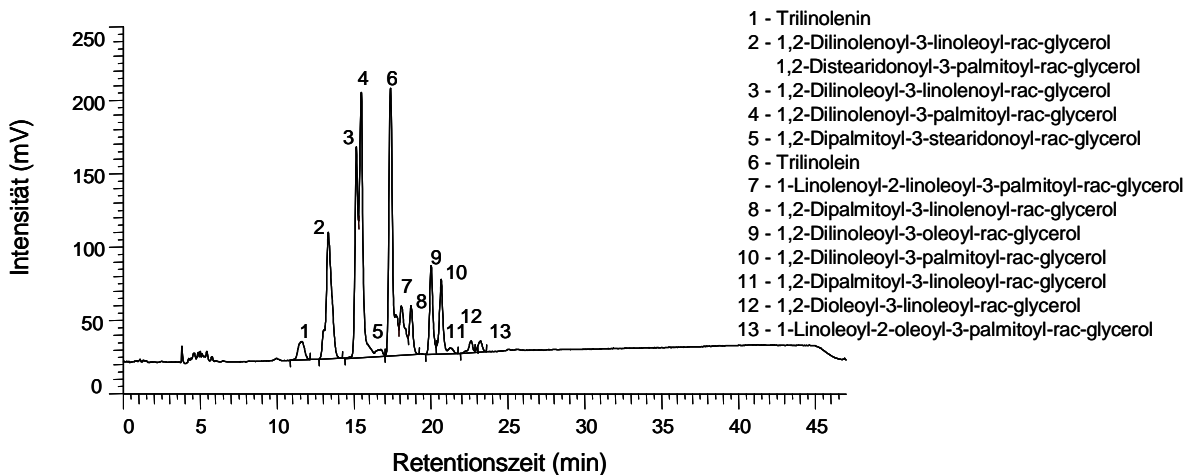
Chromatogramm 9-39.

Chromatographische Trennung von hydriertem Rapsöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 1.200 mg/ml Hydriertes Rapsöl (Akofine R) ist ein voll gesättigtes, desodoriertes Raps- oder Rüböl.



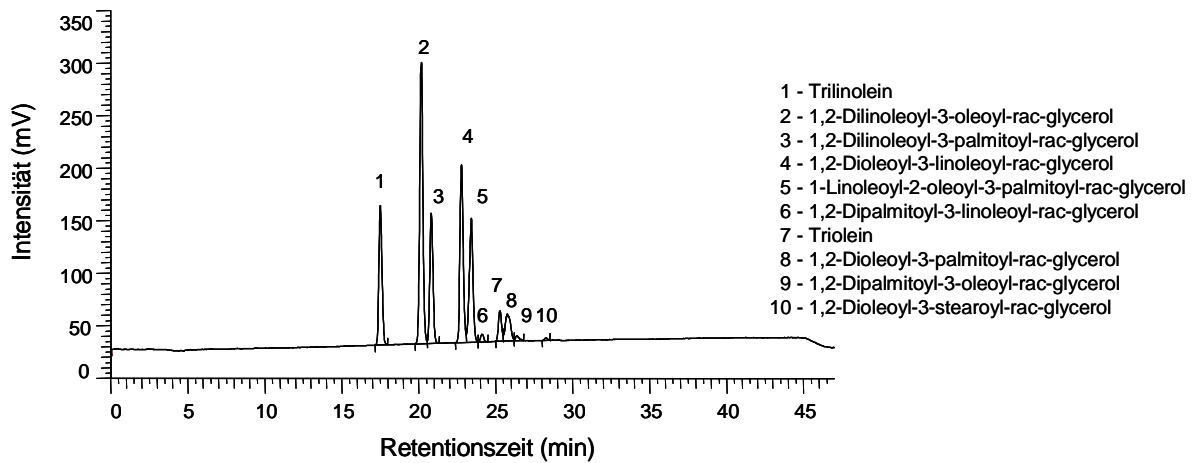
Chromatogramm 9-40.

Chromatographische Trennung von Johannesbeeroil mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.921 mg/ml
 Johannesbeeroil enthält anstatt der Linolensäure (cis-9,12,15-Octadecatriensäure) die γ -Linolensäure (cis-6,9,12-Octadecatriensäure). Die Stearidonsäure ist eine C18-Fettsäure und enthält 4 Doppelbindungen.



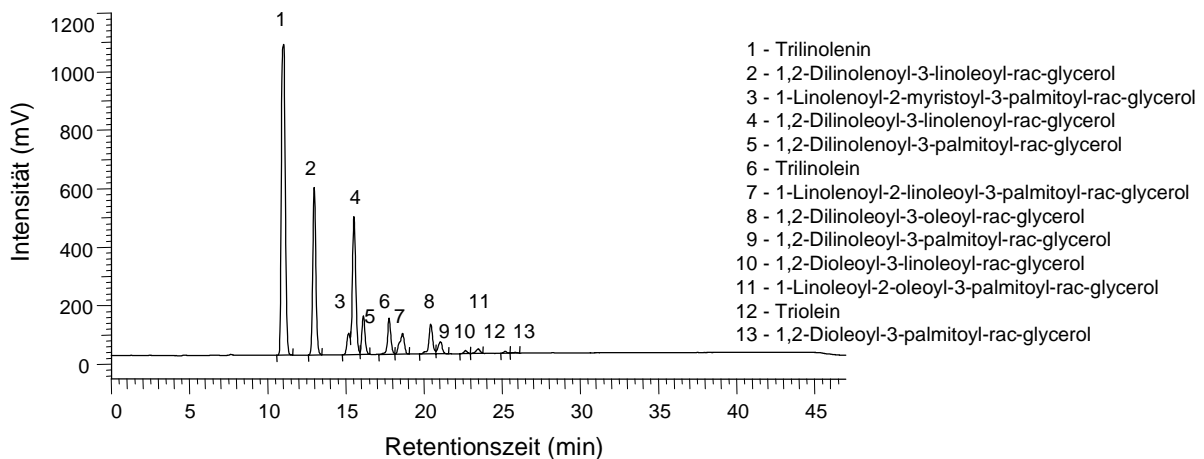
Chromatogramm 9-41.

Chromatographische Trennung von Johannesbeersamenöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.915 mg/ml
 Johannesbeersamenöl enthält anstatt der Linolensäure die γ -Linolensäure. Die Stearidonsäure ist eine C18-Fettsäure und enthält 4 Doppelbindungen.



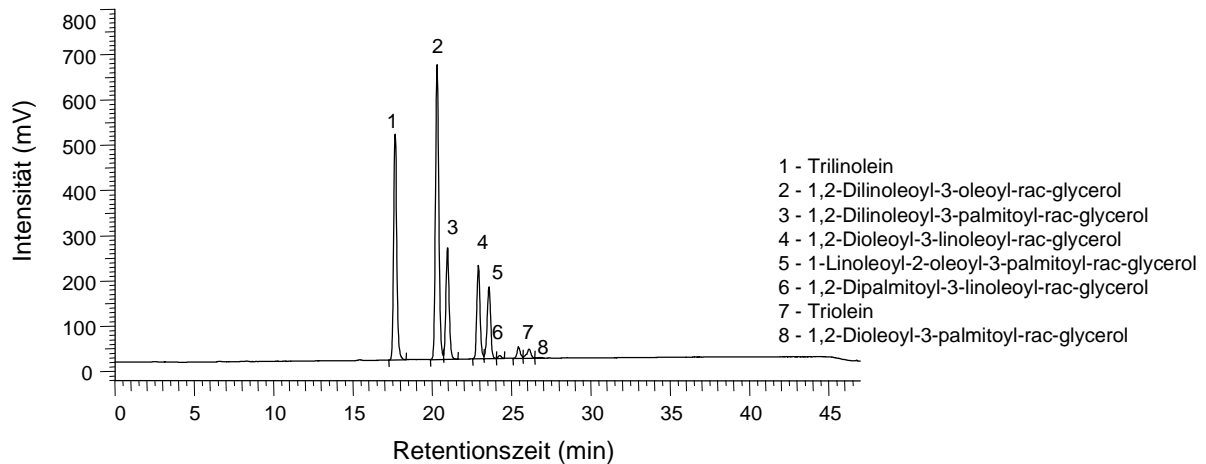
Chromatogramm 9-42.

Chromatographische Trennung von Kürbiskernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.707 mg/ml



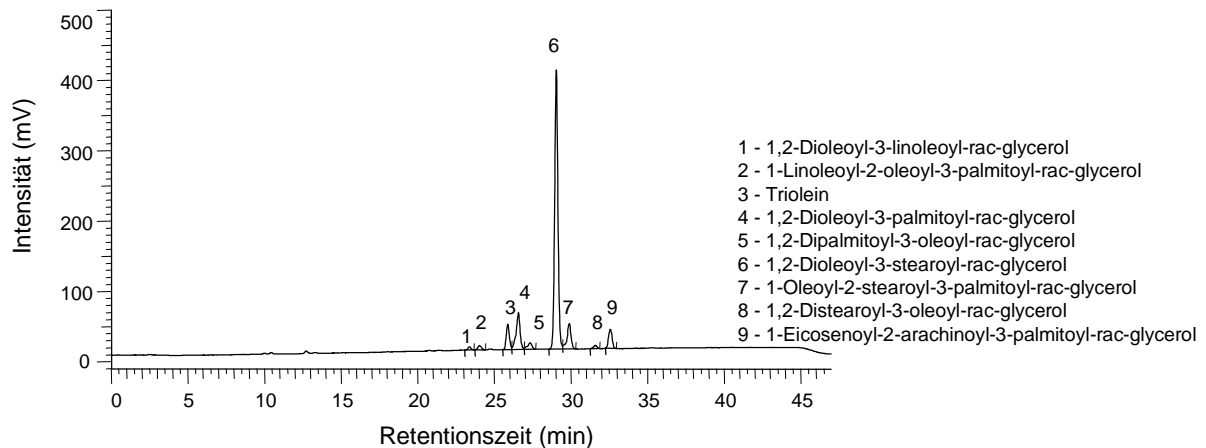
Chromatogramm 9-43.

Chromatographische Trennung von Leinöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 1.259 mg/ml



Chromatogramm 9-44.

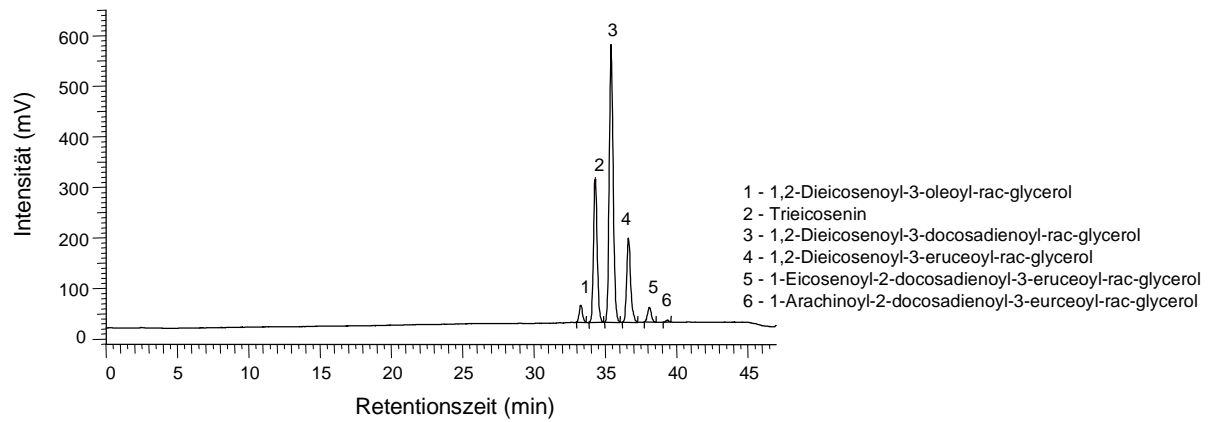
Chromatographische Trennung von Maiskeimöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.821 mg/ml



Chromatogramm 9-45.

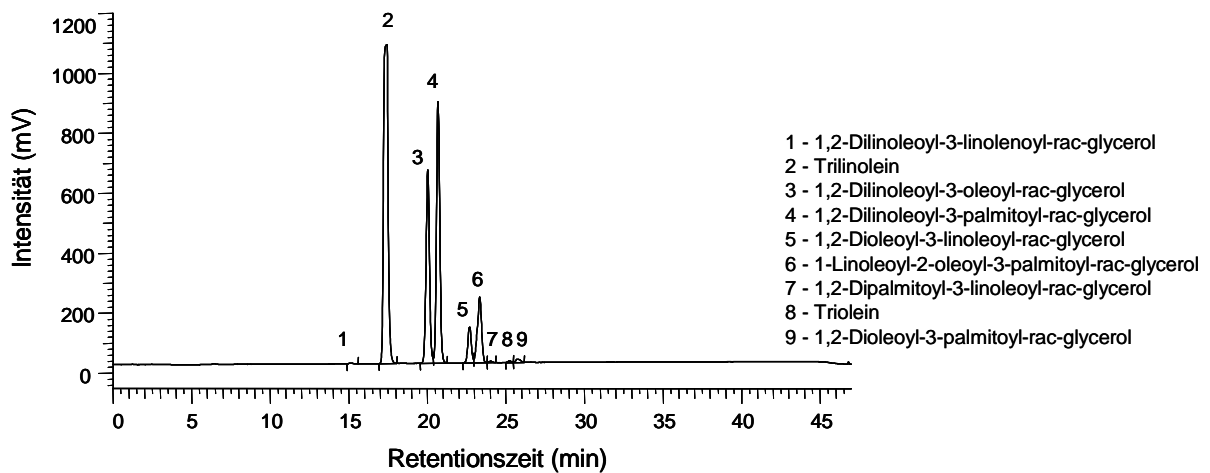
Chromatographische Trennung von Mangokernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.598 mg/ml

Mangokernöl (Lipex 203) ist ein raffiniertes, fraktioniertes und desodoriertes pflanzliches Öl, das aus der Mangofrucht (*Mangifera indica*) gewonnen wird.



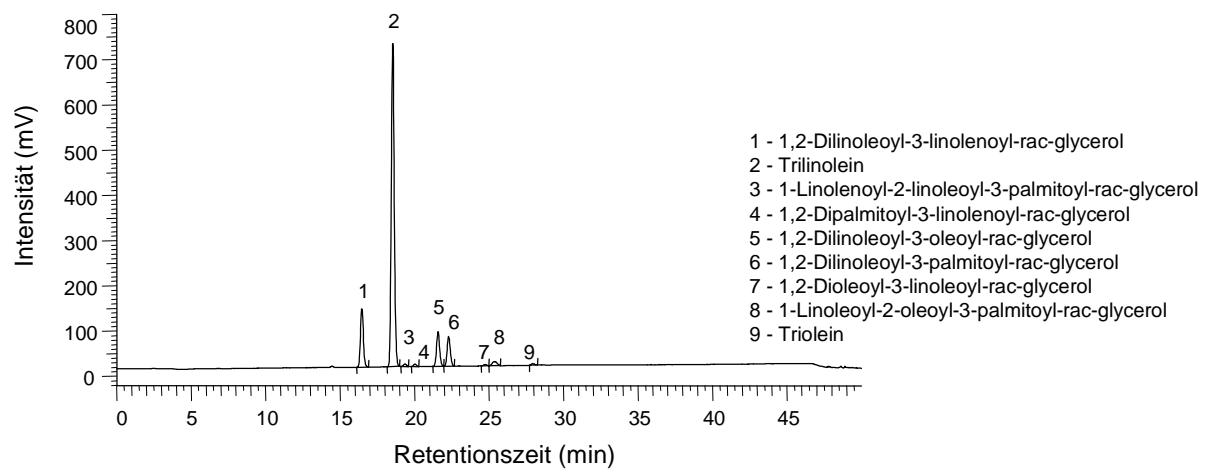
Chromatogramm 9-46.

Chromatographische Trennung von Meadowfoam Seed Oil mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μ m (250*4 mm), Konzentration = 0.777 mg/ml



Chromatogramm 9-47.

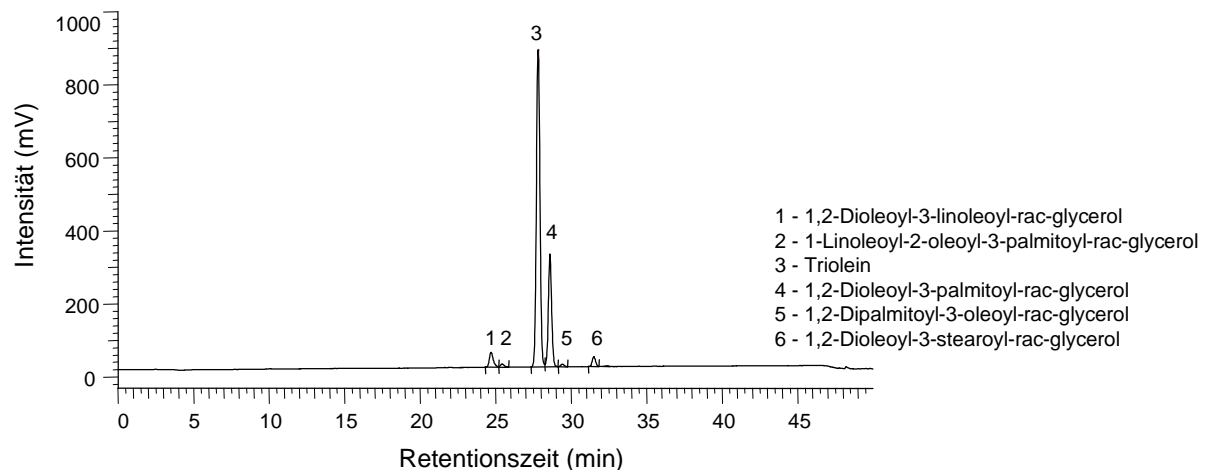
Chromatographische Trennung von Mohnöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μ m (250*4 mm), Konzentration = 1.304 mg/ml



Chromatogramm 9-48.

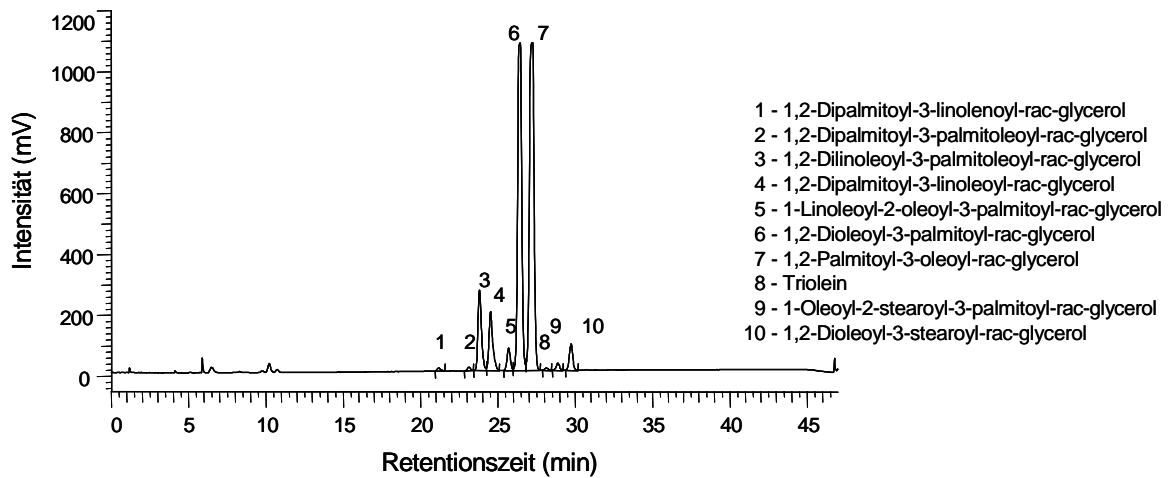
Chromatographische Trennung von Nachtkerzenöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.749 mg/ml

Im Nachtkerzenöl ist hauptsächlich γ -Linolensäure anstatt Linolensäure verestert.



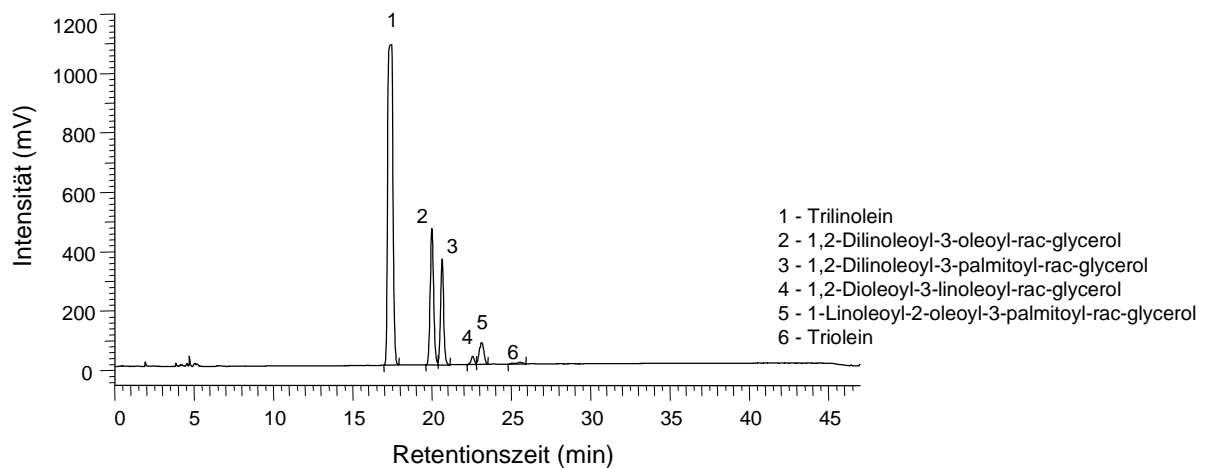
Chromatogramm 9-49.

