

BESTIMMUNG VON TOCOPHEROLOXIDATIONSPRODUKTEN IM HUMANSERUM

**- α -Tocopherolchinon- und α -, β -, γ - und δ -Tocopherol-Gehalte
in Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 -**

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Dagmar Pollok
aus Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing e.h. Friedrich Meuser

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. K. Rubach

Gutachter: Dr. rer. nat. H.-U. Melchert

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.06.2004

Berlin 2004

D 83

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Tocopherolen (Vitamin E) und ihren Oxidationsprodukten, wobei der Schwerpunkt bei der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten in Humanserumproben lag.

Die Methodenentwicklung konzentrierte sich auf die Bestimmung des α -Tocopherolchinons (α -TQ) als bedeutendes Oxidationsprodukt des wirksamsten und im Serum dominierenden Vertreters der Vitamin-E-Gruppe, des α -Tocopherols. Weiterhin wurde die Möglichkeit der Bestimmung der β -, γ - und δ -Tocopherolchinone (β -, γ -, δ -TQ) sowie der entsprechenden Tocopherolhydrochinone (α -, β -, γ -, δ -THQ) getestet. Hierzu erfolgte zunächst eine Synthese der Referenzsubstanzen mittels gängiger Syntheseverfahren und anschließend eine Charakterisierung der Syntheseprodukte mittels verschiedener analytischer Verfahren. Dabei wurden Daten zu deren chromatographischen Eigenschaften in der lipophilen Gelchromatographie, der Gaschromatographie (GC) und der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) sowie zu den Massenspektren der Substanzen erarbeitet, die zumindest für β -, γ - und δ -TQ und -THQ in der Literatur bisher nur sehr eingeschränkt bzw. gar nicht verfügbar sind.

Die Untersuchungen zeigten, dass eine direkte Bestimmung der Tocopherolhydrochinone im Serum aufgrund deren äußerst hoher Oxidationsempfindlichkeit nur in frischen Serumproben sinnvoll sowie nur mit sehr hohem Aufwand bei der Probenvorbereitung möglich ist. Für β -, γ - und δ -TQ wurden bei der Extraktion aus dem Serum unbefriedigende Wiederfindungsraten erzielt, deren Ursache vermutlich in einer Bildung von Addukten mit Substanzen wie Glutathion oder Proteinen liegt, wodurch diese Tocopherolchinone zumindest partiell der Bestimmung entzogen werden. Dagegen ist eine Bildung solcher Produkte beim vollständig methylierten α -TQ nicht möglich, so dass für diese Substanz hervorragende Wiederfindungsraten erzielt wurden.

Die entwickelte Bestimmungsmethode ermöglicht eine zuverlässige Analytik von α -TQ in Serumproben, wobei eventuell ebenfalls in den Proben enthaltenes α -THQ als α -TQ miterfasst wird. Die zweistufige Probenvorbereitung kombiniert eine Lipidextraktion mit einem säulenchromatographischen Reinigungsschritt an Kieselgel. Zur Messung wurde eine neuartige RP-HPLC-Methode erarbeitet, bei der durch eine Nachsäulenderivatisierung mit Hilfe eines Photoreaktors eine selektive und sensitive Bestimmung der Tocopherolchinone mittels Fluoreszenzdetektion ermöglicht wird. Die Nachweisgrenze der Messmethode für α -TQ liegt bei ca. 320 pg.

Weitere Bestandteile der Arbeit waren die Anwendung der entwickelten Methode zur Bestimmung der α -Tocopherolchinon-Gehalte für eine Auswahl von Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 sowie eine Auswertung und Interpretation der erzielten Ergebnisse. Ebenso erfolgte eine Auswertung der in einer größeren Stichprobe von Seren des Surveys bestimmten Gehalte an α -, β -, γ - und δ -Tocopherol. Dabei wurden besonders die Unterschiede zwischen den Anwendern von Vitamin-E-Präparaten und einer Kontrollgruppe von Personen ohne Vitamin-E-Einnahme untersucht.

Abstract

The central topic of this thesis are the tocopherols (vitamin E) and their oxidation products, with special emphasis on the development of a method for determination of tocopherol oxidation products in human serum samples.

Method development focused on determination of α -tocopherolquinone (α -TQ), an important oxidation product of α -tocopherol, which is the vitamin E compound with the highest biological activity and also the most abundant vitamin E compound in serum. Additionally, the possibilities for determination of β -, γ - and δ -tocopherolquinones (β -, γ -, δ -TQ) and the respective tocopherol-hydroquinones (α -, β -, γ -, δ -THQ) were evaluated. TQ and THQ reference substances were synthesized by standard synthesis procedures and analytical data for the chromatographic properties of these compounds in lipophilic gel chromatography, gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) as well as their mass spectra were acquired, that were mostly not documented in literature so far.

The further research revealed, that because of their high susceptibility to oxidation, a direct determination of THQ's would only be useful in fresh serum samples and even then would require extensive efforts to prevent oxidation during sample workup. Also, recoveries for β -, γ - and δ -TQ from serum were unsatisfactory, probably due to formation of nucleophilic adducts with compounds like glutathione or proteins, which prevent complete isolation of these TQ's from the serum matrix. On the other hand, excellent recoveries were obtained for the fully methylated α -TQ, that is not able to form such adducts.

The finally developed method allows a reliable determination of α -TQ in human serum samples, where possibly further contained α -THQ is also measured as α -TQ. The two-step sample preparation procedure combines a lipid extraction step with a clean up step on a little silica gel column. For measurement, a novel RP-HPLC method has been developed, that allows selective and sensitive fluorescence detection of tocopherolquinones after post-column derivatization by a photoreactor. The limit of detection for α -TQ is about 320 pg.

Further parts of this work were the application of the developed method to the determination of α -TQ in a subsample of serum samples from the German National Health Survey 1998 and an evaluation and discussion of the results obtained. Additionally, data for α -, β -, γ - and δ -tocopherol concentrations in serum, measured by a standard laboratory procedure in a larger subsample of the German National Health Survey 1998, are discussed with special emphasis on differences between users of tocopherol supplements and a control group of no-drug users.

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von Dezember 2000 bis November 2003 in der Abteilung Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung des Robert Koch-Instituts in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Stan von der Technischen Universität Berlin danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung in organisatorischen Fragestellungen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Rubach für die Übernahme des Koreferats und sein Interesse am Fortschreiten der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Ulrich Melchert vom Robert Koch-Institut für die Bereitstellung des Themas, das mir entgegengebrachte Interesse und Vertrauen sowie die engagierte Unterstützung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Fachgebiet 22 des RKI, vor allem den Mitarbeitern des Labors, sei an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und nicht zuletzt für die Durchführung der Routineanalysen des Surveys gedankt.

Ganz besonders danke ich Frau Ellen Pabel für die Durchführung der Tocopherol-Analytik, ihre Unterstützung bei den GC/MS-Analysen sowie die Suche nach Tippfehlern in diesem Manuskript.

Beim Robert Koch-Institut bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des RKI-Doktorandenstipendiums, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und Räumlichkeiten zur Durchführung dieser Arbeit sowie die Freigabe des Probenmaterials aus dem BGS 98.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank allen Kollegen und Freunden, die bereit waren, sich für diese Arbeit Blut abnehmen zu lassen und mir somit auch die Untersuchung einiger frischer Serumproben ermöglichten.

Auch meiner Familie danke ich für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre liebevolle Unterstützung.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Melchert, H.-U., Pollok, D., Pabel, E., Rubach, K., Stan, H.-J., Determination of tocopherols, tocopherolquinones and tocopherolhydroquinones by gas chromatography-mass spectrometry and preseparation with lipophilic gel chromatography, *J Chromatogr A*, 976 (2002) 215-220

Pollok, D., Melchert, H.-U., Analytik von Tocopherolen und ihren Oxidationsprodukten, *Forschung & Diagnostik 1* (2003) 26-28

Pollok, D., Melchert, H.-U., Determination of α -tocopherolquinone in human serum samples by HPLC with fluorescence detection and on-line post-column derivatization, *J Chromatogr A* (in press)

Vorträge

Melchert, H.-U., Pollok¹, D., Pabel, E., Rubach, K., Stan, H.-J., Determination of tocopherols and tocoquinones/-hydroquinones by GC/MS and preseparation with sephadex LH 20, Vortrag auf dem HTC-7 Symposium in Brügge, Belgien, 6.-8. Februar 2002