Chromatographische Trennung von Olivenöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.806 mg/ml



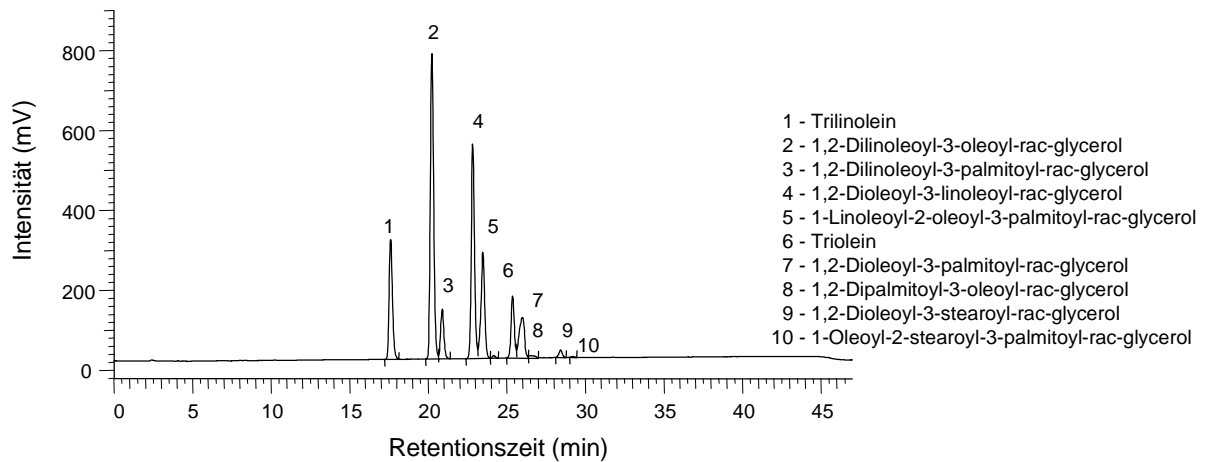
Chromatogramm 9-50.

Chromatographische Trennung von Palmöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 1.451 mg/ml



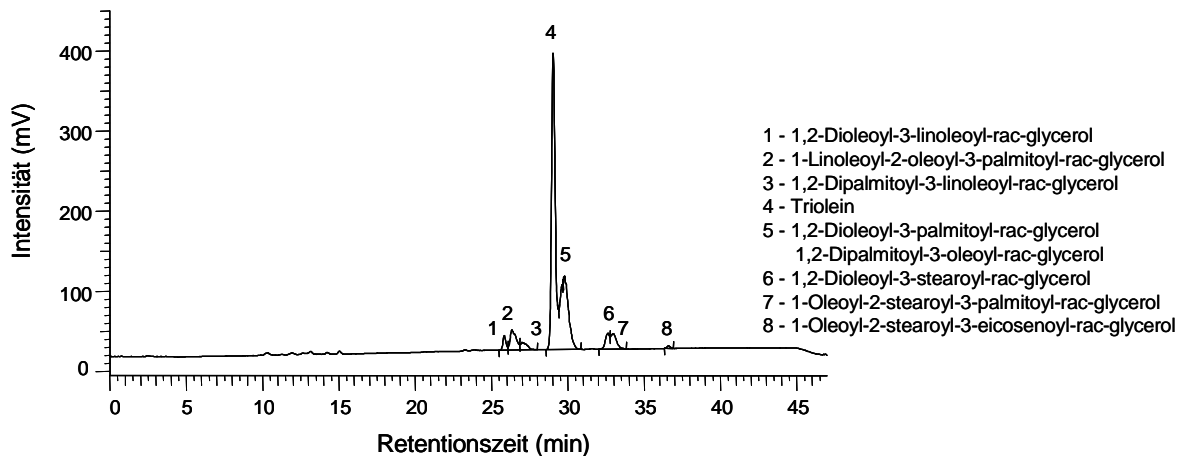
Chromatogramm 9-51.

Chromatographische Trennung von Safloröl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μm (250*4 mm), Konzentration = 0.996 mg/ml



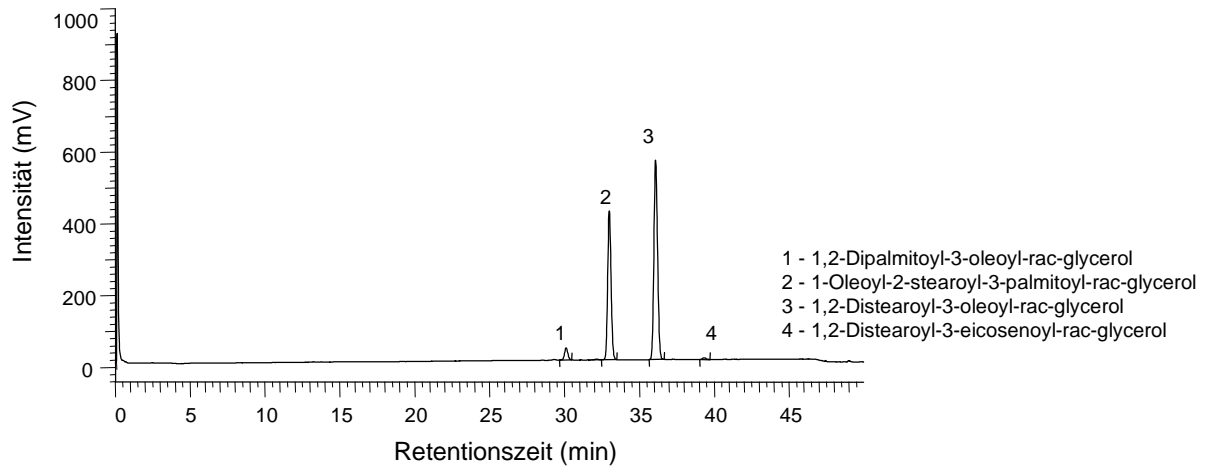
Chromatogramm 9-52.

Chromatographische Trennung von Sesamöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 1.096 mg/ml



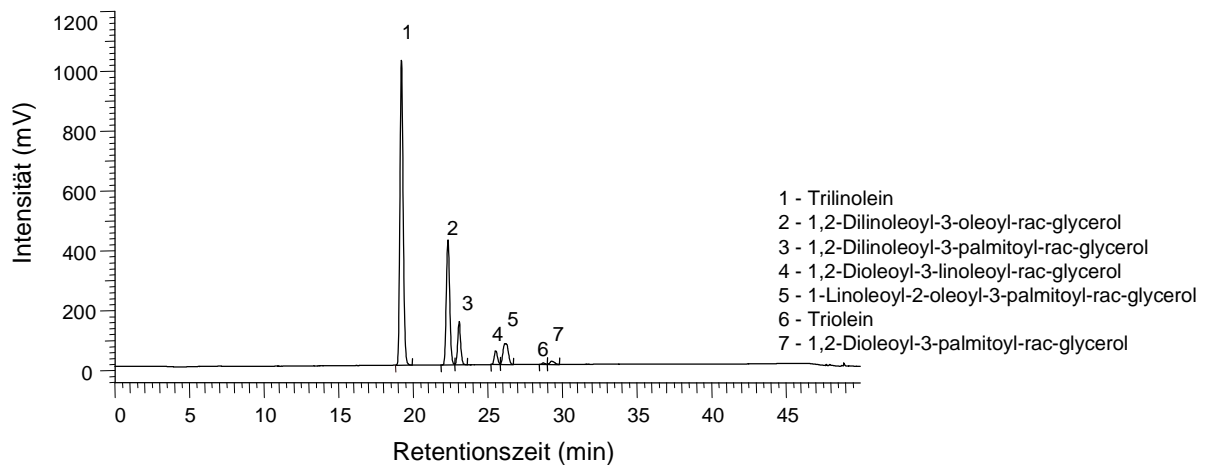
Chromatogramm 9-53.

Chromatographische Trennung von Shea Butter mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm (250*4 mm), Konzentration = 0.911 mg/ml



Chromatogramm 9-54.

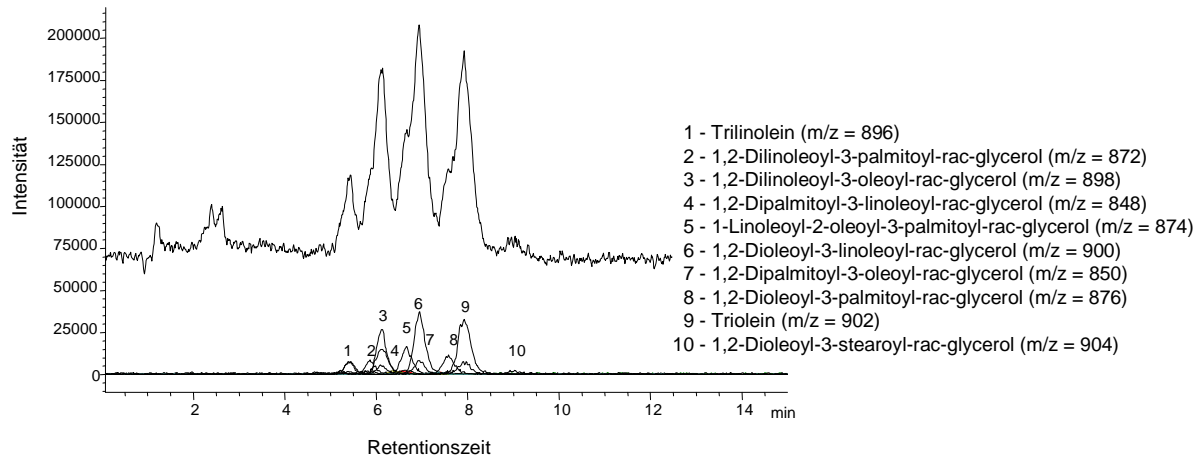
Chromatographische Trennung von Shorea Butter (Lipex 106) mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μ m (250*4 mm), Konzentration = 0.636 mg/ml



Chromatogramm 9-55.

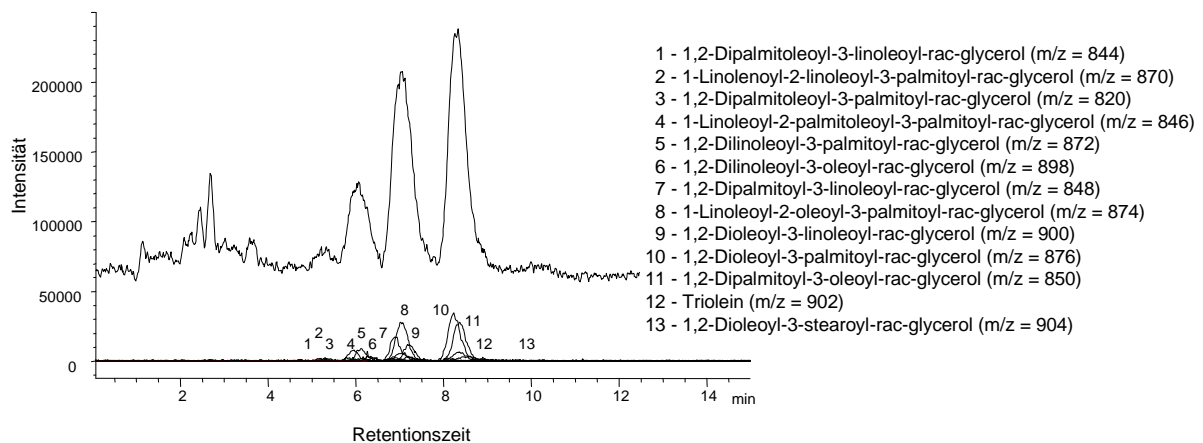
Chromatographische Trennung von Traubenkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 μ m (250*4 mm), Konzentration = 1.016 mg/ml

9.3.5 LC/MS-Darstellung der Fette, Öle und Wachse



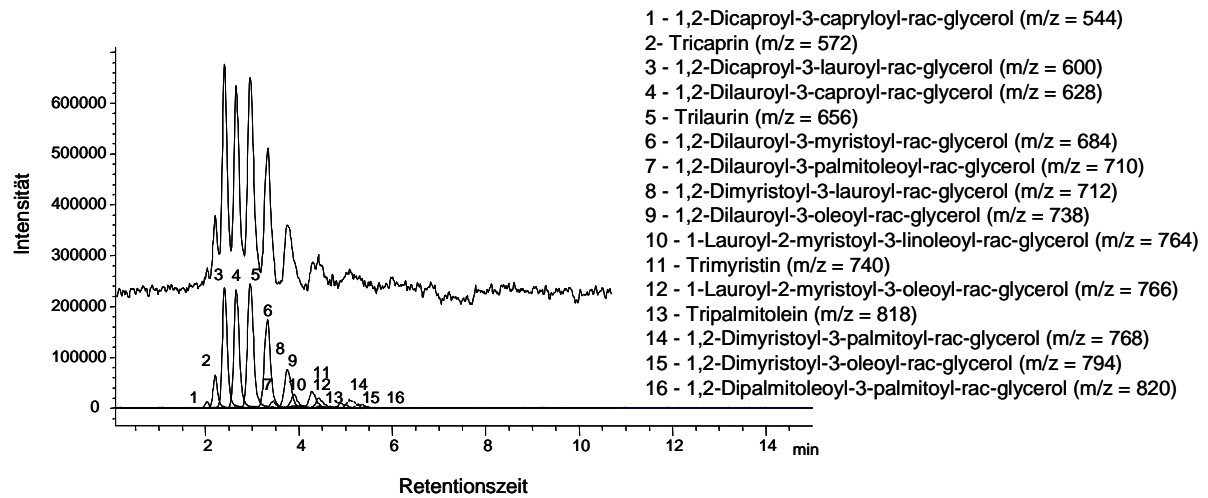
TIC und EI 9-1.

Chromatographische Trennung von Aprikosenkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.060 mg/ml



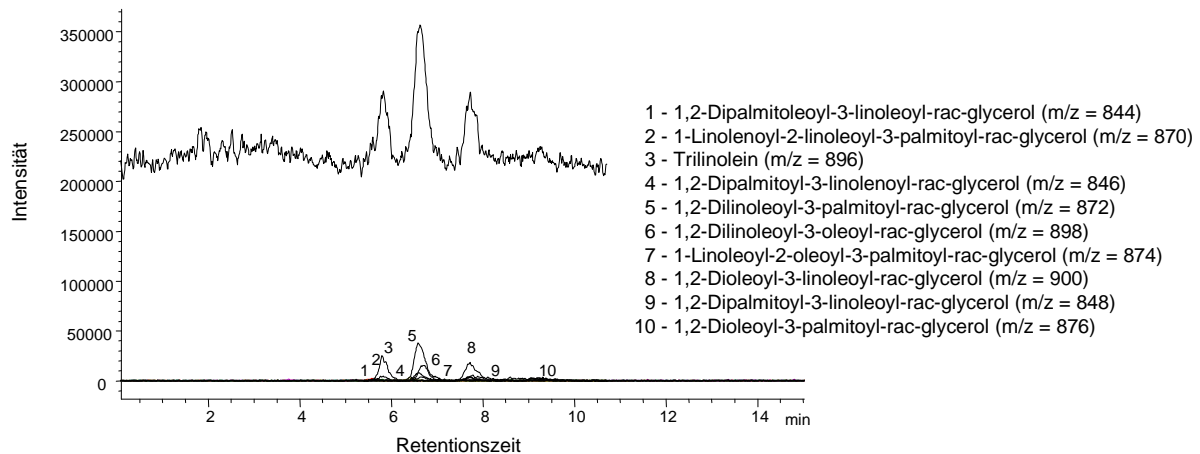
TIC und EI 9-2.

Chromatographische Trennung von Avocadoöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.074 mg/ml



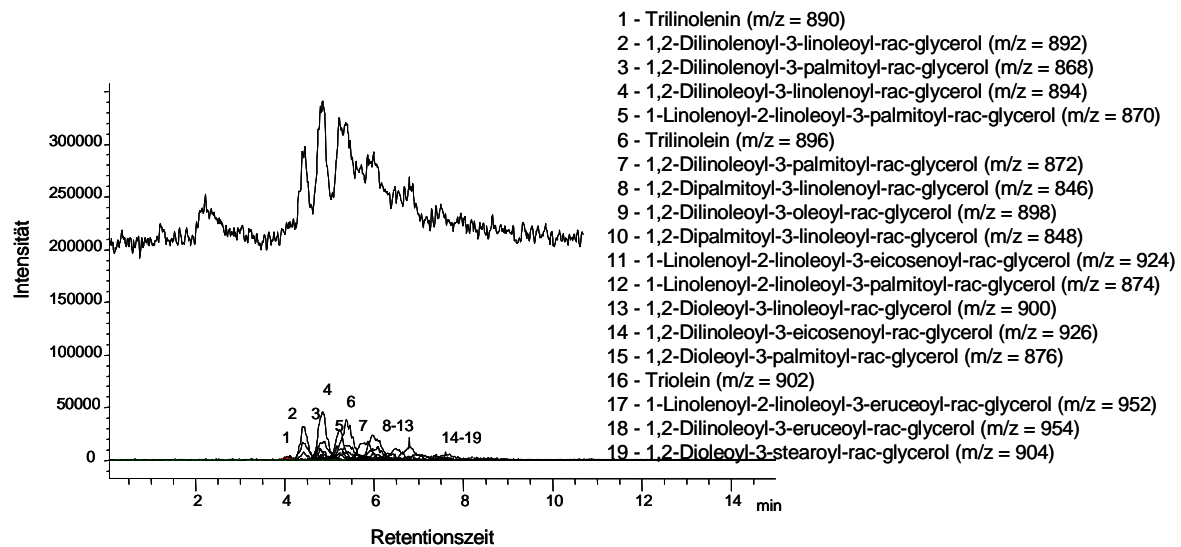
TIC und EI 9-3.

Chromatographische Trennung von Babassuöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0752 mg/ml



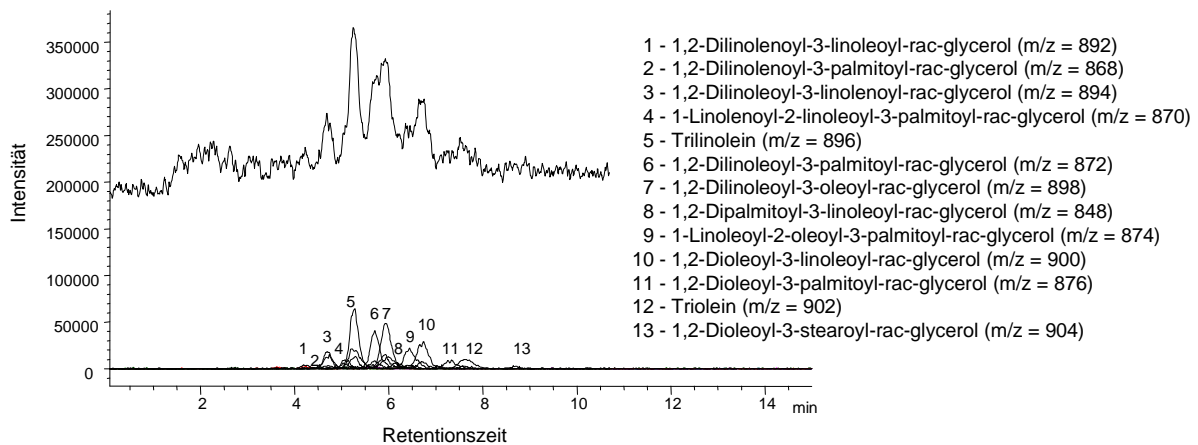
TIC und EI 9-4.

Chromatographische Trennung von Baumwollsaamenöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0616 mg/ml



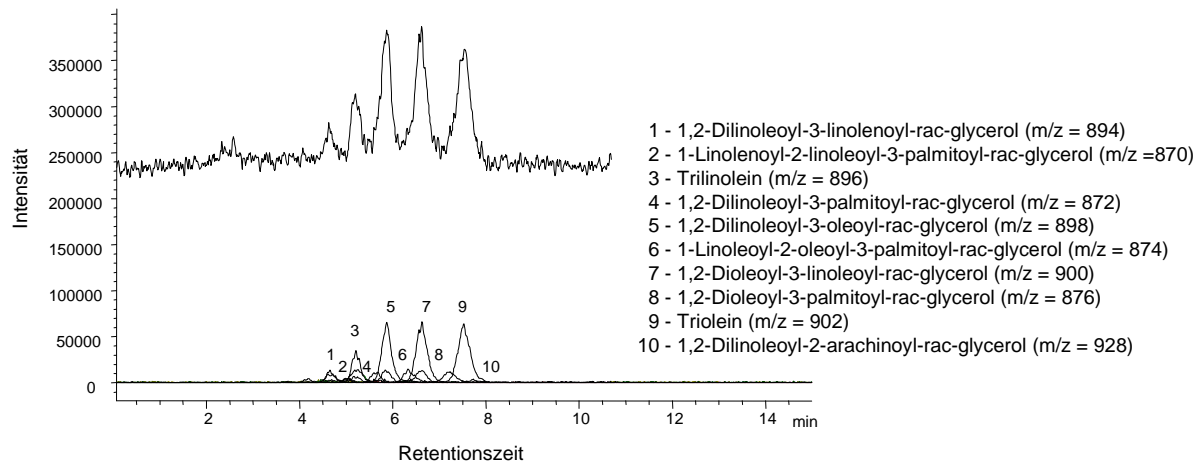
TIC und EI 9-5.

Chromatographische Trennung von Borretschöl mit der Tenssäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0816 mg/ml



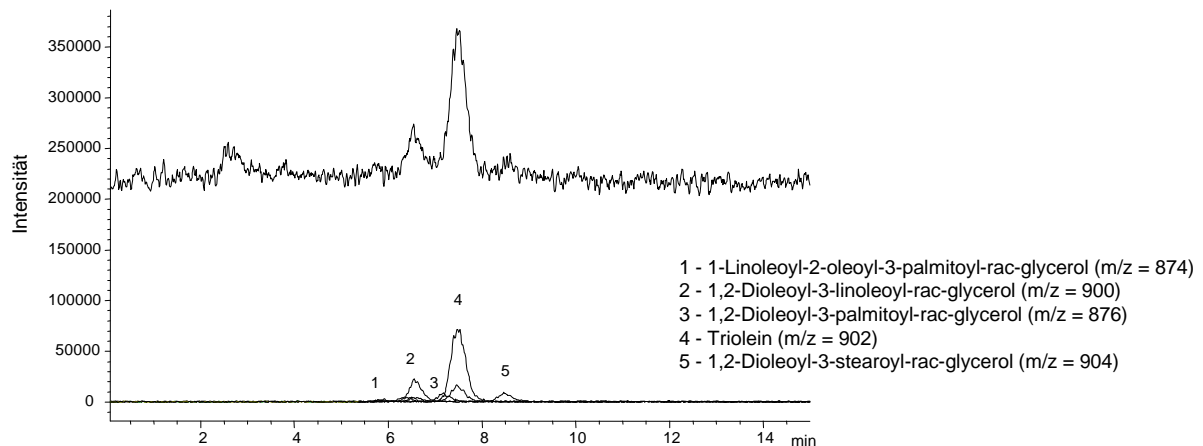
TIC und EI 9-6.