Pollok, D., Analytik von Tocopheroloxidationsprodukten im Humanserum, Vortrag auf der Tagung des Regionalverbandes Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft zum Themenkreis Vitamine und Ernährung, Berlin, 19. Juni 2003

Pollok¹, D., Melchert, H.-U., Determination of tocopherolquinones in human serum samples by HPLC with fluorescence detection and on-line post-column derivatization, Vortrag auf dem HTC-8 Symposium in Brügge, Belgien, 4.-6. Februar 2004

¹ Vortragende

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Danksagung	III
Veröffentlichungen	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Eigenschaften und physiologische Bedeutung der Tocopherole	2
2.1.1 Struktur und Nomenklatur von Verbindungen der Vitamin-E-Gruppe	2
2.1.2 Vorkommen von Tocopherolen	3
2.1.3 Physiologische Wirkungen der Tocopherole	3
2.1.3.1 Antioxidative Wirkungen.....	4
2.1.3.2 Nicht-antioxidative Wirkungen.....	7
2.2 Stoffwechsel der Tocopherole	8
2.2.1 Resorption und Verteilung im Organismus.....	8
2.2.2 Katabolismus und bisher bekannte Ausscheidungswege von Tocopherol- Metaboliten	9
2.3 Oxidationsprodukte der Tocopherole	11
2.3.1 Oxidationsprodukte der Tocopherole in vitro.....	11
2.3.2 Oxidationsprodukte in vivo	15
2.3.3 Physiologische Bedeutung von Tocopheroloxidationsprodukten.....	19
2.4 Analytik der Tocopherole und ihrer Oxidationsprodukte in physiologischen Matrices	21
2.4.1 Methoden der Tocopherol-Analytik	21
2.4.1.1 Klassische Methoden	21
2.4.1.2 Moderne chromatographische Methoden	21
2.4.2 Methoden zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten	24
2.4.2.1 Papier-, Dünnschicht-, Säulen- und Gelpermeationschromatographie	24
2.4.2.2 HPLC	25
2.4.2.3 HPLC/MS und GC/MS.....	27
2.4.2.4 Probenvorbereitung.....	27

3	Problemstellung	29
4	Material und Methoden	31
4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	31
4.2	Probenmaterial.....	33
4.2.1	Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys 1998.....	33
4.2.2	Serumproben freiwilliger Versuchspersonen.....	33
4.2.3	Humanpoolseren.....	34
4.3	Methoden.....	34
4.3.1	Tocopherolbestimmung in Humanserumproben mittels NP-HPLC.....	34
4.3.2	Synthese der Tocopherolchinon/-hydrochinon-Referenzsubstanzen.....	35
4.3.2.1	TQ-Synthese mit Eisen-III-chlorid (nach Schudel).....	35
4.3.2.2	TQ-Synthese mit Eisen-III-chlorid und 2,2'-Bipyridin (nach Nair).....	36
4.3.2.3	α -TQ-Synthese mit konzentrierter Salpetersäure (nach Rao).....	36
4.3.2.4	Präparative Dünnschichtchromatographie zur Reinigung der TQ-Syntheseprodukte.....	37
4.3.2.5	Tocopherolhydrochinon-Synthese mit Natriumborhydrid (nach Liebler).....	37
4.3.3	Analytische Dünnschichtchromatographie.....	38
4.3.4	Lipophile Gelpermeationschromatographie (GPC) an Sephadex LH-20.....	38
4.3.5	Tocopherolchinon/-hydrochinon Bestimmung mittels GC/FID.....	39
4.3.6	Tocopherolchinon/-hydrochinon-Bestimmung mittels GC/MS.....	40
4.3.7	Derivatisierungsmethoden.....	41
4.3.7.1	Derivatisierung mit TSIM.....	42
4.3.7.2	Derivatisierung mit Sylon BTZ.....	42
4.3.8	Tocopherolchinon/-hydrochinon-Bestimmung mittels HPLC.....	42
4.3.9	Probenvorbereitung zur Tocopherolchinonbestimmung im Serum.....	44
4.3.9.1	Extrelut-Methode.....	45
4.3.9.2	Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode.....	45
4.3.10	Bestimmung von α -Tocopherolchinon in Humanserumproben.....	45
4.3.11	Statistische Methoden zur Datenauswertung.....	46
5	Ergebnisse und Diskussion –Teil 1: Methodenentwicklung zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten im Humanserum	49
5.1	Synthese der Referenzsubstanzen.....	49
5.1.1	Tocopherolchinone.....	49
5.1.2	Tocopherolhydrochinone.....	49
5.2	Analytische Charakterisierung und Reinheitsprüfung der Referenzsubstanzen.....	50
5.2.1	Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS).....	50
5.2.2	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC/FID).....	55
5.2.3	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	55
5.2.3.1	HPLC/UV.....	55