Chromatographische Trennung von Calendulaöl mit der Tenssäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0736 mg/ml



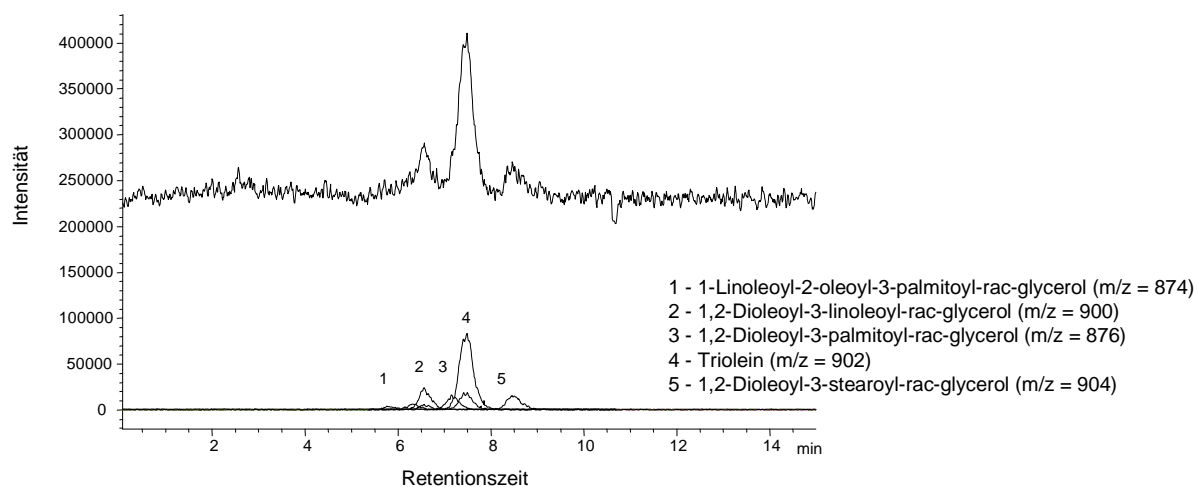
TIC und EI 9-7.

Chromatographische Trennung von Canolaöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0986 mg/ml



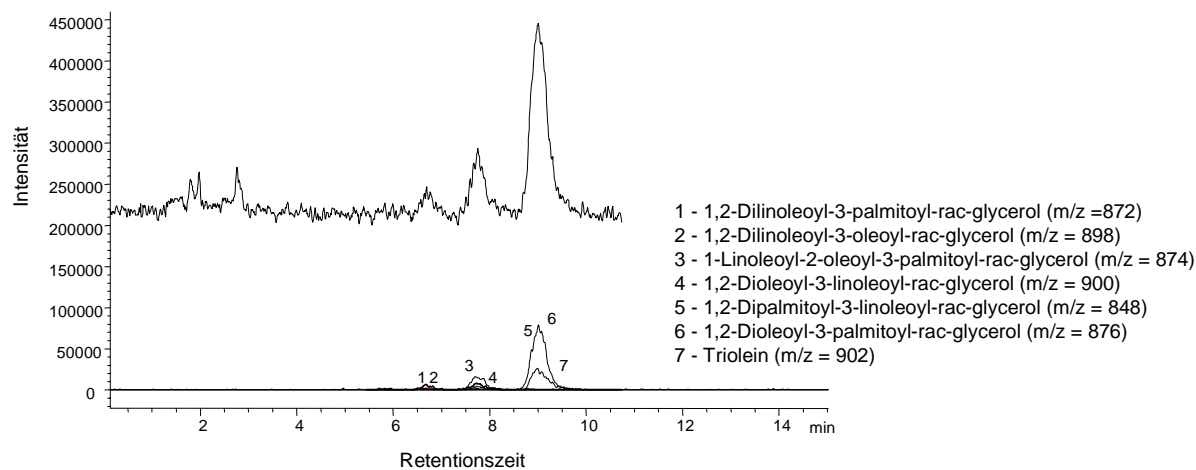
TIC und EI 9-8.

Chromatographische Trennung von Canolaöl unsaponifiables mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0556 mg/ml



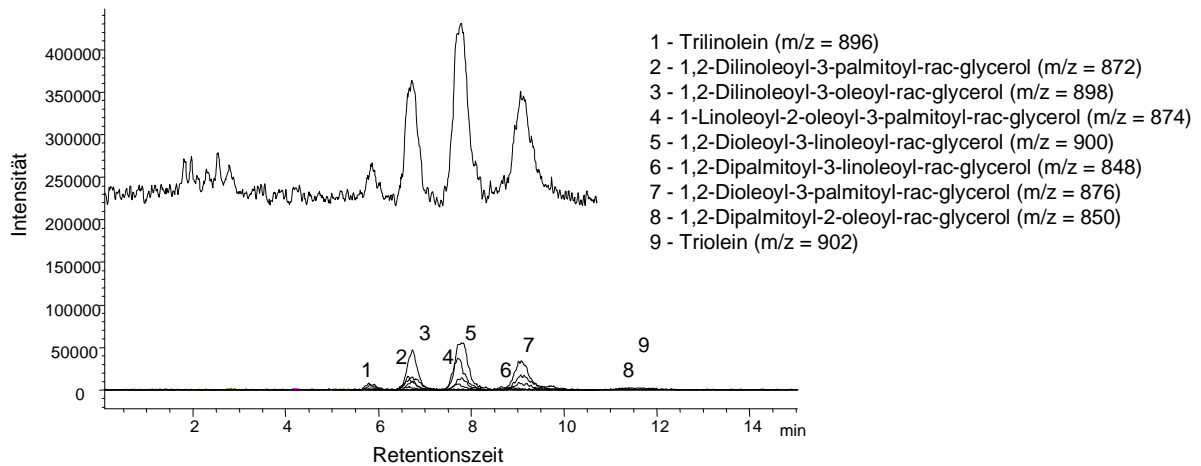
TIC und EI 9-9.

Chromatographische Trennung von Canolaöl petitioned mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0638 mg/ml



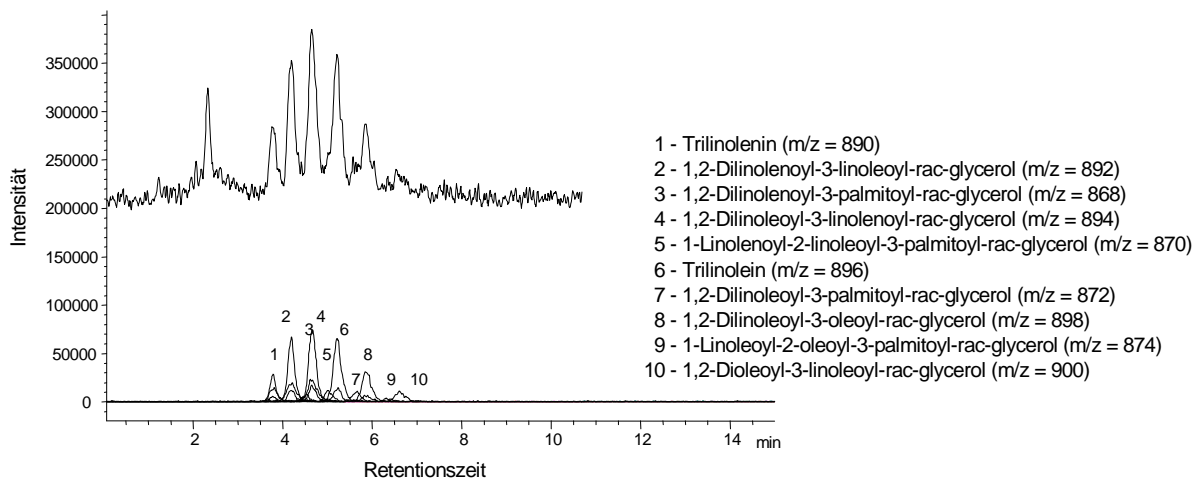
TIC und EI 9-10.

Chromatographische Trennung von Camellia Öl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0826 mg/ml



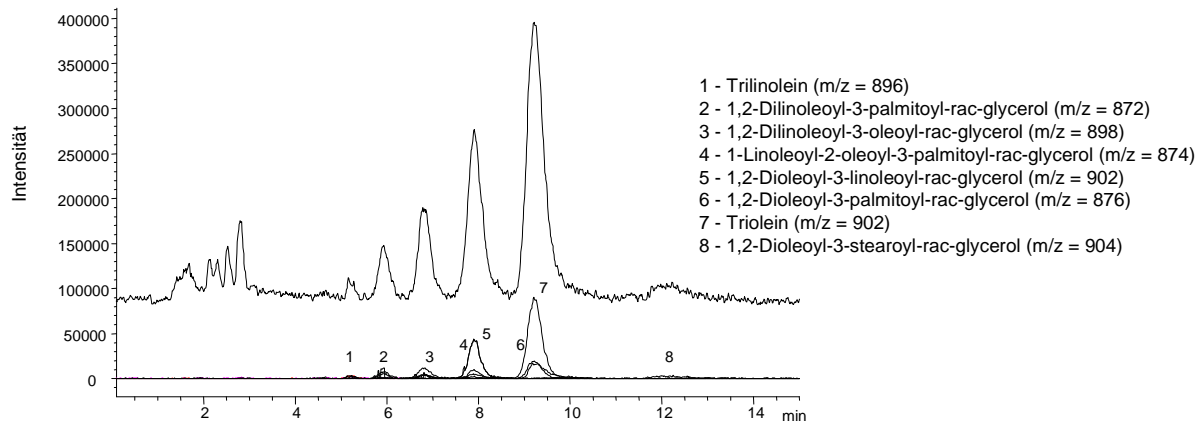
TIC und EI 9-11.

Chromatographische Trennung von Erdnussöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.1148 mg/ml



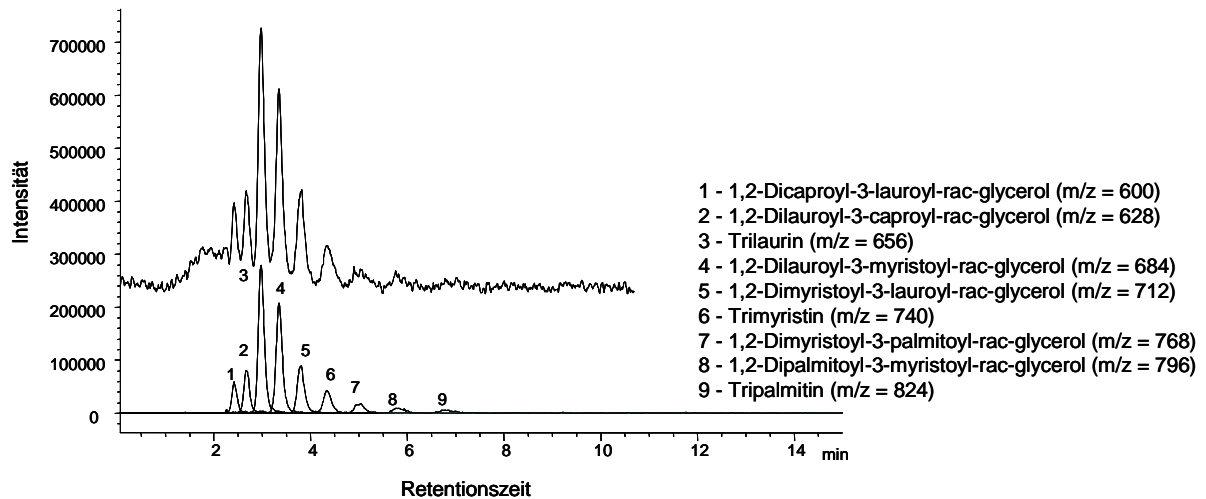
TIC und EI 9-12.

Chromatographische Trennung von Hagebuttenkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.083 mg/ml



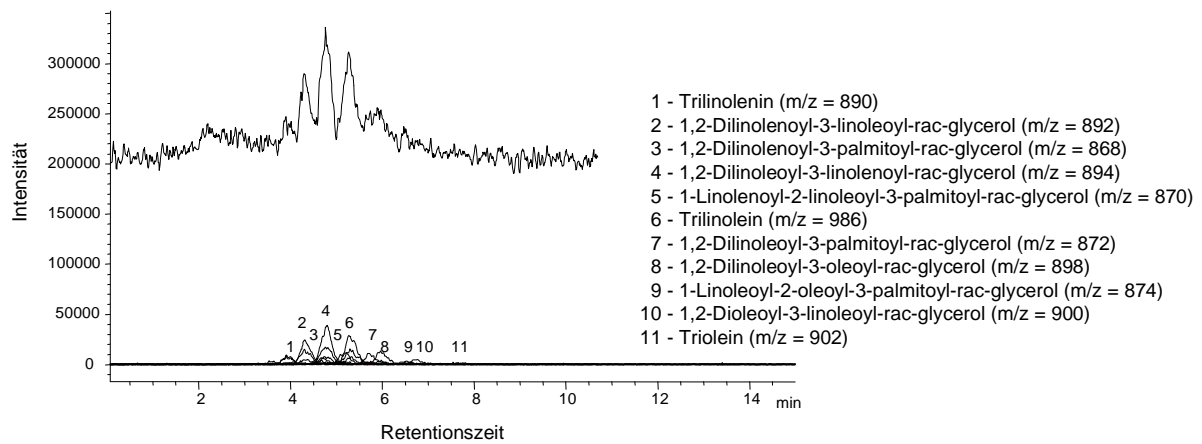
TIC und EI 9-13.

Chromatographische Trennung von Haselnussöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.083 mg/ml



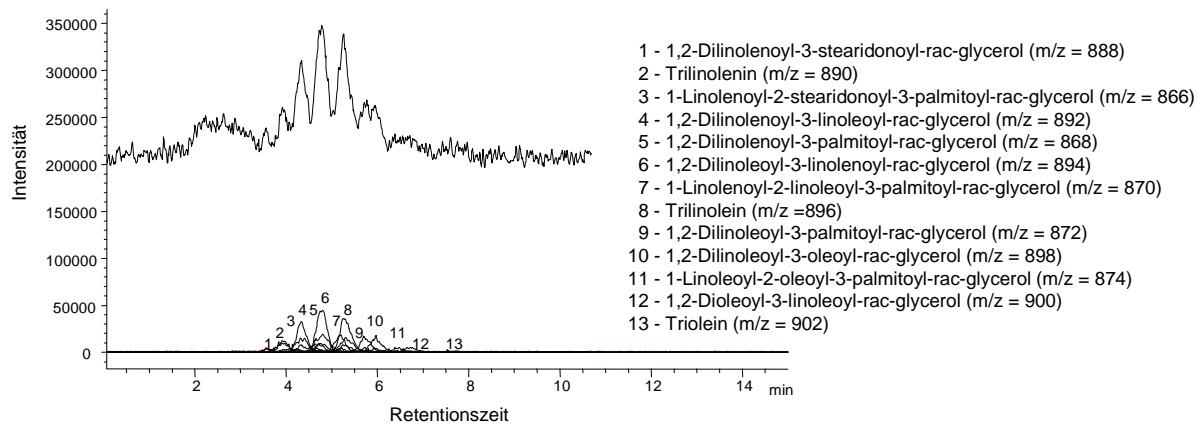
TIC und EI 9-14.

Chromatographische Trennung von hydriertem Palmkernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0538 mg/ml



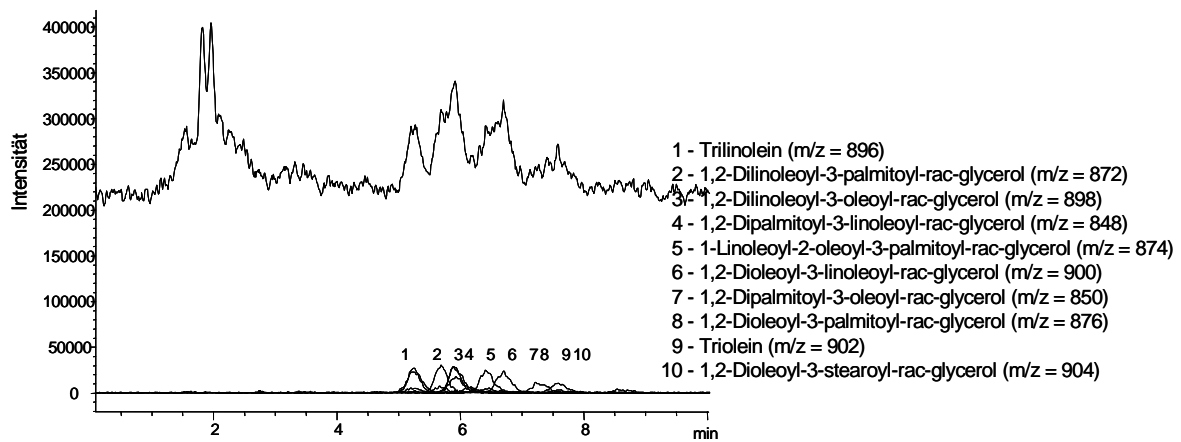
TIC und EI 9-15.

Chromatographische Trennung von Johannisbeeröl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0512 mg/ml



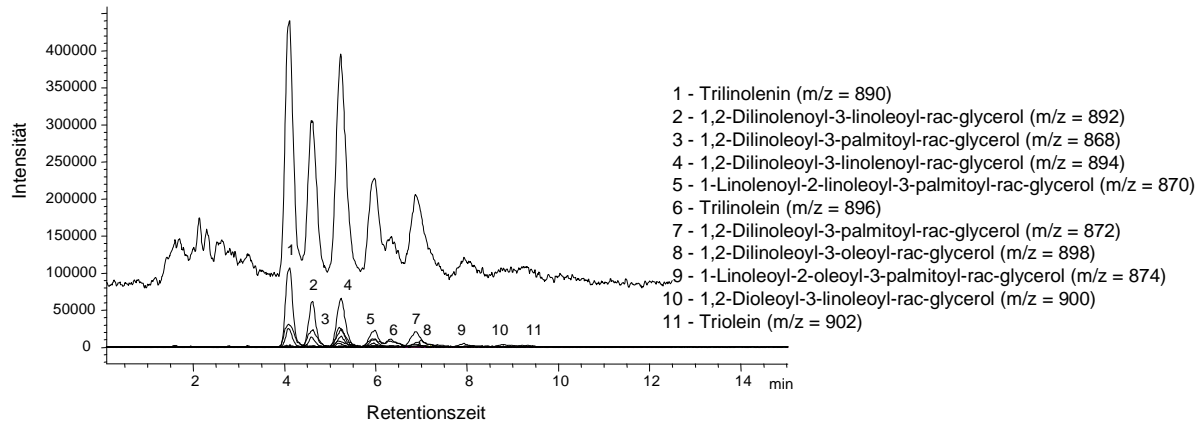
TIC und EI 9-16.

Chromatographische Trennung von Johannisbeersamenöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0580 mg/ml



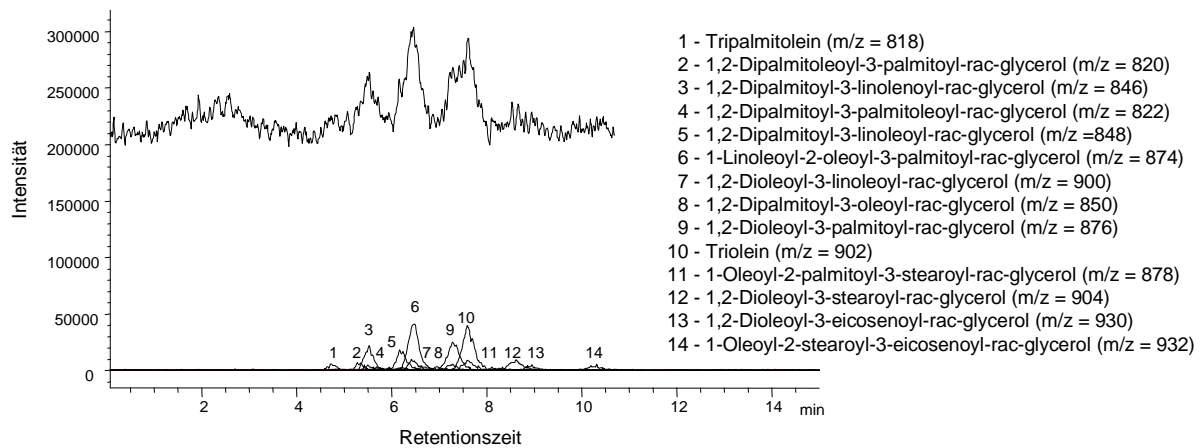
TIC und EI 9-17.

Chromatographische Trennung von Kürbiskernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0668 mg/ml



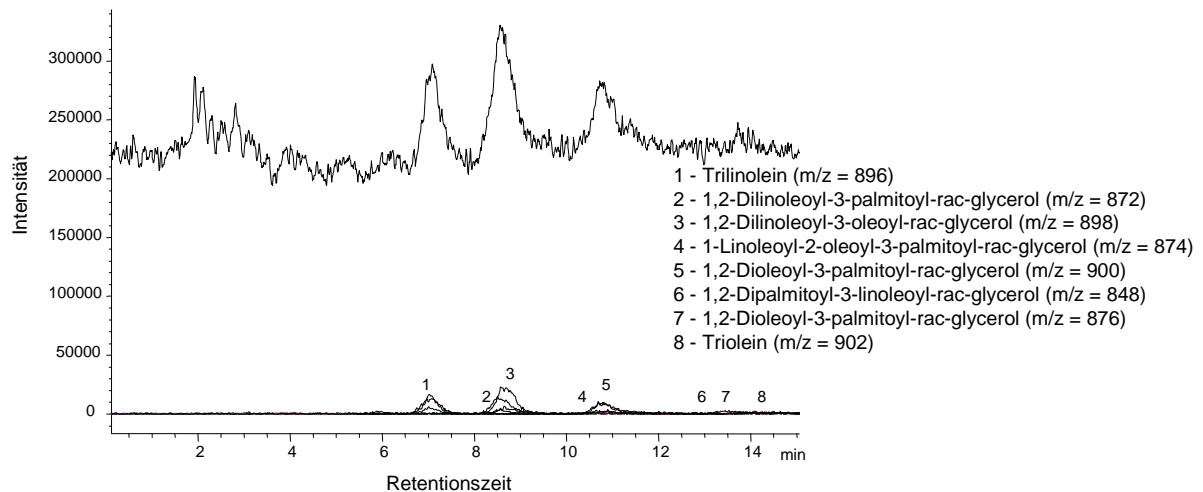
TIC und EI 9-18.

Chromatographische Trennung von Leinöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0734 mg/ml



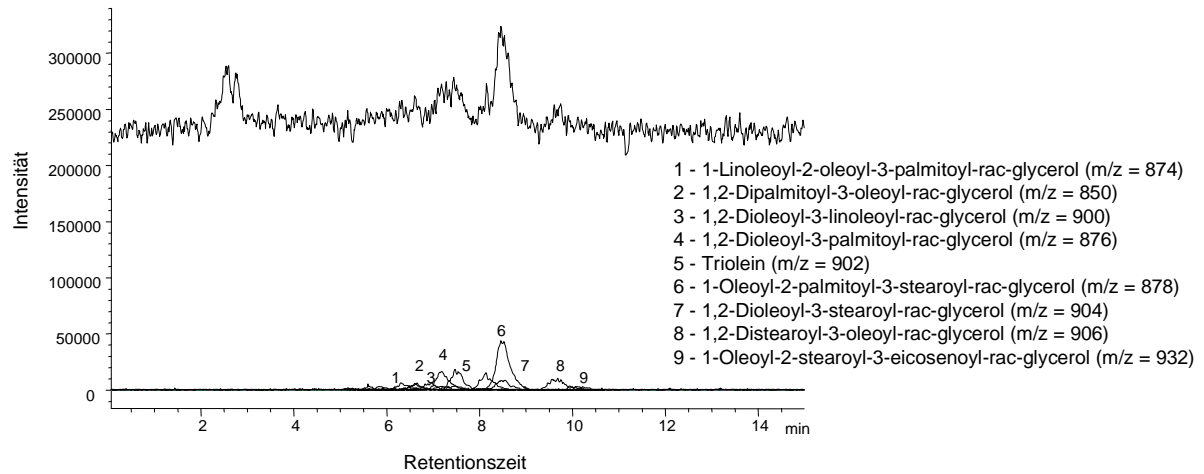
TIC und EI 9-19.

Chromatographische Trennung von Macadamianussöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-18 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0638 mg/ml



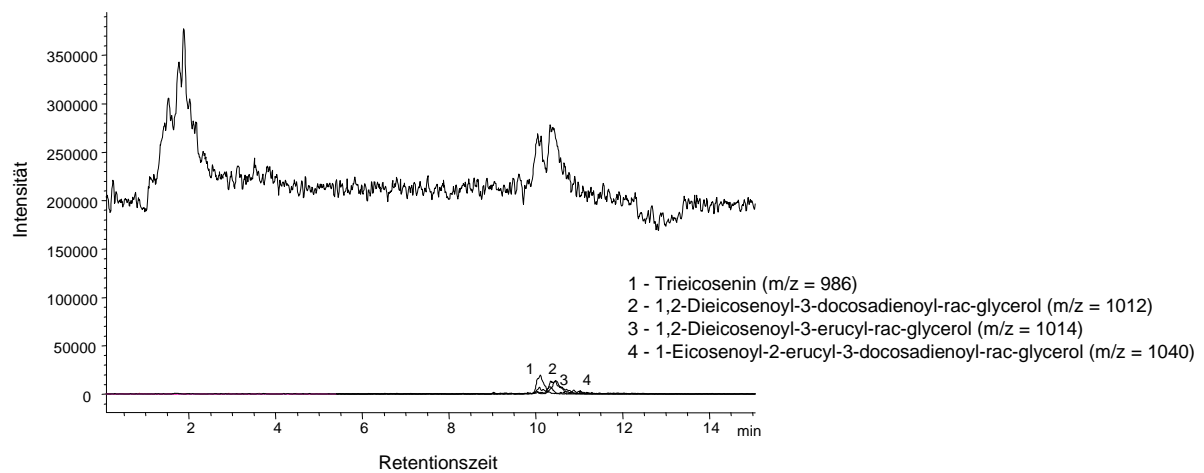
TIC und EI 9-20.

Chromatographische Trennung von Maiskeimöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0596 mg/ml



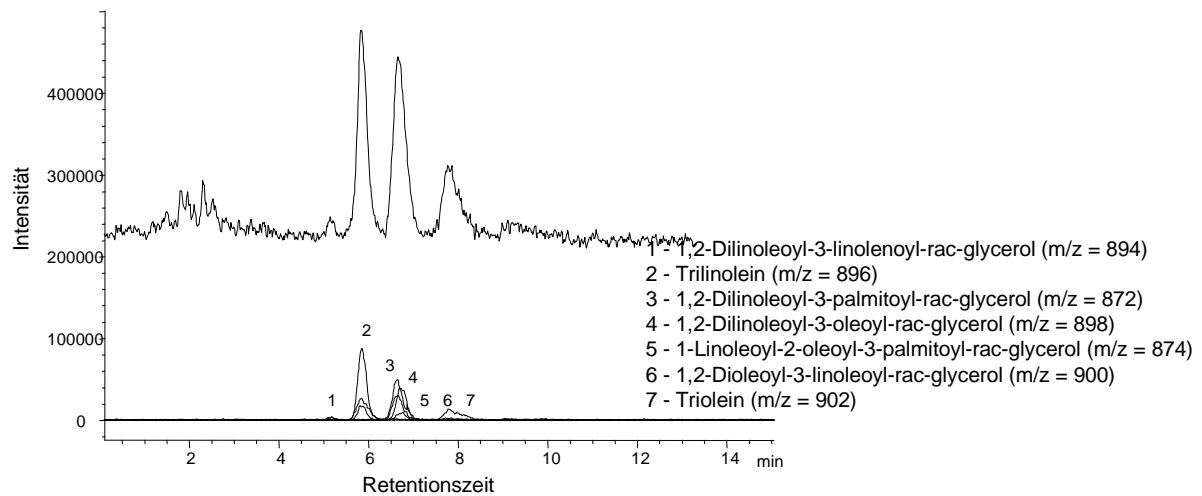
TIC und EI 9-21.

Chromatographische Trennung von Mangokernöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.0694 mg/ml



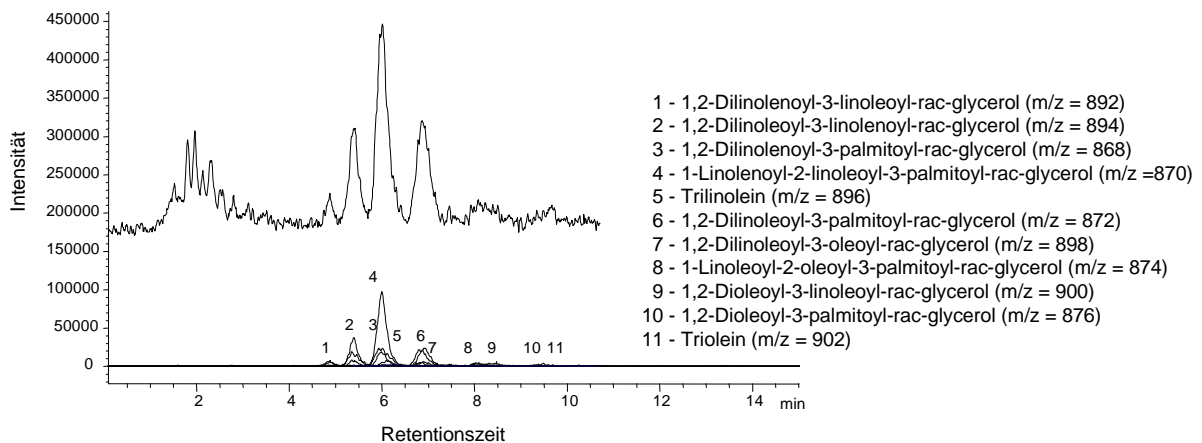
TIC und EI 9-22.

Chromatographische Trennung von Meadowfoam Seed Oil mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0532 mg/ml



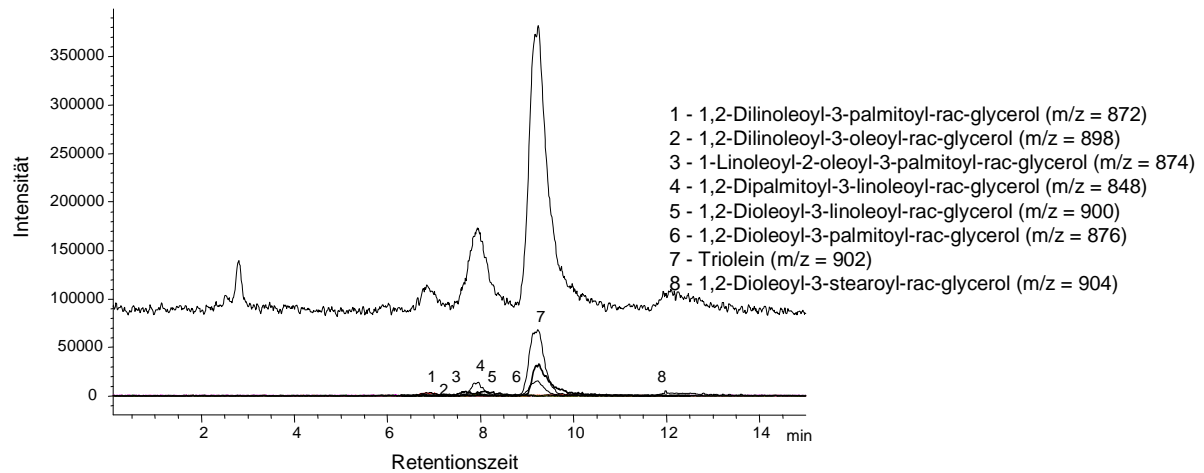
TIC und EI 9-23.

Chromatographische Trennung von Mohnöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0560 mg/ml



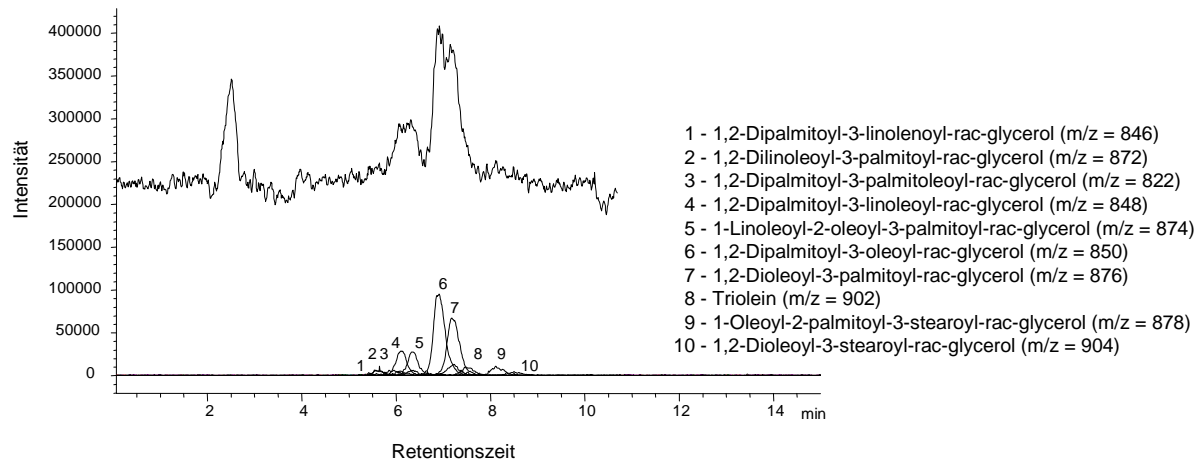
TIC und EI 9-24.

Chromatographische Trennung von Nachtkerzenöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0634 mg/ml



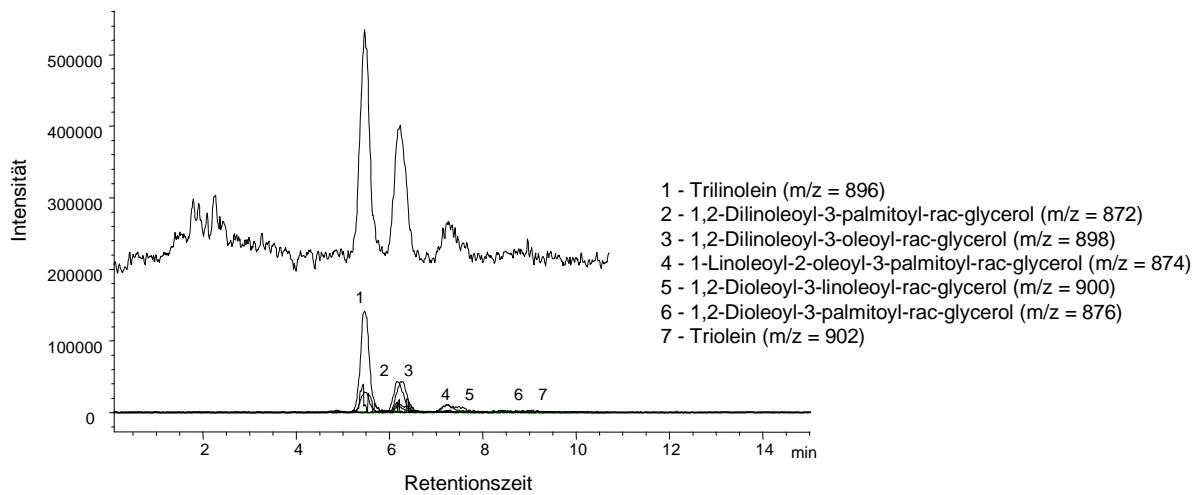
TIC und EI 9-25.

Chromatographische Trennung von Olivenöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0576 mg/ml



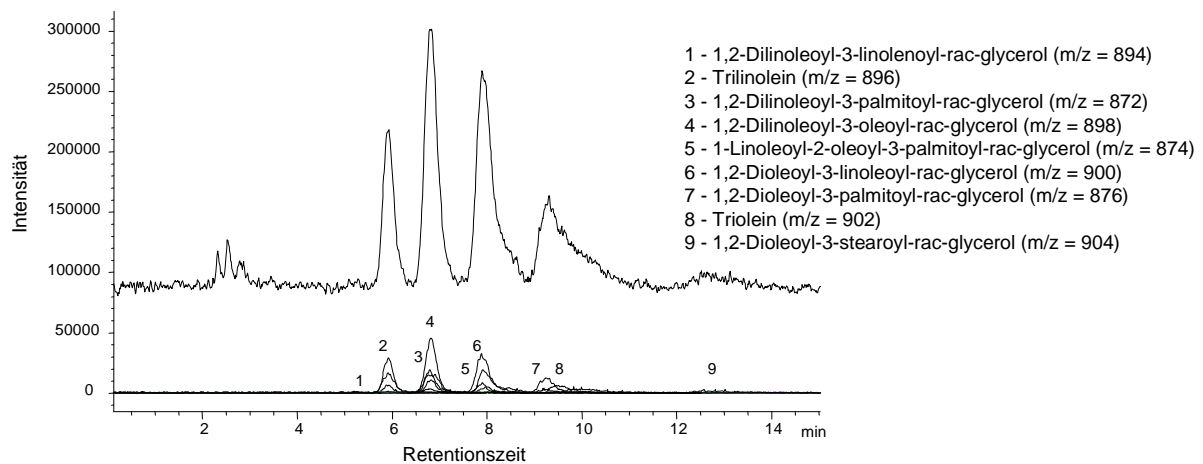
TIC und EI 9-26.

Chromatographische Trennung von Palmöl mit der Trennsäule LiChrospher 100 RP-8 endcapped (125*2 mm), Konzentration = 0.1326 mg/ml



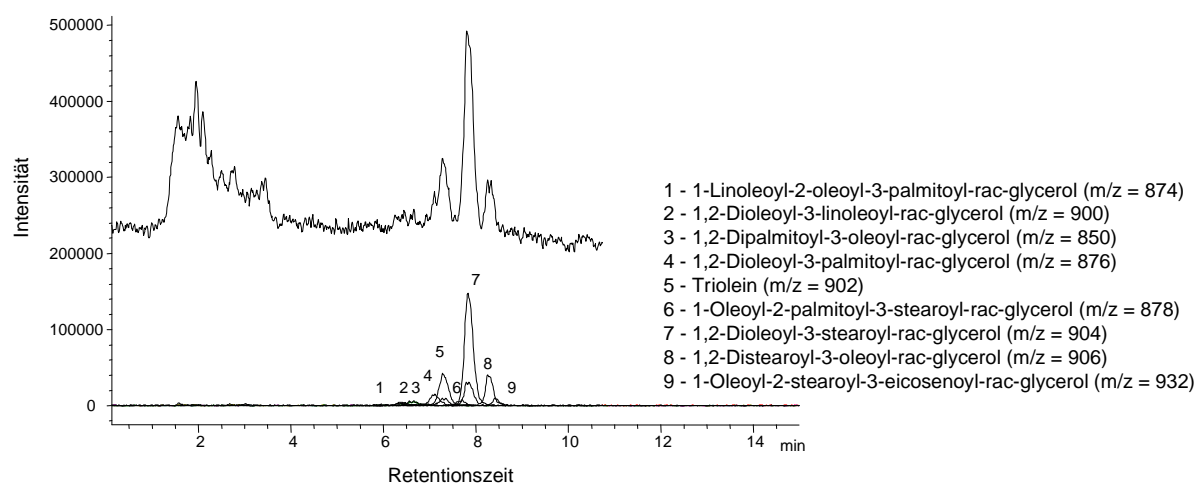
TIC und EI 9-27.

Chromatographische Trennung von Safloröl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.059 mg/ml



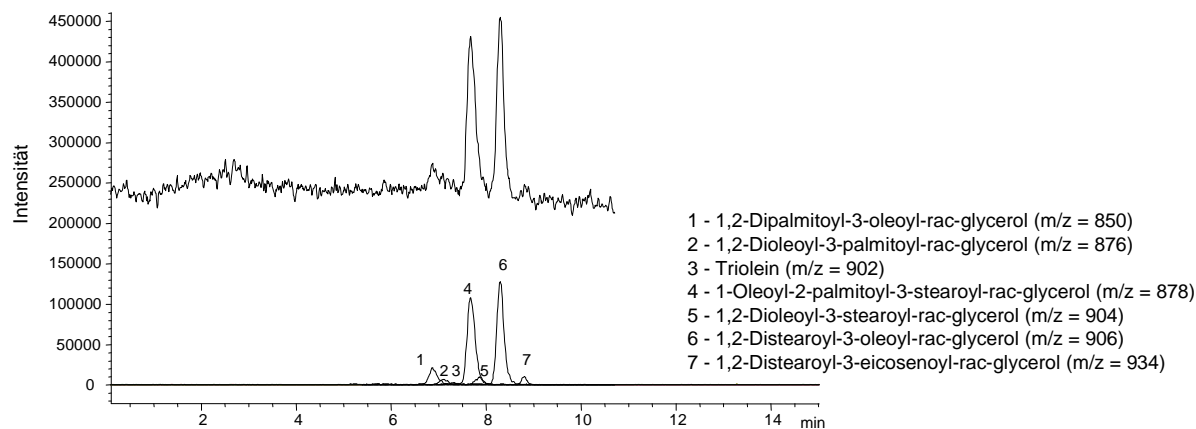
TIC und EI 9-28.

Chromatographische Trennung von Sesamöl mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.060 mg/ml



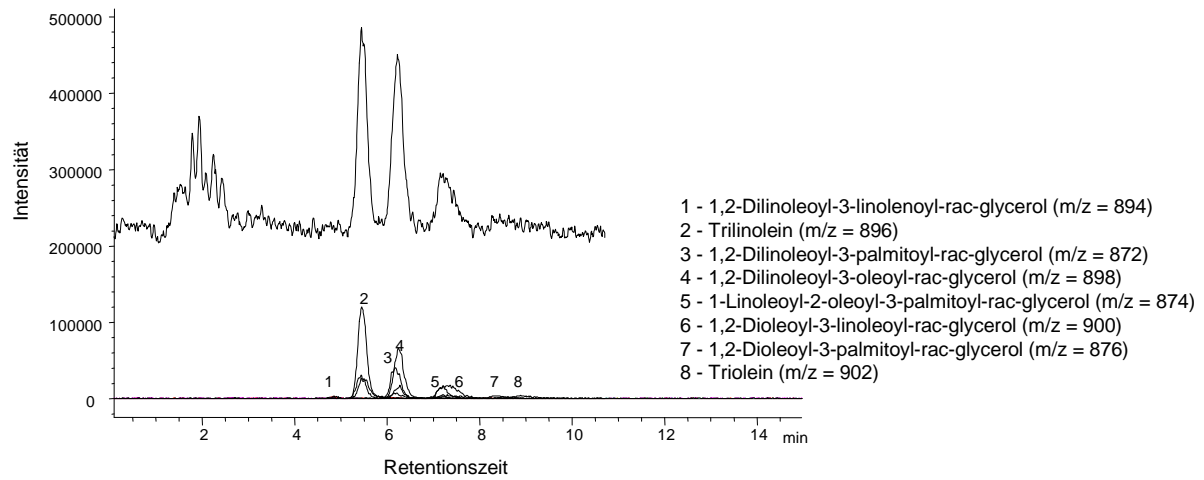
TIC und EI 9-29.