5.2.3.2	HPLC/Fluoreszenz bzw. HPLC/ED mit Nachsäulenderivatisierung	57
5.3	Entwicklung einer geeigneten Probenvorbereitungsmethode	59
5.3.1	Test und Optimierung der chromatographischen Reinigung des Lipidextraktes ..	60
5.3.1.1	Lipophile Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20	60
5.3.1.2	Kieselgel-Säulenchromatographie	62
5.3.2	Test und Optimierung der Lipidextraktion	63
5.3.2.1	Extrelut-Methode	63
5.3.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode	64
5.4	Qualitätsparameter der entwickelten Methode zur Tocopherolchinonbestimmung im Serum.....	66
5.4.1	Linearität der Kalibrationsgeraden	67
5.4.2	Spezifität	68
5.4.3	Prüfung auf Artefaktbildung	71
5.4.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	73
5.4.5	Reproduzierbarkeit	74
5.4.5.1	Retentionszeiten.....	74
5.4.5.2	Serum-Messwerte	75
5.4.6	Wiederfindungsraten	75
5.5	Lagerstabilität der Serumproben	76
6	Ergebnisse und Diskussion – Teil 2: Auswertung der Messergebnisse	77
6.1	Tocopherole im Humanserum	77
6.1.1	Probenauswahl und Bestimmungsmethode.....	77
6.1.2	Einnahmeverhalten.....	78
6.1.3	Messwerte in den Serumproben und Einfluss der Einnahme von Vitamin-E-Präparaten	79
6.1.4	α -Tocopherol-Konzentrationen im Serum und deren Bedeutung	81
6.1.5	Vergleich mit früheren Surveys	85
6.2	α -Tocopherolchinon im Humanserum	86
6.2.1	Probenauswahl und Bestimmungsmethode.....	86
6.2.2	Messwerte in den Serumproben und Einfluss der Einnahme von Vitamin-E- Präparaten	87
6.2.3	Einfluss des α -Tocopherol-Gehaltes auf den α -TQ-Gehalt der Serumproben	88
6.2.4	Weitere Einflussfaktoren.....	90
7	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	97
	Literaturverzeichnis	107

Anhang A: Massenspektren von α-, β-, γ- und δ-TQ, -TQ-TMS und -THQ-TMS.....	119
Anhang B: Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die TQ-Bestimmung mittels HPLC/Fluoreszenz mit Nachsäulenderivatisierung (Photoreaktor).....	122
Anhang C: Übersicht über die α-TQ- und α-, β-, γ- und Tocopherol-Messwerte in der TQ-Stichprobe des BGS 98	125
Lebenslauf	128
Eidstattliche Erklärung	129

Abkürzungsverzeichnis

α -TTP	α -Tocopherol-Transfer-Protein
ABAP	2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
AMVN	2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril)
APCI	Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (engl.: atmospheric pressure chemical ionization)
ATBC-Studie	Alpha-Tocopherol-Beta-Carotin-Studie
BGS 98	Bundes-Gesundheitssurvey 1998
BHT	Butylhydroxytoluol
BLS	Bundeslebensmittelschlüssel
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CEHC	Carboxyethylhydroxychroman
CI	Chemische Ionisierung
CMBHC	Carboxymethylbutylhydroxychroman
CMHHC	Carboxymethylhexylhydroxychroman
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
DHP	Deutsche Herz-Kreislauf-Präventionsstudie
ED	Elektrochemische Detektion
EI	Elektronenstoßionisierung
engl.	englisch
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HDL	Lipoproteine hoher Dichte (engl.: high density lipoproteins)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
IE	Internationale Einheiten
IR	Infrarot
IUPAC	Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie (engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry)
konz.	konzentriert
LC	Flüssigchromatographie (engl.: liquid chromatography)
LDL	Lipoproteine geringer Dichte (engl.: low density lipoproteins)
MOF	multiples Organversagen (engl.: multiple organ failure)
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandemmassenspektrometrie

n	Anzahl
NADH	reduzierte Form des Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotids
NADPH	reduzierte Form des Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphats
NMR	Kernresonanz- (engl.: nuclear magnetic resonance)
NP	Normalphase
ODS	Octadecylsilan
p	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
PKC	Protein-Kinase-C
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RKI	Robert Koch-Institut
RP	Umkehrphase (engl.: reversed phase)
s	Standardabweichung
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
S/N-Verhältnis	Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: signal-to-noise ratio)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodiumdodecylsulfate)
SIRS	Ganzkörperentzündungssyndrom (engl. systemic inflammatory response syndrome)
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen (engl.: vascular smooth muscle cells)
SPF	ein Lipid-Transfer-Protein (engl.: Supernatant Protein Factor)
T3	Tocotrienol
TAP	Tocopherol-assoziiertes Protein
TBHQ	tert-Butylhydrochinon
TBP	Tocopherol-bindendes Protein
THQ	Tocopherolhydrochinon (engl.: tocopherolhydroquinone)
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl
Toc	Tocopherol
TQ	Tocopherolchinon (engl.: tocopherolquinone)
TQE 2	2,3-Epoxy- α -tocopherolchinon (engl.: 2,3-epoxy- α -tocopherolquinone)
TQE 1	5,6-Epoxy- α -tocopherolchinon (engl.: 5,6-epoxy- α -tocopherolquinone)
TSIM	N-Trimethylsilylimidazol
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte (engl.: very low density lipoproteins)
vs.	versus
XB	Bestimmungsgrenze
XN	Nachweisgrenze

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln natürlich vorkommender Tocopherole und Tocotrienole	2
Abbildung 2:	Reaktionen der Lipid-Peroxidation, Initiations- und Propagationsphase.....	4
Abbildung 3:	Bildung des α -Tocopheroxyl-Radikals	5
Abbildung 4:	Seitenkettenoxidation der Tocopherole am Beispiel von γ -Tocopherol.....	10
Abbildung 5:	Wichtige Oxidationsprodukte von α -Tocopherol: Bildung monomerer Produkte	13
Abbildung 6:	Wichtige Oxidationsprodukte von α -Tocopherol: Bildung von Dimeren und Trimeren	14
Abbildung 7:	Simon-Metaboliten	15
Abbildung 8:	Beispiel für einen Box-Plot; α -TQ-Gehalte in den Serumproben des BGS 98..	46
Abbildung 9:	Verteilung der α -TQ-Messwerte der Surveyproben, Histogramm für die in Klassen aufgeteilten Messwerte.....	47
Abbildung 10:	Ausschnitt aus dem Chromatogramm der GC/MS-Bestimmung der freien Tocopherolchinone (oben) und der Tocopherolhydrochinon-TMS-Derivate (unten)	50
Abbildung 11:	Massenspektrum des synthetisierten α -Tocopherolchinons mit Erläuterungen zu einigen wichtigen Fragment-Ionen.....	52
Abbildung 12:	Massenspektrum des TMS-Derivates des synthetisierten α -Tocopherol- chinons mit Erläuterungen zu einigen wichtigen Fragment-Ionen	53
Abbildung 13:	Massenspektrum des TMS-Derivates des synthetisierten α -Tocopherol- hydrochinons mit Erläuterungen zu einigen wichtigen Fragment-Ionen	54
Abbildung 14:	Vergleich der Chromatogramme einer TQ-Referenzmischung (α -, γ -, δ -TQ, 15 ng/ 50 μ l) mit Fluoreszenz- und UV-Detektion bei eingeschaltetem bzw. ausgeschaltetem Photoreaktor.....	58
Abbildung 15:	Sephadex LH-20 Elutionsdiagramm einer Referenzmischung aus 6,5 mg Triolein (1), 5,7 mg Cholesterylpalmitat (2), 80 μ g α -Tocopherolchinon (3), 400 μ g α -Tocopherol (4), 1 mg β -Tocopherol (5), 1 mg δ -Tocopherol (6) und 2,8 mg Cholesterin (kein Peak)	61
Abbildung 16:	HPLC-Chromatogramm eines Survey-Serumextraktes, Probenvorbereitung und Messung nach Abschnitt 4.3.10	66
Abbildung 17:	Kalibrationsgerade für α -TQ	67