Chromatographische Trennung von Sheabutter mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.090 mg/ml



TIC und EI 9-30 .

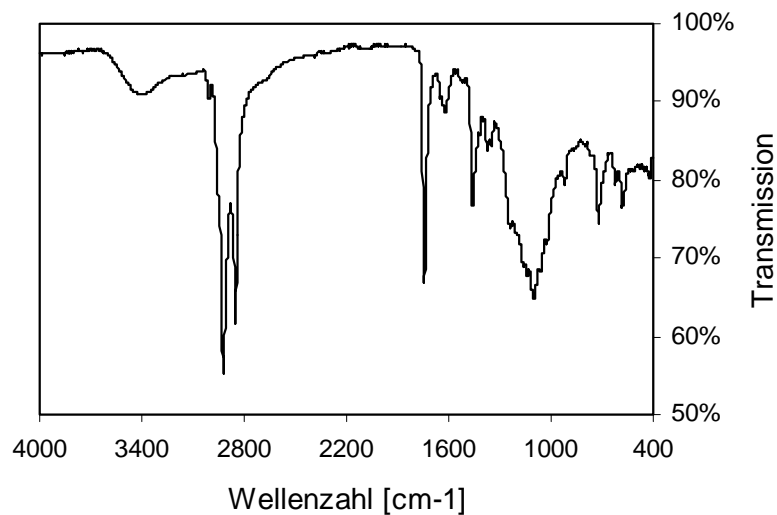
Chromatographische Trennung von Shorea Butter mit der Trennsäule GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.056 mg/ml



TIC und EI 9-31.

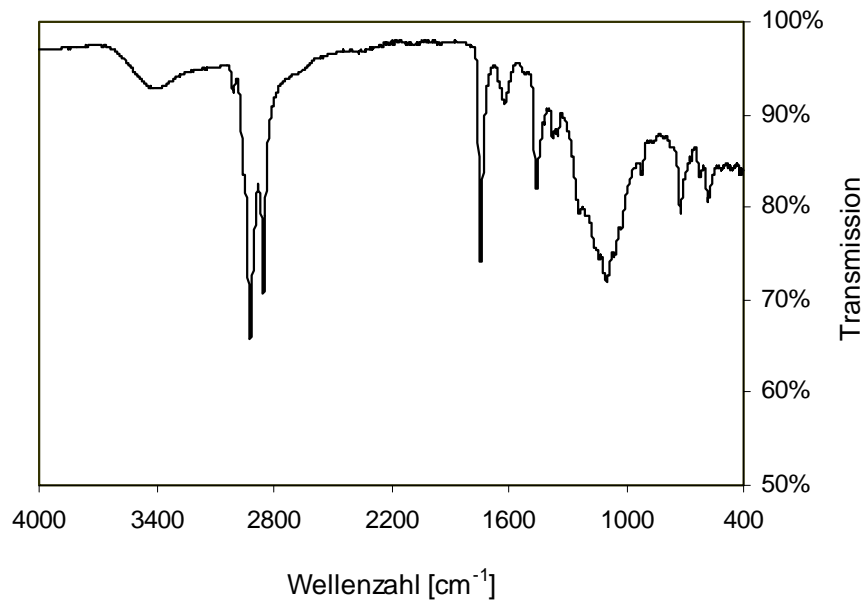
Chromatographische Trennung des Traubenkernöls der Trennsäule mit GROM-SIL Octyl-5 CP (125*2 mm), Konzentration = 0.0634 mg/ml

9.3.6 IR-Spektren einiger kosmetischer Rohstoffe und von Produkten

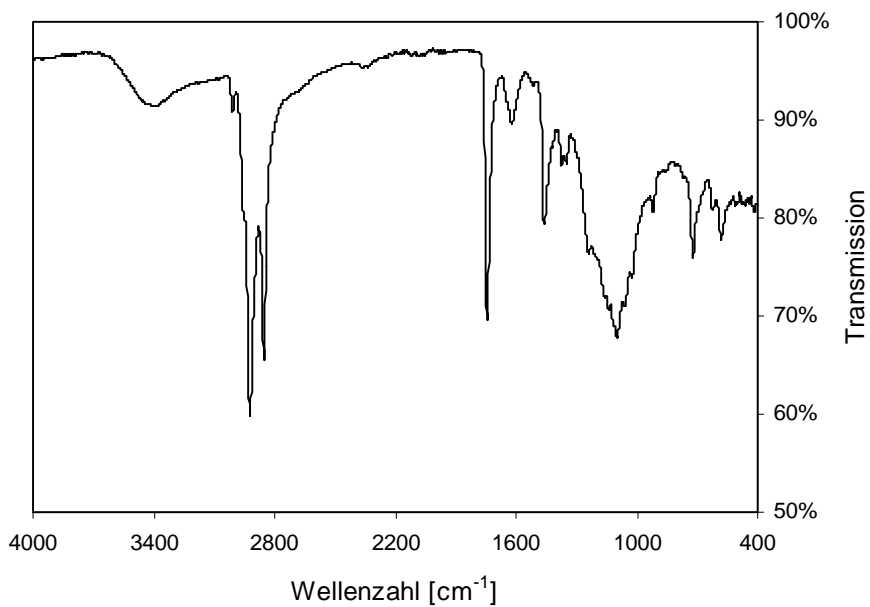


IR-Spektrum 9-1.

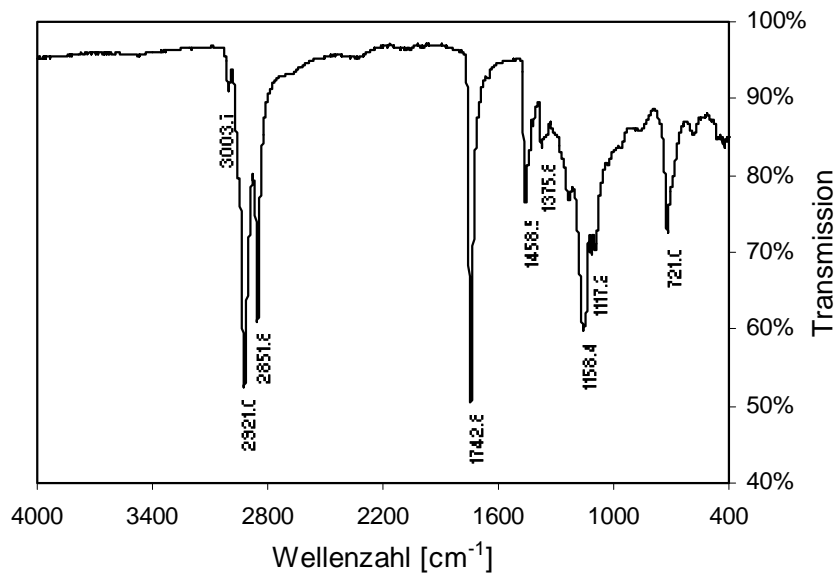
Trockenrückstand des Produktes C

**IR-Spektrum 9-2.**

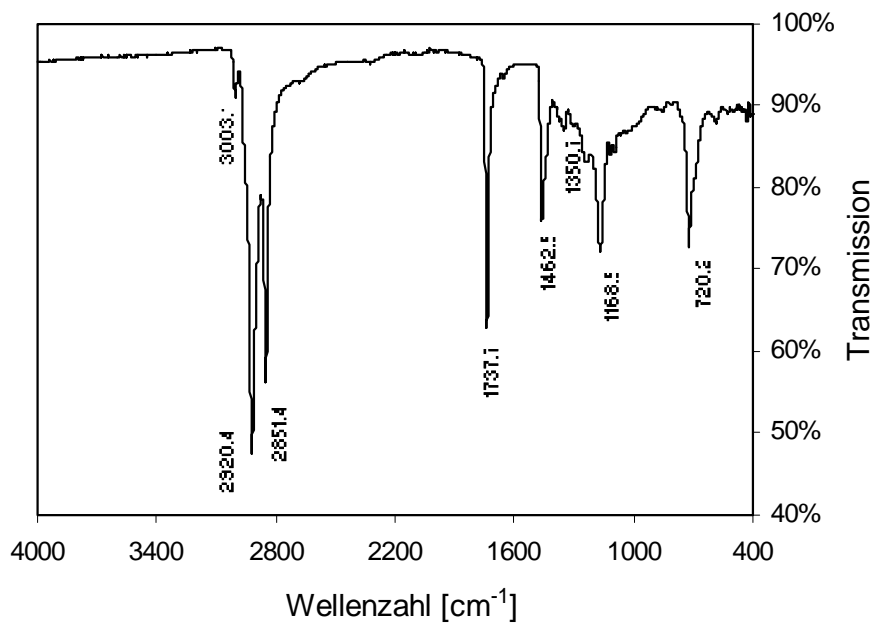
Gesamtaufnahme des Produktes A

**IR-Spektrum 9-3.**

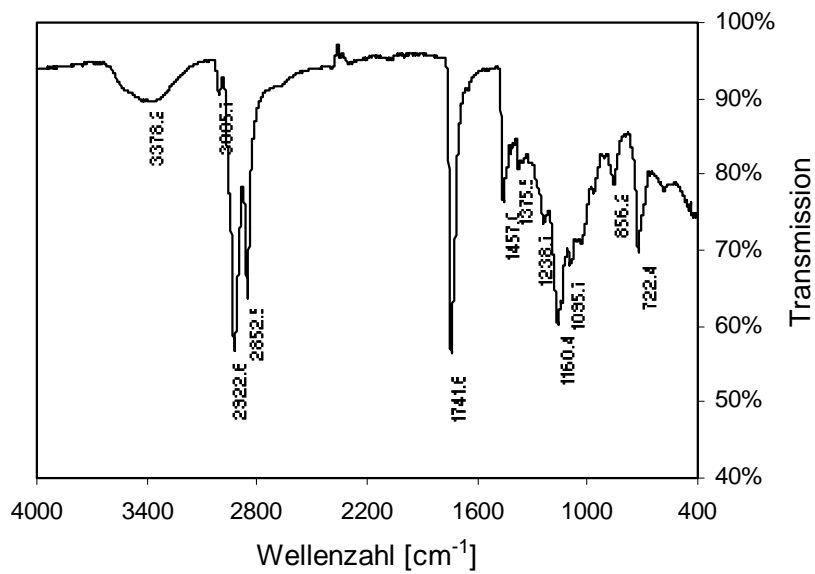
Gesamtaufnahme des Produktes B



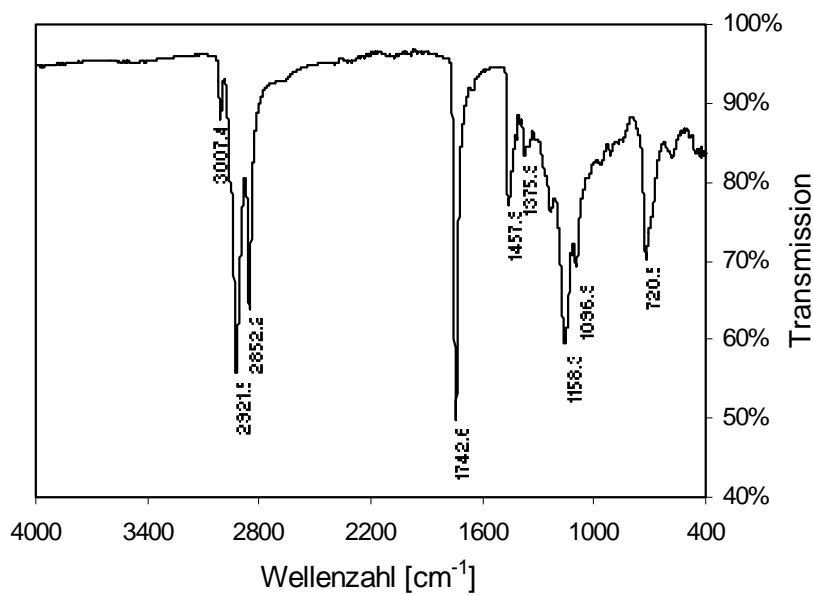
IR-Spektrum 9-4.
Rohstoff Avocadoöl



IR-Spektrum 9-5.
Rohstoff Jojobaöl

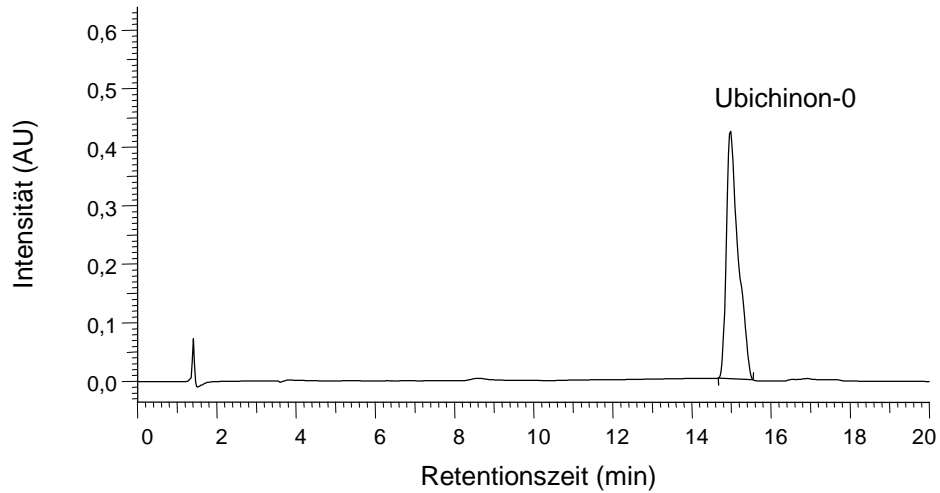


IR-Spektrum 9-6.
Rohstoff Rizinusöl



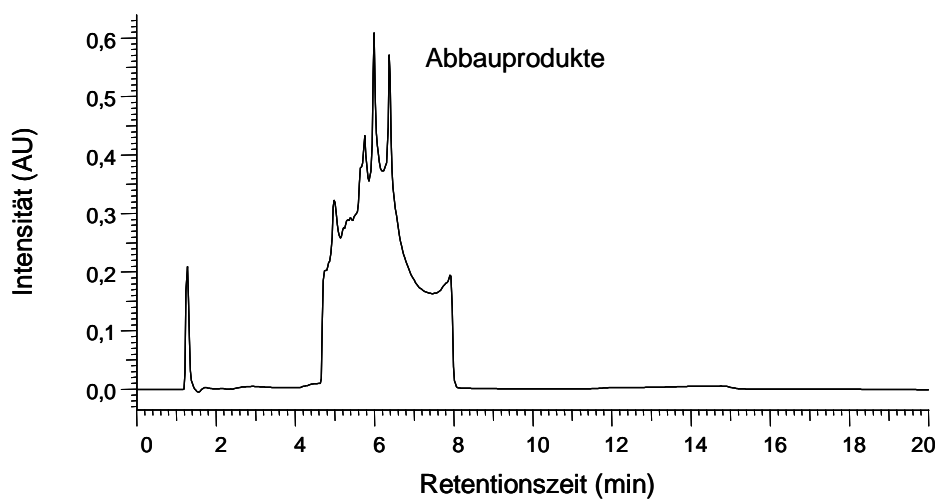
IR-Spektrum 9-7.
Rohstoff Sojaöl

9.3.7 HPLC-DAD-Chromatogramme von Ubichinonen



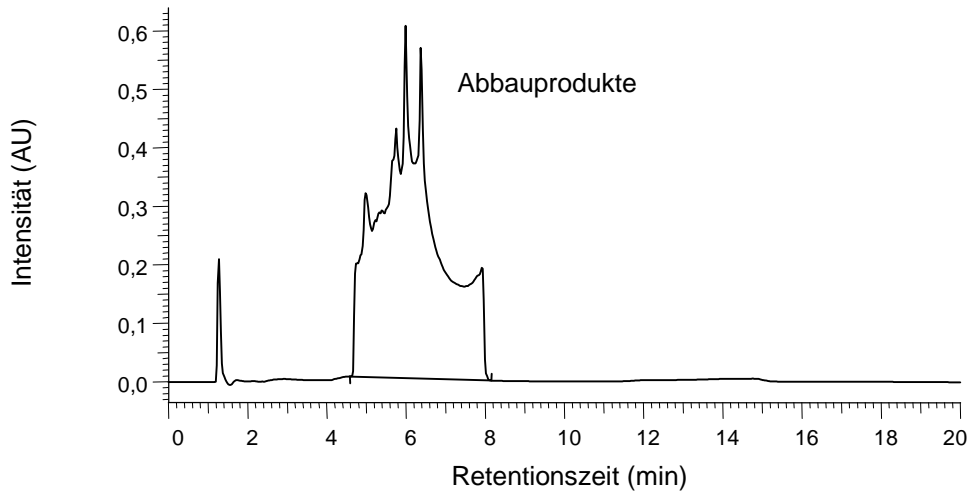
Chromatogramm 9-56.

Ubichinon-0 in Ethanol; Bruttoretentionszeit = 14.99 min; Konzentration = 0.287 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

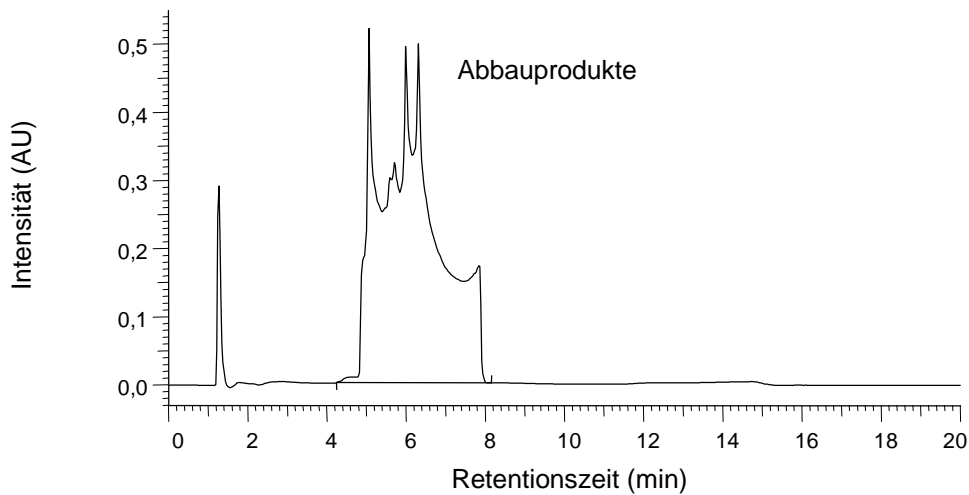


Chromatogramm 9-57.

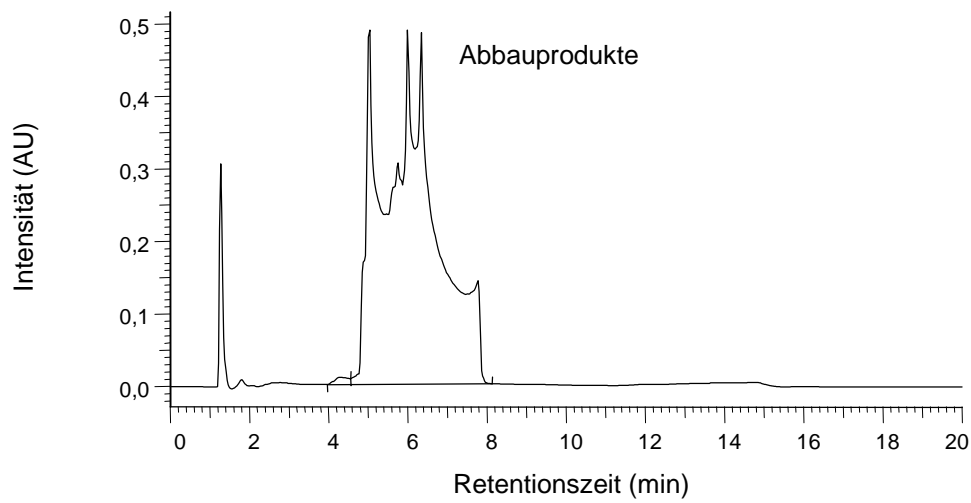
Ubichinon-0 in Ethanol 5 Minuten mit 250 W/m² bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-58.**

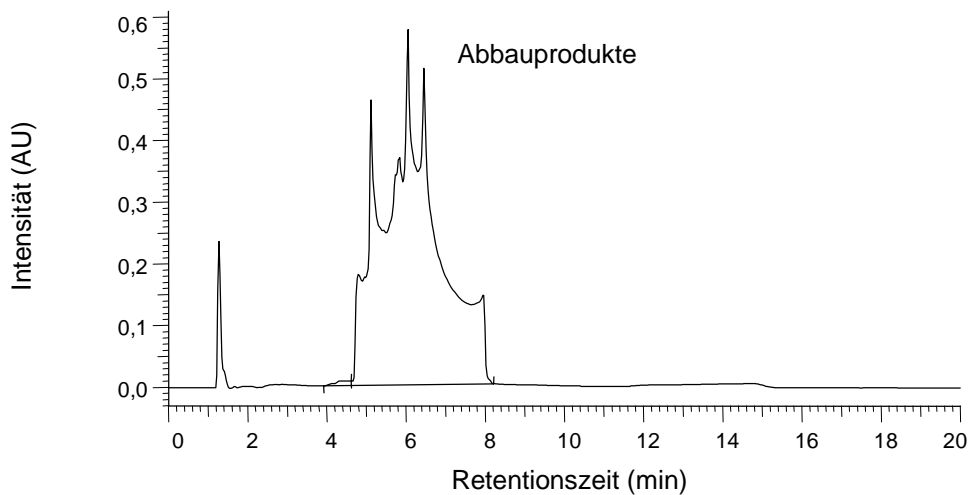
Ubichinon-0 in Ethanol 10 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-59.**

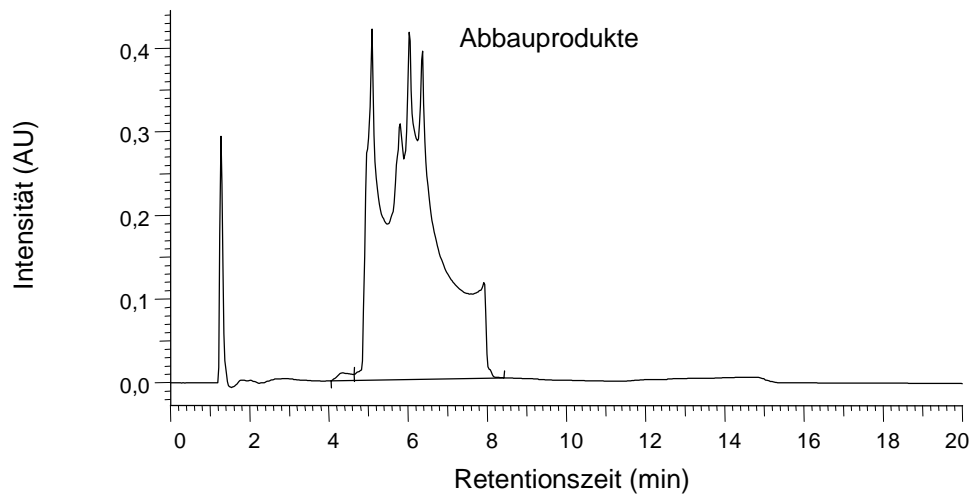
Ubichinon-0 in Ethanol 20 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-60.**

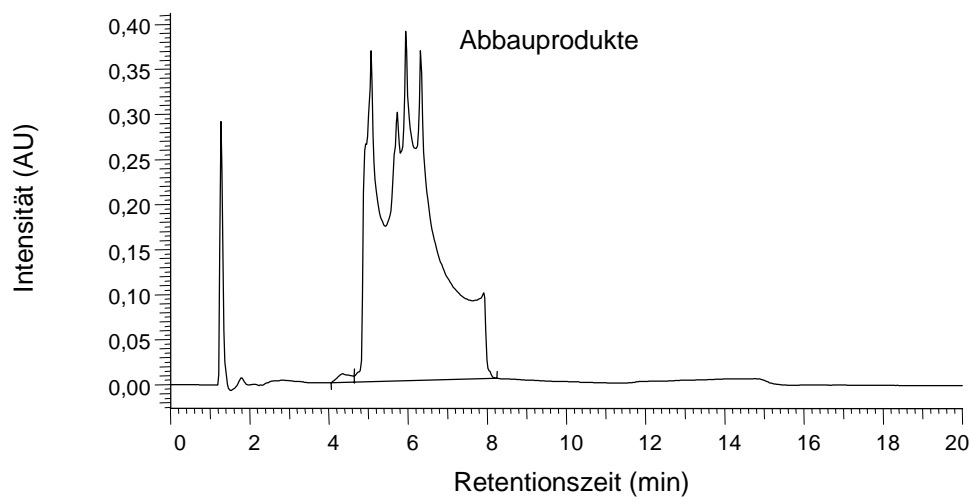
Ubichinon-0 in Ethanol 30 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-61.**

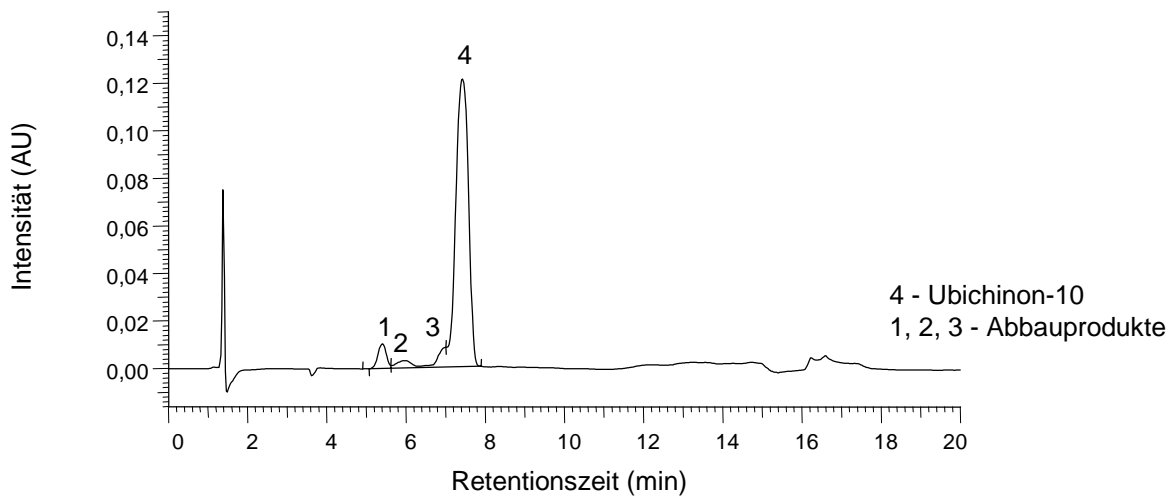
Ubichinon-0 in Ethanol 40 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-62.**

Ubichinon-0 in Ethanol 50 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

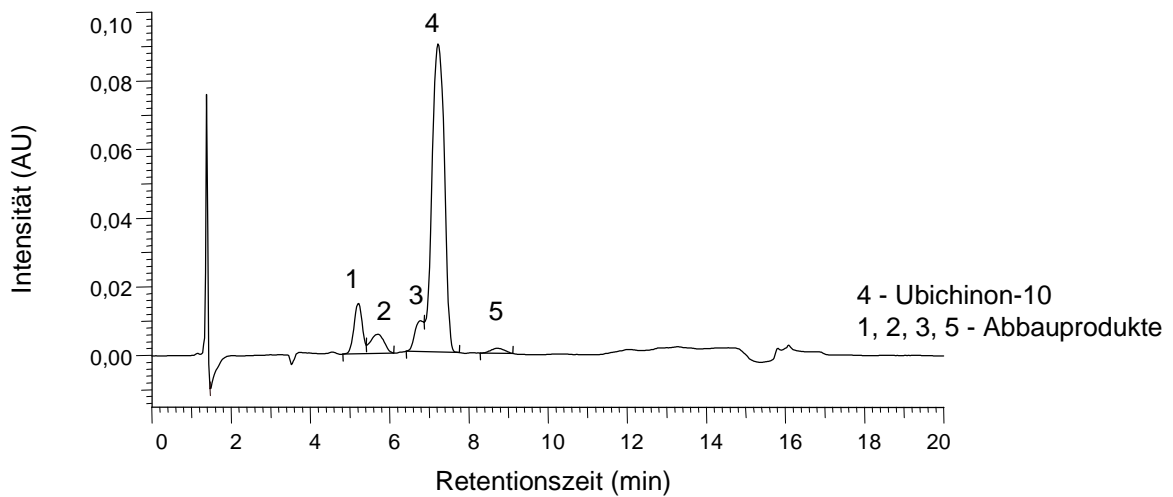
**Chromatogramm 9-63.**

Ubichinon-0 in Ethanol 60 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.287 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm



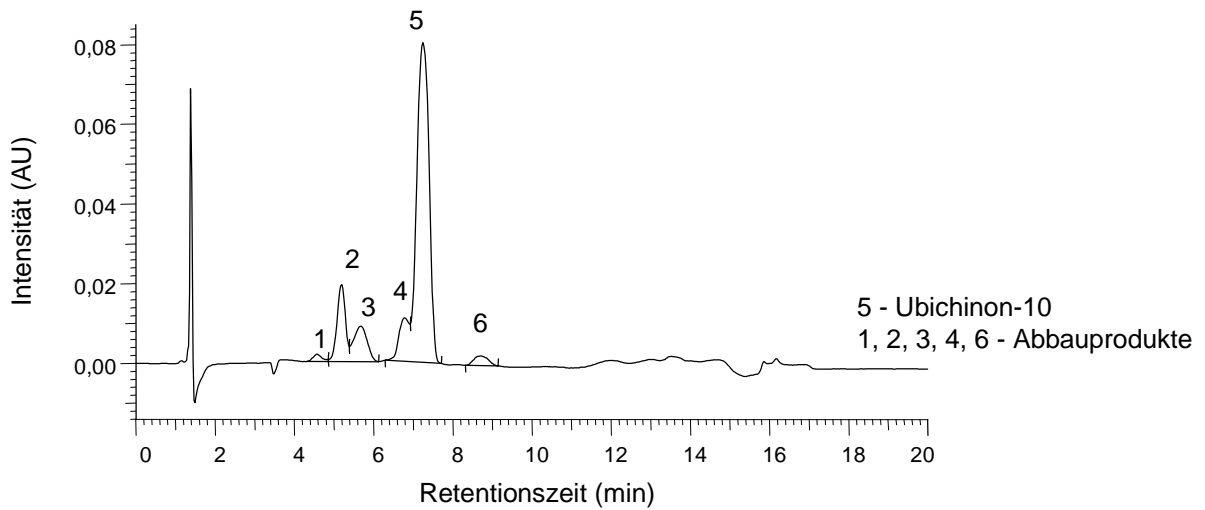
Chromatogramm 9-64.

Ubichinon-10 in Ethanol 10 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.532 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

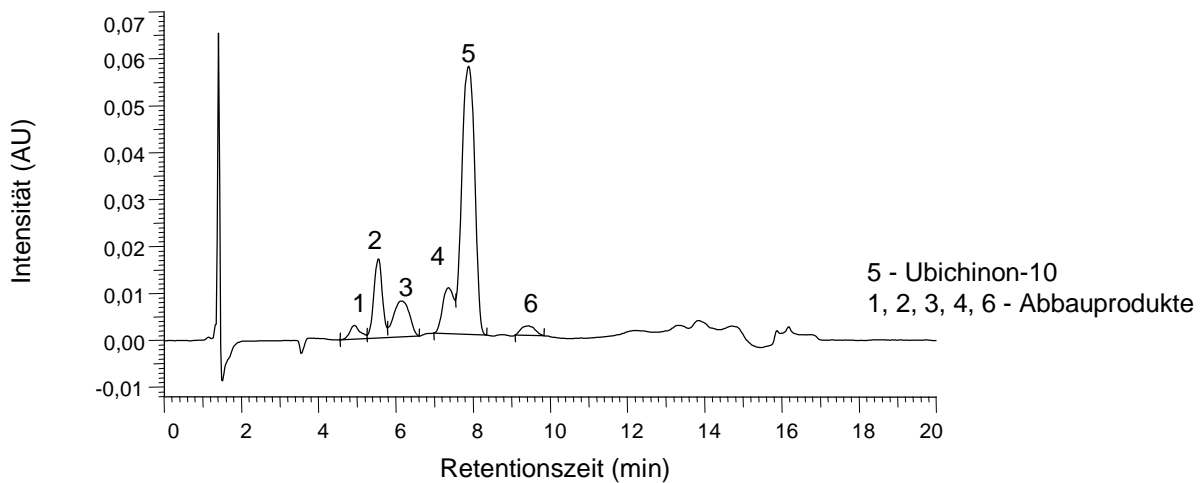


Chromatogramm 9-65.

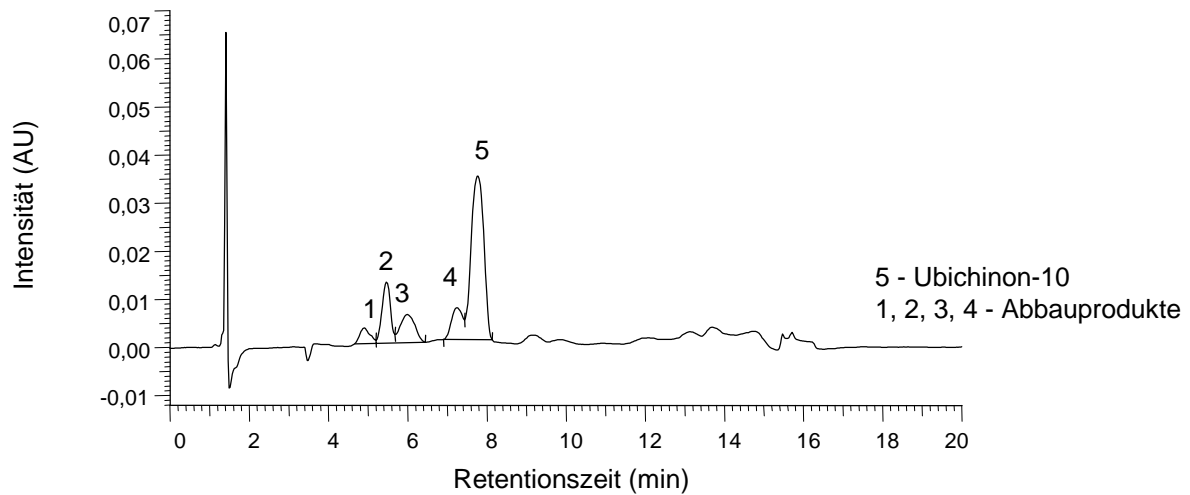
Ubichinon-10 in Ethanol 20 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.532 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-66.**

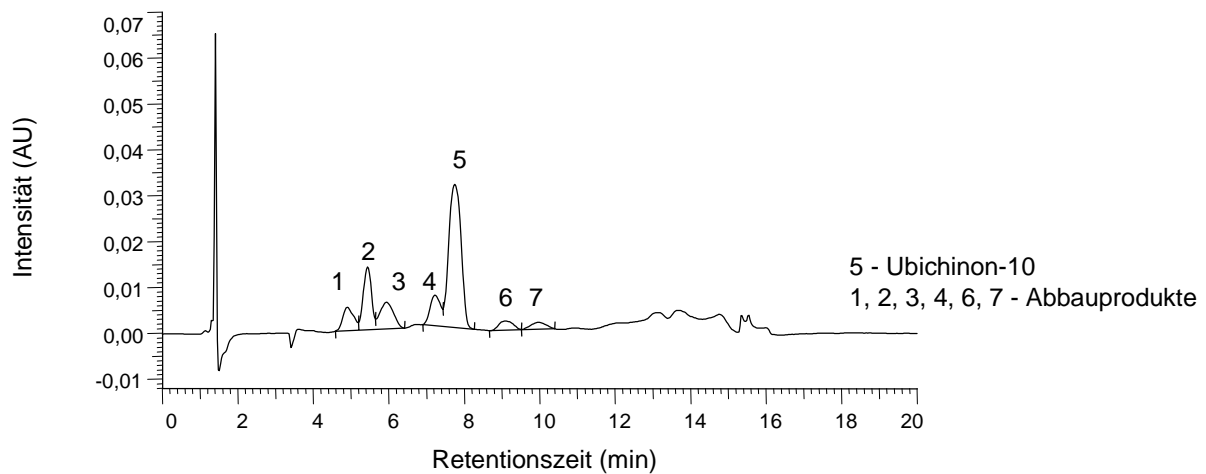
Ubichinon-10 in Ethanol 30 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.532 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-67.**

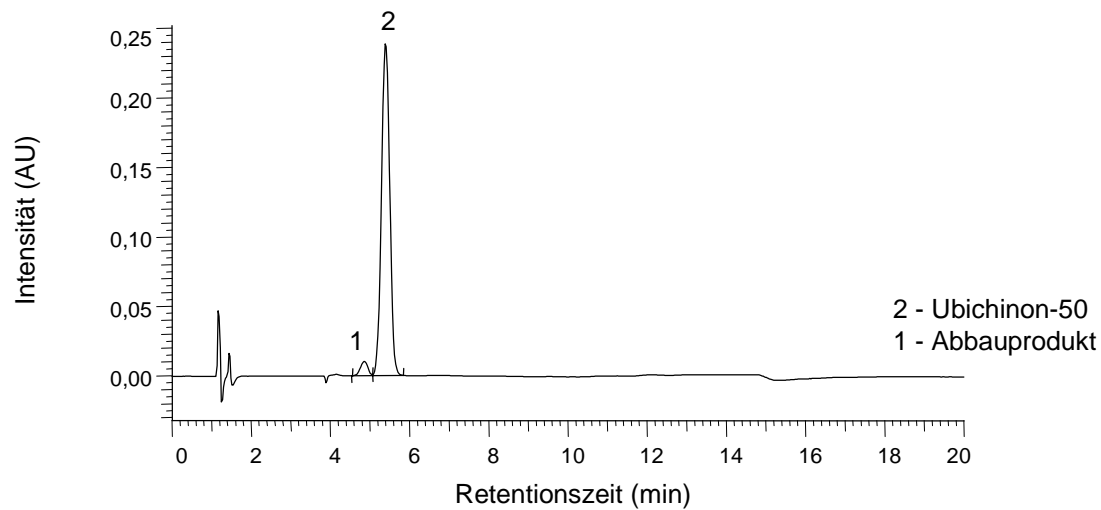
Ubichinon-10 in Ethanol 40 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.532 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-68.**

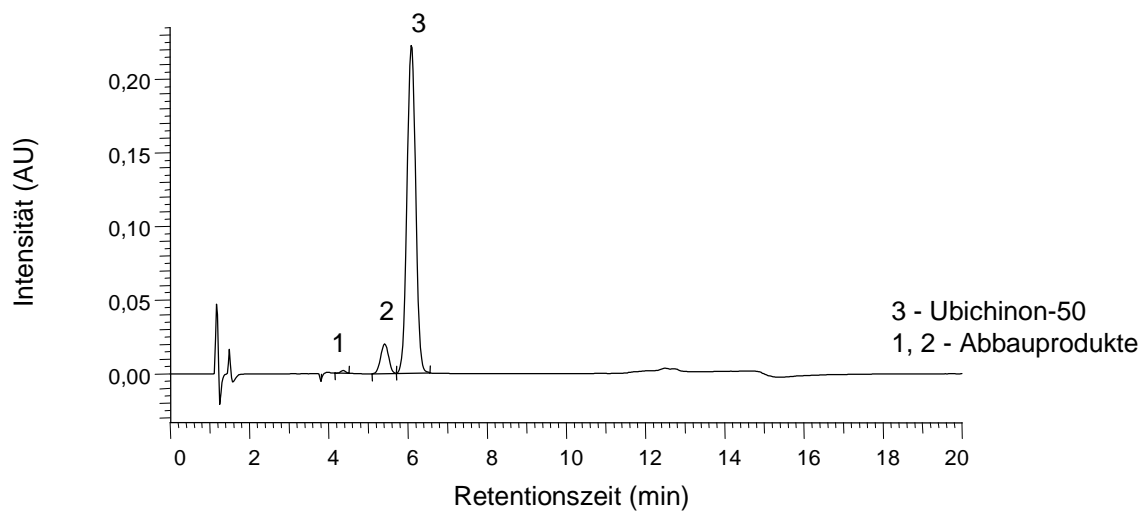
Ubichinon-10 in Ethanol 50 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.532 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-69.**

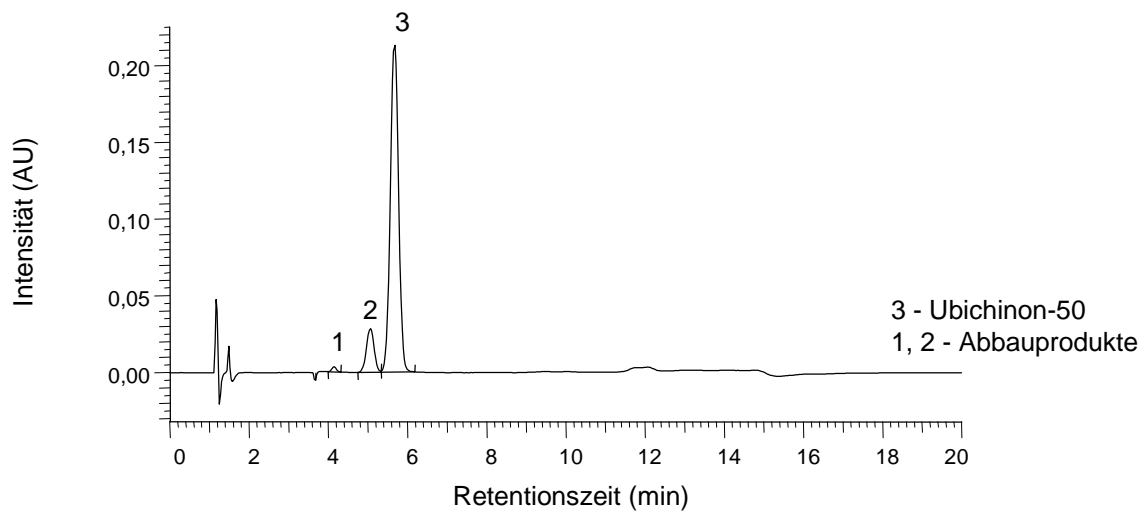
Ubichinon-10 in Ethanol 60 Minuten mit 250 W/m^2 bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.532 mg/ml ; Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-70.**

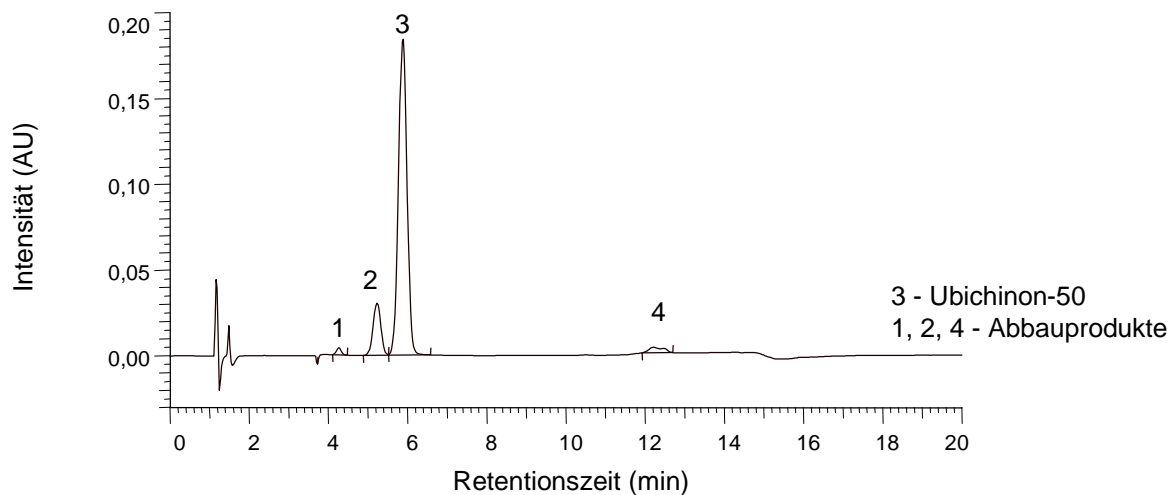
Ubichinon-50 in n-Hexan 1 Tag mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-71.**

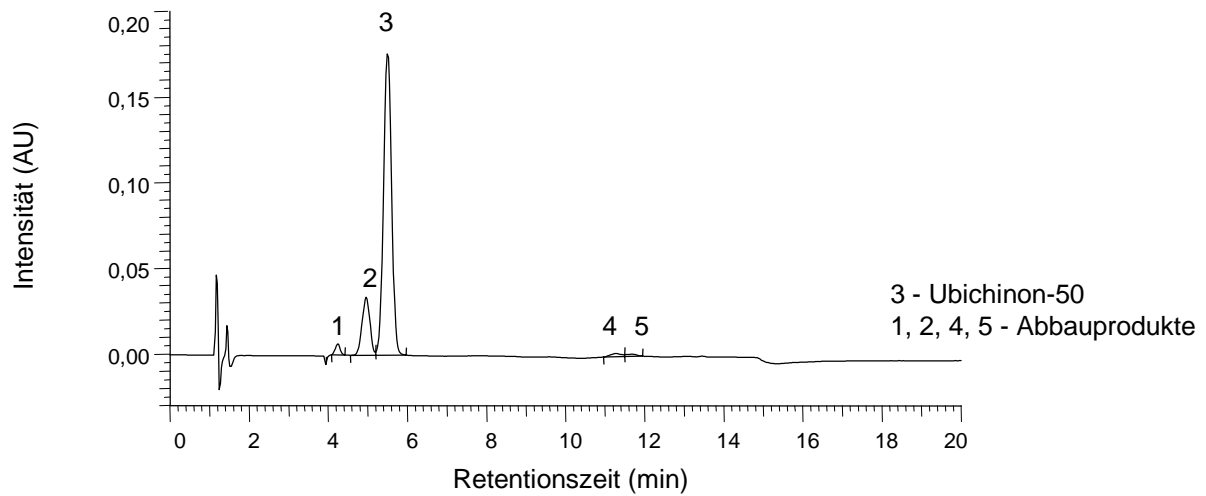
Ubichinon-50 in n-Hexan 2 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-72.**

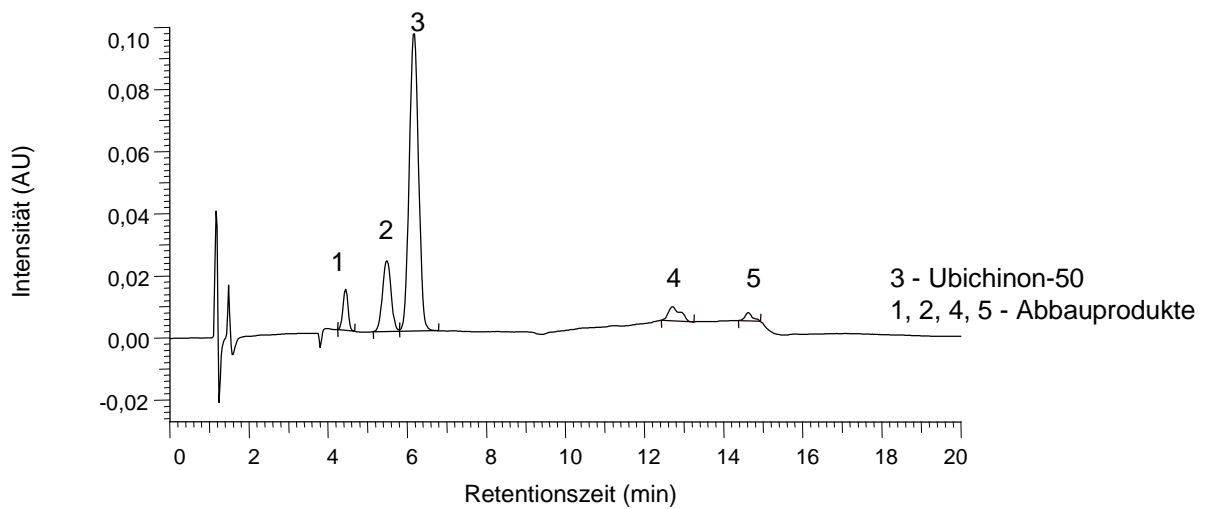
Ubichinon-50 in n-Hexan 3 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 µl, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-73.**

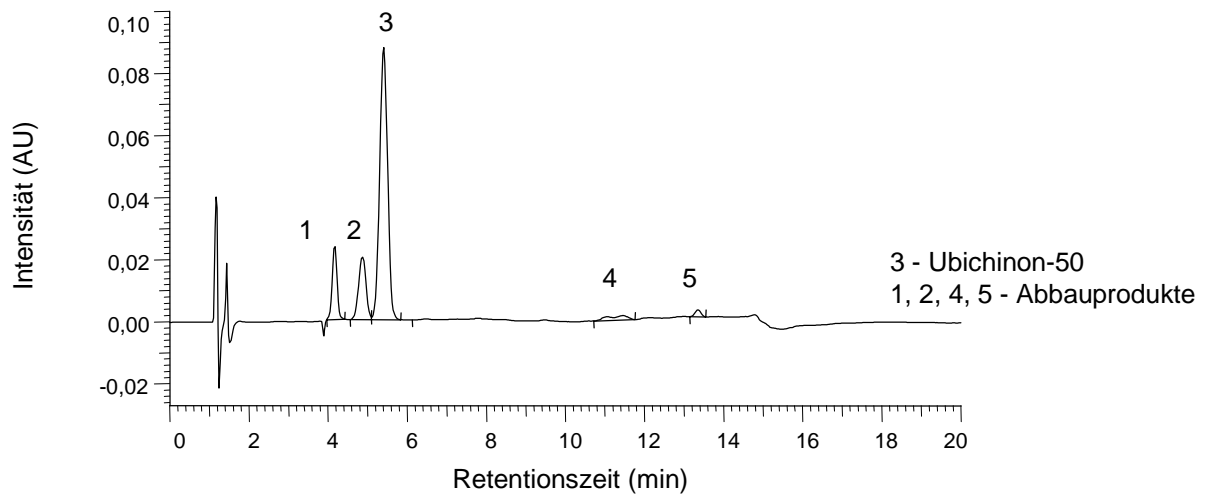
Ubichinon-50 in n-Hexan 4 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 µl, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-74.**

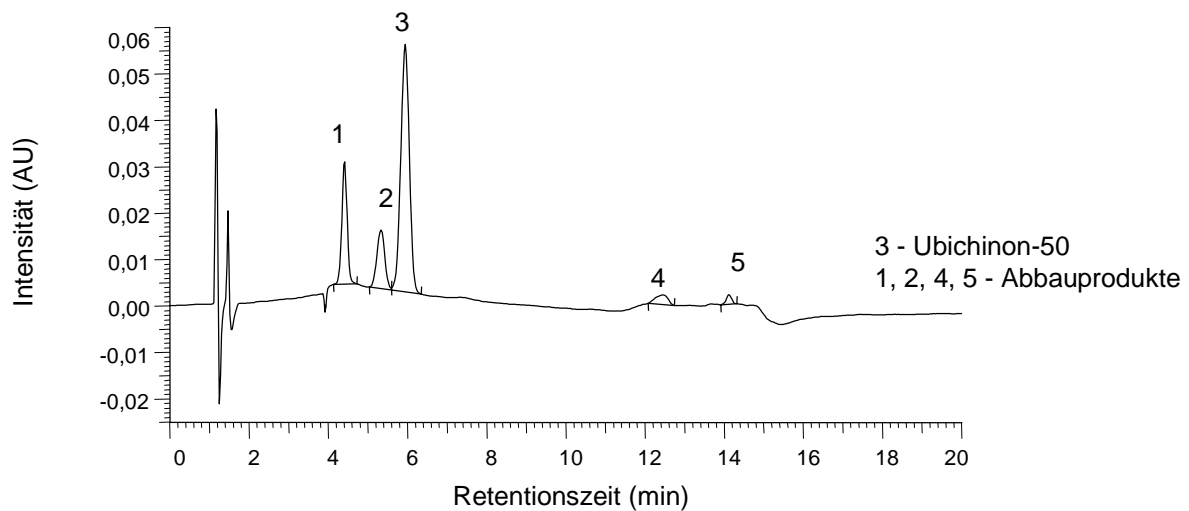
Ubichinon-50 in n-Hexan 7 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-75.**

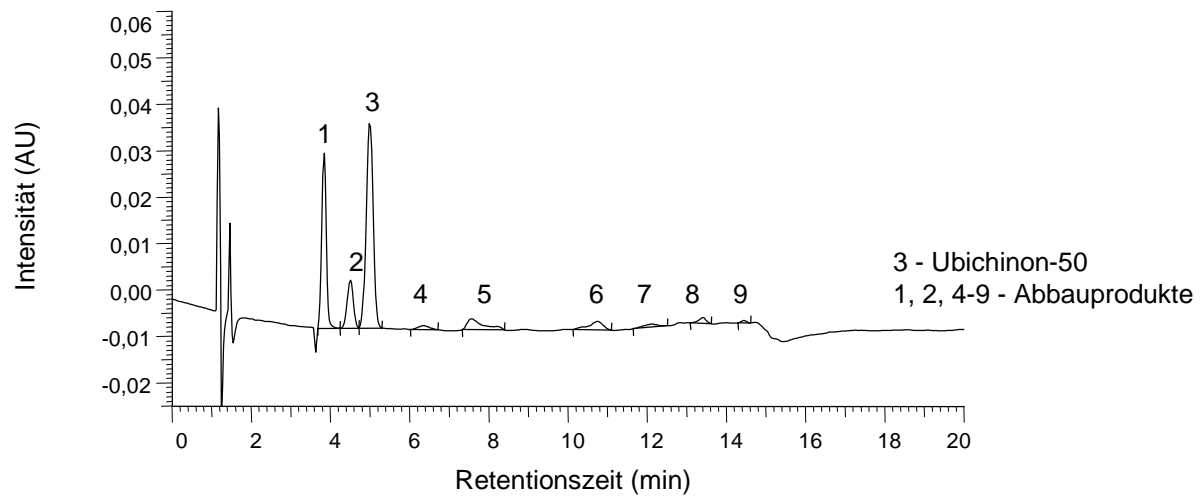
Ubichinon-50 in n-Hexan 14 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0.4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-76.**

Ubichinon-50 in n-Hexan 21 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0,4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-77.**

Ubichinon-50 in n-Hexan 28 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0,4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

**Chromatogramm 9-78.**

Ubichinon-50 in n-Hexan 35 Tage mit Sonnenlicht bestrahlt; Ausgangskonzentration = 0,4148 mg/ml; Injektionsvolumen 10 μ l, DAD = 268 nm

9.4 Chemikalien und Geräte

9.4.1 Chemikalien

Tabelle 9-12.

Verwendete Standard-Verbindungen.

Lipid-Standard	Inhaltsstoffe	Lieferant
100 mg Monoglycerid-Mischung	Monopalmitin Monostearin Monoolein	Sigma (178-8)
100 mg Diglycerid Mischung	1,2-Dipalmitin 1,3-Dipalmitin 1,2-Distearin 1,3-Distearin 1,2-Diolein 1,3-Diolein	Sigma (178-9)
100 mg Triglycerid-Mischung	Tricaprylin Tricaprin Trilaurin Trimyristin Tripalmitin	Sigma (178-11)
100 mg Triglycerid-Mischung	Tripalmitin Tristearin Triarachidin Tribehenin Trierucin	Sigma (178-12)
100 mg Triglycerid-Mischung	Tristearin Triolein Trilinolein Trilinolenin	Sigma (178-13)
50 mg Oliven Öl Standard-Mischung	Trilinolein (2 %), 1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol (4 %),	Sigma (TRI-5)

	Triolein (60 %), 1,2-Dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol (30 %), 1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol (4 %)	
100 mg neutrale Lipid-Mischung	Cholesterol Cholesteryloleat Ölsäure Ölsäuremethylester Triolein	Sigma (178-1)
5 g 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon		Sigma (D 9150)
10 mg 2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-geranyl-1,4-benzochinon		Sigma (C 8081)
100 mg Ubichinon-50		Sigma (C 9538)
250 mg Vitamin K ₁		Sigma (V 3501)
100 mg Vitamin K ₂		Sigma (V 9378)
1 g β-Carotin		Sigma (C 9750)

Tabelle 9-13.

Daten der verwendeten Standards.

Kurzform	Trivialname	Name nach IUPAC	Konzentration der Stammlösung in [mg/ml]	Lieferant
EiEiEi	Tri-11-Eicosenoin	1,2,3-Tri[<i>cis</i> -11-eicosenoyl]-glycerol	9.88	Sigma (T0752)
LaLaM	1,2-Dilauroyl-3-myristoyl-rac-glycerol	1,2-Didodecanoyl-3-tetradecanoyl-rac-glycerol	1.08	Sigma (D2907)
LaOP	1-Lauroyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	1-Dodecanoyl-2-[<i>cis</i> -9-octadecenoyl]-3-hexadecanoyl-rac-glycerol	2.96	Sigma (L0775)
LLL	Trilinolein	1,2,3-Tri[(<i>cis</i> , <i>cis</i>)-9,12-octadeca-	5.34	Sigma (T9517)

		dienoyl]glycerol		
LLO	1,2-Dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	1,2-Di[(cis,cis)-9,12-octadecadienoyl]-3-[cis-9-octadecenoyl]-rac-glycerol	0.91	Sigma (D9164)
LLP	1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	1,2-Di[(cis,cis)-9,12-octadecadienoyl]-3-hexadecanoyl-rac-glycerol	1.10	Sigma (D0301)
Mix 1 (CaCaCa, CCC, LaLaLa, MMM, PPP)	Tricaprylin, Tricaprin, Trilaurin, Trimyristin, Tripalmitin	1,2,3-Trioctanoyl-glycerol, 1,2,3-Tridecanoyl-glycerol, 1,2,3-Tridodecanoylglycerol, 1,2,3-Tritetradecanoylglycerol, 1,2,3-Trihexadecanoylglycerol	gesamt: 4.87 je: 0.974	Sigma (178-11)
Mix 2 (PPP, SSS, AAA, BBB, EEE)	Tripalmitin, Tristearin, Triarachin, Tribehenin, Trierucin	1,2,3-Trihexadecanoylglycerol, 1,2,3-Trioctadecanoylglycerol, 1,2,3-Trieicosanoylglycerol, 1,2,3-Tridocosanoylglycerol, 1,2,3-Tri[cis-13-docosenoyl]-glycerol	gesamt: 4.81 je 0.962	Sigma (178-12)
Mix 3 (SSS, OOO, LLL, LnLnLn)	Tristearin, Triolein, Trilinolein, Trilinolenin	1,2,3-Trioctadecanoylglycerol, 1,2,3-Tri[cis-9-octadecenoyl]-glycerol, 1,2,3-Tri[(cis,cis)-9,12-octadecadienoyl]glycerol,	gesamt: 4.65 je: 1.163	Sigma (178-13)

		1,2,3-Tri[(cis,cis,cis)-9,12,15-octadecatrienoyl]-glycerol		
MMLa	1,2-Dimyristoyl-3-lauroyl-rac-glycerol	1,2-Ditetradecanoyl-3-dodecanoyl-rac-glycerol	1.29	Sigma (D3032)
MMM	Trimyristin	1,2,3-Tritetradecanoylglycerol	1.26	Sigma (T5141)
MMO	1,2-Dimyristyl-3-oleoyl-rac-glycerol	1,2-Ditetradecanoyl-3-[cis-9-octadecenoyl]-rac-glycerol	5.80	Sigma (D3157)
MMP	1,2-Dimyristoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol	1,2-Ditetradecanoyl-3-hexadecanoyl-rac-glycerol	1.04	Sigma (D3282)
OOS	1,2-Dioleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	1,2-Di[cis-9-octadecenoyl]-3-octadecanoyl-rac-glycerol	1.92	Sigma (D2032)
POL	1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol	1-Hexadecanoyl-2-[cis-9-octadecenoyl]-3-[(cis,cis)-9,12-octadecadienoyl]-rac-glycerol	0.40	Sigma (P8577)
PoPoPo	Tripalmitolein	1,2,3-Tri[cis-9-hexadecenoyl]-glycerol	0.97	Sigma (T2630)
POS	1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-rac-glycerol	1-Hexadecanoyl-2-[cis-9-octadecenoyl]-3-octadecanoyl-rac-glycerol	0.75	Sigma (P2290)
PPO	1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-rac-glycerol	1,2-Dihexadecanoyl-3-[cis-9-octadecenoyl]-rac-glycerol	1.34	Sigma (D2282)

Tabelle 9-14.

Herkunft und INCI-Nomenklatur der natürlichen Fette, Öle und Wachse.

Handelsname	Name nach INCI	Hersteller/Lieferant
Avocadoöl raffiniert	Avocado Oil/Persea Gratissima	Gustav Heess GmbH
Avocadin	Avocado Oil unsaponifiables	-
Aprikosenkernöl raffiniert	Prunus Armeniaca (Apricot) Kernel Oil	Henry Lamotte
Akofine R	Hydrogenated Rape Seed Oil	Karlshamns
Akorex L	Canola Oil petitioned	Karlshamns
Super Refined Babassu Oil	Babassu Oil	Croda GmbH
Baumwollsaatöl raffiniert	Gossypium (Cotton) Seed Oil	Henry Lamotte
Bienenwachs	Cera alba	Koster Keunen
Borretschöl	Borage Seed Oil	Hoffmann-La Roche
Calendula Öl	Calendula Officinalis Oil	-
Cetiol SB 45	Butyrospermum parkii (Shea Butter)	Henkel KGaA
Medizinaldorschlebertran	Cod Liver Oil	Henry Lamotte
Meadowfoam Seed Oil	Limnanthes alba Seed Oil	Induchem AG
Erdnussöl stabilisiert	Arachis Hypogaea (Peanut) Oil	Henry Lamotte
Hagebuttenkernöl	Rose Hip Oil	-
Haselnussöl	Hazel Nut Oil	Henry Lamotte
Cutina HR Pulver	Hydrogenated Castor Oil	Henkel KGaA
Black Currant Seed Oil, Type F	Black Currant Kernel Oil	Sofinol
Black Currant Oil	Black Currant Kernel Oil	Alban Muller Internat.
Jojobaöl goldgelb	Simmondsia chinensis (Jojoba) Seed Oil	Gustav Heess GmbH
Kakaobutter	Cocoa Butter	Henry Lamotte
Raff. Kokosöl	Cocos Nucifera (Coconut) Oil	Noble & Thörl
Kürbiskernöl	Pumkin Seed Oil	Henry Lamotte
Leinöl	Linseed Oil	Henry Lamotte
Lipex 106	Shorea Stenoptera Butter	Karlshamns

Lipex 120	Canola Oil	Karlshamns
Lipex Canola-U	Canola Oil unsaponifiables	Karlshamns
Lipex 203	Mango Seed Oil	Karlshamns
Lipex 402	Hydrogenated Palm Kernel Oil	Karlshamns
Macadamianußöl	Macadamia Ternifolia Seed Oil	Henry Lamotte
Maiskeimöl	Zea Mays (Corn) Oil	Henry Lamotte
Mandelöl raffiniert	Prunus Amygdalus Dulcis (Sweet Almond) Oil	Henry Lamotte
Mohnöl	Poppy Seed Oil	Henry Lamotte
Nachtkerzenöl	Evening Primrose Oil	
Olivenöl natürlich	Olea Europaea (Olive) Fruit Oil	Henry Lamotte
Palmöl	Palm Oil/Elaeis Guineensis	Henry Lamotte
Castor Oil	Ricinus Communis (Castor) Seed Oil	Gustav Heess
Safflower Oil	Carthamus Tinctoris (Safflower) Seed Oil	Vesifact
Camellia Oil (Sasanqua Oil)	Camellia Kissi Seed Oil	Nordmann & Rassmann
Sesamöl	Sesame Oil	Henry Lamotte
Sojaöl	Glycine Soja (Soybean) Oil	Hobum
Sonnenblumenöl	Sunflower Seed Oil	Henry Lamotte
Traubenkernöl	Vitis Vinifera (Grape) Seed Oil	Henry Lamotte

Tabelle 9-15.

Herkunft und Namen weiterer kosmetischer Rohstoffe.

Handelsname	INCI-Nomenklatur	Hersteller/Lieferant
Lorol C14	Myristyl Alcohol	Henkel KGaA
Hyfatol	Cetyl Alcohol	Aarhus Oliefabrik
Nafol	Cetearyl Alcohol	Condea Chemie GmbH
Lanette 22	Behenyl Alcohol	Henkel KGaA
Eutanol G	Octyldodecanol	Henkel KGaA
Cholesterin reinst gepulvert	Cholesterol	Merck KGaA

Cetiol MM	Myristyl Myristate	Henkel KGaA
Cutina CP	Cetyl Palmitate	Henkel KGaA
Estol DCO-b	Decyl Oleate	Unichema Iberica
Coenzym Q10	Ubiquinone	Kaneka GmbH

Tabelle 9-16.

Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller	R- und S-Sätze	MAK-Wert [ml/m ³]	Gefahrensym- bol
α-Tocopherolacetat	Sigma			
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	Merck			
2-Propanol	Merck	R 11 S 7-16	200	F
3-(4'-Methyl)-benzylidenbornan-2-on	Merck			
Aceton	Merck	R 11-36-66-67 S 9-16-26	500	F, Xi
Acetonitril	Merck	R 11-23/24/25 S 16-27-45	40	F, T
Ammoniumacetat	Merck			
Butylhydroxytoluol	Merck			
Chloroform	Merck	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37	10	Xn
Dichlormethan	Merck	R 40 S 23.2-24/25-36/37	100	Xn
Diethylhexyl Butamido Triazone	Sigma			
Ethanol absolut	Merck	R 11 S 7-16	500	F
Ethylacetat	Merck	R 11-36-66-67 S 16-26-33	400	F, Xi
Ethylhexyl Triazone	BASF			

Lithiumperchlorat	Fluka	R 9-22-36/37/38		O, Xn
Methanol	Merck	R 11-23/25 S 7-16-24-45	200	F, T
Natriumacetat	Merck			
Natriumborhydrid	Merck	R 15-25-34 S 14.2-26-36/37/39- 43.6-45		F, T
Natriumdodecylsulfat	Merck	R 22 – 36/38		Xn
n-Heptan	Merck	R 11-38-50/53-65-67 S 9-19-29-33-60-61- 62	500	F, Xn, N
n-Hexan	Merck	R 11-48/20 S 9-16-24/25-29-51	50	F, Xn
p-Methoxyzimtsäure- isoamylester	Haarmann & Reimer			
p-Methoxy-zimtsäure- 2-ethylhexylester	Hoffmann La Roche			
<i>Tert</i> -Butylmethylether	Merck	R 11 S 9-16-29-43.3		F
Tetrahydrofuran	Merck	R 11-19-36/37 S 16-129-33	50	F, Xi
α -Tocopherol	Merck			

9.4.2 Geräte und Materialien

Tabelle 9-17.
Verwendete Geräte

Material	Bezeichnung	Hersteller
Aufbewahrungsboxen	Rotilabo® Kühlbox	Roth
Bestrahlungsapparatur	Suntest CPS+	Atlas
Detektoren	MSD 1100	Agilent
	FT-IR-Spektrometer IFS 66/S	Bruker

	IR-Mikroskop IFS 28	
	Sedex 55	S.E.D.E.R.E
	Coulochem II	ESA
	DAD D-4500, L-7455	Merck
Eppendorf-Cups	TabTop Microcentrifuge Tubes	Sorenson BioSciene, Inc.
Glasgeräte	Erlenmeyerkolben, Messkolben, Glasflaschen, Petrischalen,	Schott
HPLC-Anlage	Entgaser 1100 Quarternäre Pumpe 1100 Probengeber 1100 Säulenthermostat 1100	Agilent
	Interface D-6000 und L-7000	Merck
	Autosampler AS-4000, AS-2000 und L-7250 Pumpe L-6000 und L-7100	
HPLC-Säulen	Grom-Sil 120 Si NP-2, 5 µm, 150x4 mm	Grom
	Grom-Sil 120 Octyl-5 CP, 5 µm, 125x2 mm	
	LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 250x4 mm	Merck
	LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm, 250x4 mm	
	LiChrospher 100 RP-8 endcapped, 5 µm, 125x2 mm	
	PRONTOSIL 120-C18-SH, 5 µm, 150x4 mm	Bischoff
	Reposil Pur 120 ODS 3, 5 µm 150x4 mm	Dr. A. Maisch

	5 µm Hypersil BDS C18 250x4 mm	Life Science International
Kopplungsoption mit IR-Spektroskopie	LC-Transform Interface Serie 400	LabConnection
Kulturröhrchen	12 ml	Sarstedt
Kunststoffspritzen	NORM-JET (5 und 10 ml)	Heinke, Sass, Wolf
Küvetten	Präzisions-Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL	Hellma
Membranfilter	SRP 25, 0,45 µm RC 25, 0,45 µm	Sartorius
Minizentrifuge	PMS-060 Papsulefuge	Tomy Seiko Co, LTD
Objektträger		Menzel-Gläser
Pipetten	Eppendorf Reference Eppendorf Multipipette plus	Eppendorf
Schüttelmaschine	KS 10	Edmund Bühler Laborgeräte, Glas- technik, Umwelt- technik
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H	Bandelin
UV-Lampe	TL-900	Camag
UV-Spektrometer	8452 A Diode Array Spectro- photometer	Agilent
Vials mit Einsätzen	Plastic Vial 100 µl with Glass Inner Core	Supelco
Vials, Schraubkappen, Septen (PTFE)	N 8	Macherey & Nagel
Vortex Mixer	REAX top	Heidolph
Zentrifuge	EBA 3 S	Hettich

10 Literatur

- [1] A.H. Meyer, „Lebensmittelrecht Bd I“, 84. Auflage (2001), Verlag C.H. Beck München
- [2] A.H. Meyer, „Lebensmittelrecht Bd II“, 84. Auflage (2001), Verlag C.H. Beck München
- [3] W. Umbach, Parfümerie und Kosmetik 11 (1995) 690
- [4] W. Umbach, Ärztliche Kosmetologie 15 (1985) 336
- [5] Schiwy, „Arzneimittelgesetz“, 177. Ergänzungslieferung (2001), Verlag R. S. Schulz Starnberg
- [6] J. Falbe, M. Regitz, „Römpp Chemie Lexikon“, 9. Auflage (1990), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [7] Eucerin-Hautatlas Beiersdorf AG Hamburg (1998)
- [8] W. Raab, U. Kindl, „Pflegekosmetik – Ein Leitfaden“, 2. Auflage (1997), Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- [9] F. Gunstone, B.G. Herslöf, „A Lipid Glossary“, (1992), The Oily Press 3
- [10] G. Schwedt, „Taschenatlas der Analytik“, 6. Auflage (1992), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [11] J. Becart, C. Chesalier, J.P. Biesse, J. High Res. Chromatogr. 13 (1990) 126
- [12] A. Stolyhwo, M. Martin, G. Guichon; J. Liquid Chromatogr. 10 (1987) 97
- [13] W.W. Christie, J. Lipid Res. 26 (1985) 507
- [14] M. Kohler, W. Haerdi, P. Christen, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 475
- [15] M. Lipp, E. Anklam, Sem. Food Analysis 2 (1997) 191
- [16] M.F. Caboni, M.T. Rodriguez-Estrada, Sem. Food Analysis 2 (1997) 159
- [17] B.M.A. Niessen, A.P. Tinke, J. Chromatogr. 703 (1995) 37
- [18] P.E. Miller, M.B. Denton, J. Chem. Education 63 (1986) 617
- [19] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, Mass Spec. Rev. 9 (1990) 37
- [20] L. Landmann, Pharmazie i. u. Zeit 20 (1991) 155
- [21] W. Umbach, „Kosmetik“, 2. Auflage (1995), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [22] K. Mach, „Dermatologie“ 1. Auflage (1995), Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- [23] R. Niedner, J. Ziegenmeyer, „Dermatika“, 1. Auflage (1992) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

- [24] G.K. Steigleder, „Taschenatlas der Dermatologie“, 3. Auflage (1987), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [25] D.J. Gawkrödger, „Dermatologie“, 1. Auflage (1995), Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- [26] Hautforschung – Bereich Dermatologie, Beiersdorf AG Hamburg (1997)
- [27] J.S. Strauss, Comp. Biochem. Physiol. B 76 (1983) 673
- [28] R. Engler, Parfümerie und Kosmetik 10 (1989) 596
- [29] M.A. Lampe, J. Lipid Res. 24 (1983) 131
- [30] J.P. Vietzke, Dissertation (2000), Universität Hamburg
- [31] E. Proksch, Hautarzt 43 (1992) 331
- [32] M.J. Cork, J. Dermatol. Treatm. 8 (1997) 7
- [33] REM-Aufnahme der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG Hamburg (1999)
- [34] R. Engler, Parfümerie und Kosmetik 11 (1989) 67
- [35] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman „Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler“, 14. Auflage (1994), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [36] R. Stiens, „Kursbuch Kosmetik“ 1. Auflage (1998), Südwest Verlag München
- [37] D. Wundram, „Kosmetik. Chemie auf Haut und Haaren“, 1. Auflage (1988) Rowohlt Verlag GmbH Reinbek
- [38] Fachgruppe „Hautpflege“ der Deutschen Gesellschaft für wissenschaftliche und angewandte Kosmetik e.V., „Hautpflege: Produkte, Wirkung, Prüfung“, (1989) Verlag der chem. Industrie
- [39] H. Fey, I. Otte, „Wörterbuch der Kosmetik“, 3. Auflage (1991), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- [40] H. Janistyn, „Handbuch der Kosmetika und Riechstoffe, I. Band: Die kosmetischen Grundstoffe“, 3. Auflage (1978) Dr. Alfred Hüthig Verlag Heidelberg
- [41] L. Roth, K. Kormann, „Ölpflanzen – Pflanzenöle“, 1. Auflage (2000) Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG Landsberg
- [42] B. Pohle, „Die sanfte Schönheitspflege“, 1. Auflage (1988), Südwest Verlag GmbH & Co München
- [43] G. Jacini, Fette Seifen Anstrichm. 2 (1985) 57

- [44] G. Lenaz, O. Barnabei, A. Rabbi, M. Battino, „Highlights in ubiquinone research“ 1. Auflage (1990), Taylor & Francis London
- [45] K. Folkers, Y. Yamamura, „Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q, vol.5, 1. Auflage (1986) Elsevier Amsterdamm
- [46] P. Mitchell, *J. Theo. Biol.* 62 (1976) 327
- [47] A. Kröger, M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 34 (1973) 358
- [48] L. Ernster, P. Forsmark-Andrée, *Clin. Invest.* 71 (1993) 60
- [49] C.H. Lea, A. Kwietny, *Chemical Industrie* 24 (1962) 1245
- [50] A. Mellors, A.L. Tappel, *Lipids* 1 (1966) 282
- [51] A. Mellors, A.L. Tappel, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 4353
- [52] Y. Yamamura, K. Folkers, Y. Ito, „Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q, vol.2, 1. Auflage (1980), Elsevier Amsterdam
- [53] C. Lind, E. Cadenas, P. Hochstein, L. Ernster, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 287
- [54] G. Sottocasa, B. Kuylenstiema, L. Ernster, A. Bergstrand, *J. Cell Biol.* 32 (1967) 415
- [55] F.L. Crane, I.L. Sun, M.G. Clark, C. Grebing, H. Löw, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 233
- [56] K. Folkers, G. Litarru, T. Yamagami, „Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q, vol. 6“, 1. Auflage (1991) Elsevier Amsterdam
- [57] R.E. Beyer, B.A. Burnett, K.J. Cartwright, D.W. Edington, M.J. Falzon, K.R. Kreitman, T.W. Kuhn, B.J. Ramp, S.Y.S. Rhee, M.J. Rosenwasser, M. Stein, L.C.I. An, *Mech. Ageing Dev.* 32 (1985) 267
- [58] A. Kalén, B. Norling, E.L. Appelkvist, G. Dallner, *Biochim. Biophys. Acta* 926 (1987) 70
- [59] C.Q. Ye, K. Folkers, H. Tamagawa, C. Pfeiffer, *BioFactors* 1 (1988) 303
- [60] M. Podda, M.G. Traber, C. Weber, L.J. Yan, L. Packer, *Free Rad. Biol. Med.* 24 (1998) 55
- [61] J.G. Dorsey, W.T. Cooper, B.A. Siles, J.P. Foley, H.G. Barth, *Anal. Chem.* 70 (1998) 591
- [62] W.R. LaCourse, C.O. Dasenbrock, *Anal. Chem.* 70 (1998) 37
- [63] N.U. Olsson, A.J. Harding, C. Harper, N. Salem Jr., *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 213

- [64] T.C. Markello, J. Guo, W.A. Gahl, *Anal. Biochem.* 198 (1991) 368
- [65] S.L. Abidi, T.L. Mounts, T. Finn, *JAOCS* 73 (1996) 535
- [66] S.L. Abidi, T.L. Mounts, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 93
- [67] J.L. Robinson, M. Tsimidou, R. Macrae, *J. Chromatogr.* 324 (1985) 35
- [68] M.H. Bui, *J. Chromatogr. B* 654 (1994) 129
- [69] T. Heinze, G. Kynast, J.W. Dudenhausen, C. Schmitz, E. Saling, *Chromatographia* 25 (1988) 497
- [70] H. Swaczyna, A. Montag, *Fette Seifen Anstrichm.* 86 (1984) 436
- [71] G. Gutnikov, R.J. Streng, *J. Chromatogr.* 587 (1991) 292
- [72] J. Sajbidor, M. Certik, J. Grego, *J. Chromatogr. A* 665 (1994) 191
- [73] T.A. Foglia, K.C. Jones, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 20 (1997) 1829
- [74] L.R. Treiber, *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 193
- [75] W.W. Christie, R.A. Urwin, *J. High Res. Chromatogr.* 18 (1985) 97
- [76] A.H. El-Hamdy, W.W. Christie, *J. High Res. Chromatogr.* 16 (1993) 55
- [77] B. Marcato, G. Cecchin, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 83
- [78] J. Nordbäck, E. Lundberg, *J. High Res. Chromatogr.* 22 (1999) 483
- [79] T. Gunnarsson, A. Karlsson, P. Hansson, G. Johnson, C. Alling, G. Odham, *J. Chromatogr. B* 705 (1998) 243
- [80] H. Bünger, U. Pison, *J. Chromatogr. B* 672 (1995) 25
- [81] G.A. Picchioni, A.E. Watada, B.D. Whitaker, *Lipids* 31 (1996) 217
- [82] M.N. Vaghela, A. Kilara, *JAOCS* 72 (1995) 729
- [83] M.F. Caboni, S. Menotta, G. Lercker, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 59
- [84] T. Gildenast, J. Lasch, *Biochim. Biophys. Acta* 1346 (1997) 69
- [85] K. Gaudin, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, A. Tchaplá, *Chromatographia* 49 (1999) 241
- [86] T.J. McNabb, A.E. Cremesti, P.R. Brown, A.A. Fischl, *Sem. Food Anal.* 4 (1999) 53
- [87] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V., „DGF-Einheitsmethoden“, 2. Auflage (1998), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- [88] A. Karleskind, „Oils and fats manual, vol. 1 and 2“, 1. Auflage (1996), Lavoisier Publishing Paris
- [89] H.J. Fiebig, *Fette Seifen Anstrichm.* 87 (1985) 53

- [90] F. Saura-Calixto, J. Canellas, A. Garcia-Raso, *Fette Seifen Anstrichm.* 87 (1985) 4
- [91] J.L. Perrin, A. Prevot, H. Traitler, U. Bracco, *Huile de pépins de cassis* 34 (1987) 221
- [92] E. Salivaras, A.R. McCurdy, *JAOCS* 69 (1992) 935
- [93] R. A. Moreau, M.J. Powell, Conference Paper, (1997) 371
- [94] H. Morimoto, I. Imada, T. Amano, M. Toyoda, Y. Ashida, *Y. Biochem. Med.* 7 (1973) 169
- [95] B. Proksa, E. Slavikova, *Pharmazie* 45 (1990) 916
- [96] K. Hirota, M. Kawase, T. Kishie, *J. Chromatogr.* 310 (1984) 204
- [97] A. Zhiri, P. Belichard, *J. Liquid Chromatogr.* 17 (1994) 2633
- [98] S. Vadhanavikit, N. Sakamoto, A. Nobuyuki, T. Kishi, K. Folkers, *Anal. Biochem.* 142 (1984) 155
- [99] T. Okamoto, K. Fukui, M. Nakamoto, T. Kishi, N. Kanamori, K. Kataoka, S. Nishii, H. Kishi, E. Hiraoka, A. Okada, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32 (1986) 1
- [100] R. Artuch, J. Moreno, M. Quintana, R.M. Puig, M.A. Vilaseca, *Clin. Chem.* 44 (1998) 2378
- [101] K. Muratsu, J. Komorowski, S. Zong-Xuan, K. Folkers, *BioFactors* 1 (1988) 157
- [102] S. Andersson, *J. Chromatogr.* 606 (1992) 272
- [103] S. Graves, M. Sikorska, H. Borowy-Borowski, R.J.H. Ho, T. Bui, C. Woodhouse, *Meth. Molecular Biol.* 108 (1991) 353
- [104] M. Tomasetti, R. Alleva, M.D. Solenghi, G.P. Litarru, *BioFactors* 9 (1999) 231
- [105] J.K. Lang, K. Gohil, L. Packer, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 106
- [106] J.K. Lang, L. Packer, *J. Chromatogr.* 385 (1987) 109
- [107] M. Podda, C. Weber, M.G. Traber, L. Packer, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 893
- [108] S. Yamashita, Y. Yamamoto, *Anal. Biochem.* 250 (1996) 66
- [109] T. Okamoto, Y. Fukunaga, Y. Ida, T. Kishi, *J. Chromatogr.* 430 (1988) 11
- [110] P.O. Edlund, *J. Chromatogr.* 425 (1988) 87
- [111] B. Finckh, A. Kontush, J. Commentz, C. Hübner, M. Burdelski, A. Kohlschütter, *Anal. Biochem.* 232 (1995) 210
- [112] G. Grossi, A.M. Bargossi, P.L. Fiorella, S. Piazzzi, M. Battino, G.P. Bianchi, *J. Chromatogr.* 593 (1992) 217

- [113] J. Lagendijk, J.B. Ubbink, W.J. Hayward Vermaak, J. Lipid Res. 37 (1996) 67
- [114] M. Dreux, M. Lafosse, L. Morin-Allory, LC/GC International 9 (1996) 148
- [115] T.H. Morey, L.E. Oppenheimer, Anal. Chem. 56 (1984) 2427
- [116] M. Kohler, W. Haerdi, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 475
- [117] A. Stolyhwo, H. Colin, G. Guichon, Anal. Chem. 57 (1985) 1342
- [118] K. Aitzetmüller, M. Grönheim, Fat Sci. Technol. 95 (1985) 164
- [119] R.A. Mugele, H.D. Evans, Ind. Eng. Chem. 43 (1951) 1317
- [120] P. Meeren, J. Vanderdeelen, L. Baert, Anal.Chem. 64 (1992) 1056
- [121] J.M. Charlesworth, Anal. Chem. 50 (1978) 1414
- [122] S. Nukiyama, Y. Tanasawa, Trans. Soc. Mech. Eng. Japn. 5 (1939) 68
- [123] L.E. Oppenheimer, T.H. Mourey, J. Chromatogr. 323 (1985) 291
- [124] P. Montag, Analytical Visions 4 (1996) 2
- [125] Instruction Manual LC-Transform Series 400, Model 410; Lab Connections Inc. (1997)
- [126] G. Zachmann, A. Simon, Laborpraxis 4 (1986) Sonderdruck
- [127] W. Buchberger, „Elektrochemische Analyseverfahren“, 1. Auflage (1998), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- [128] M. Otto, „Analytische Chemie“, 1. Auflage (1995), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim
- [129] ESA Coulochem II Operation Manual (1997)
- [130] H. Budzikiewicz, „Massenspektrometrie. Eine Einführung“, 3. Auflage (1992), Verlagsgesellschaft mbH Weinheim
- [131] F. W. McLafferty, F. Turecek, „Interpretation von Massenspektren“, 1. Auflage (1995), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- [132] W.D. Lehmann, „Massenspektrometrie in der Biochemie“ 1. Auflage (1996) Spektrum Akadedemischer Verlag Heidelberg
- [133] Hewlett Packard Operation Manual für Serie 1100 (1998)
- [134] R. Kellner, J.M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer, „Analytical Chemistry“, 1. Auflage (1998), Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim
- [135] C.E. Wayne, R.P. Wayne, „Photochemistry“. 1. Auflage (1996), Oxford University Press New York
- [136] W. Horspool, „Organic Photochemistry“, 1. Auflage (1992), PTR Prentice Hall New York

- [137] G. Büнау von, T. Wolff, „Photochemie“, 1. Auflage (1987), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim
- [138] Betriebsanleitung Suntest CPS/CPS+ der Firma Atlas (1999)
- [139] Y. Matsuda, R. Masahara, J. Pharmac. Sci. 72 (1983) 1198
- [140] T.R. Kommuru, M. Ashraf, M.A. Kahn, I.K. Reddy, I.K. Chem. Pharm. Bull. 47 (1999) 1024
- [141] A. Lutka, J. Pawlaczyk, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research 54 (1997) 279
- [142] Y. Matsuda, R. Teraoka, Inter. J. Pharmaceutics 26 (1985) 289
- [143] H.M. Cheng, J.E. Casida, J. Labelled Compounds 6 (1970) 66
- [144] J.R. Burie, A. Boussac, C. Boullais, G. Berger, T. Mattioli, C. Mioskowski, E. Nabedryk, J. Breton, J. Phys. Chem. 99 (1995) 4059
- [145] G. Schwedt, „Chromatographische Trennmethoden“, 2. Auflage (1986), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [146] V.R. Meyer, „Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern“, 1. Auflage (1996), Hüthig GmbH Heidelberg
- [147] W. Gottwald, „RP-HPLC für Anwender“, 1. Auflage (1993), VCH Weinheim Weinheim
- [148] W. Gottwald, „Statistik für Anwender“, 1. Auflage (2000), Wiley-VCH Weinheim
- [149] M. Otto, „Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik“, 1. Auflage (1997), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim
- [150] R. Wolber, Dissertation (1996), Universität Marburg

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Alter	29 Jahre

Schulbildung

1978 – 1980	POS Martin Luther Meiningen
1980 – 1988	POS Theodor Neubauer Meiningen
1988 – 1990	Berufsausbildung mit Abitur zum Instandhaltungsmechaniker bei der VEB Wasserversorgung und Abwasserbehandlung Meiningen
1990 – 1991	Henfling Gymnasium Meiningen

Studium

10. 1991 – 12. 1996	Studium der Chemie an der Gesamthochschule Universität Kassel
07. 1993	Diplomvorprüfung
12. 1996	Diplomprüfung
01. 1997 – 10. 1997	Diplomarbeit im Fachbereich Ökologische Chemie und Ökotoxikologie der Gh Kassel
10. 1997 – 01. 1998	Studentische Mitarbeiterin im Fachbereich Physikalische Chemie der Gh Kassel

Promotion

02. 1998 – 04. 2001	Promotionsstudium bei Prof. Dr. A. Seubert in Kooperation mit der Beiersdorf AG, Hamburg
---------------------	--