Abbildung 18:	Summierte Ionenspur m/z 263-265 der GC/MS-MS Messung der gesammelten α -TQ-HPLC-Fraktion von Serumextrakten nach Silylierung mit TSIM (oben); Tochterionenscan des Ions m/z 293 aus dem Peak des silylierten Serumextraktes (Mitte) sowie dem Peak des α -TQ-TMS-Standards (unten) ...	69
Abbildung 19:	Vergleich der α - und γ -Tocopherol-Gehalte in den Serumproben der Nehmer und Nichtnehmer	80
Abbildung 20:	Mittlere α -Tocopherol-Konzentrationen bei Nehmern und Nichtnehmern in den untersuchten Serumproben der Surveys im Zeitraum 1984-1998	85
Abbildung 21:	Mittlere α -Tocopherol-Konzentrationen bei Nehmern und Nichtnehmern in den neuen („Ost“) und alten („West“) Bundesländern in den Jahren 1991 und 1998.....	86
Abbildung 22:	Vergleich der α -TQ-Konzentrationen im Serum der Nehmer und Nichtnehmer	88
Abbildung 23:	Zusammenhang zwischen dem α -Tocopherol- und dem α -TQ-Gehalt in den Serumproben der TQ-Stichprobe	89
Abbildung 24:	Vergleich des α -TQ/ α -Toc-Quotienten im Serum der Nehmer und Nichtnehmer	89
Abbildung 25:	Boxplots für den α -TQ/ α -Toc-Quotienten der in Quintile aufgeteilten TQ-Stichprobe.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Relative Affinitäten des α -Tocopherol-Transfer-Proteins für verschiedene Tocopherole und Tocopherol-Analoga (in vitro) [80]	9
Tabelle 2:	Retentionszeiten für die Tocopherole in der NP-HPLC	35
Tabelle 3:	GPC-Elutionsvolumina von Referenzsubstanzen	39
Tabelle 4:	Retentionszeiten der Tocopherolchinone und -hydrochinone bzw. ihrer TMS-Derivate bei Verwendung des GC/FID-Systems	40
Tabelle 5:	Retentionszeiten der Tocopherolchinone und -hydrochinone bzw. ihrer TMS-Derivate bei Verwendung des GC/MS-Systems	41
Tabelle 6:	Retentionszeiten der Tocopherolchinone und -hydrochinone bei Verwendung des HPLC/UV/Fluoreszenz-Systems mit Nachsäulenderivatisierung	44
Tabelle 7:	Schematische Darstellung einer Vierfeldertafel	48
Tabelle 8:	Mittlere Wiederfindungsraten bei der Kieselgelfraktionierung von dotiertem Serumextrakt	62
Tabelle 9:	Wiederfindungsraten der Tocopherolchinone bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Wasser und anschließender Kieselgelfraktionierung	64
Tabelle 10:	Mit dem „Eichkurvenverfahren“ ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Tocopherolchinonbestimmung	74
Tabelle 11:	Retentionszeiten für α -TQ in Standardlösungen innerhalb verschiedener Zeiträume	74
Tabelle 12:	Reproduzierbarkeit der α -TQ-Bestimmung in Serumproben	75
Tabelle 13:	Wiederfindungsraten für die Tocopherolchinone in dotierten Poolserumproben ...	75
Tabelle 14:	Einfluss der Lagerung bei – 35°C auf den α -TQ-Gehalt frischer Serumproben	76
Tabelle 15:	Vergleich von Personenzahl, Geschlechtsverteilung und Altersdurchschnitt im BGS 98 und in der Unterstichprobe für die Tocopherolbestimmung	78
Tabelle 16:	Tocopherolgehalte in den Serumproben der Nehmer und Nichtnehmer	79
Tabelle 17:	Unterschiede der Tocopherol-Serumkonzentrationen zwischen Anwendern niedrig und höher dosierter Tocopherolpräparate	81
Tabelle 18:	Studienzeiträume und Zahl der Studienteilnehmer der deutschen Gesundheitssurveys im Zeitraum 1984-1998	85
Tabelle 19:	Vergleich von Personenzahl, Geschlechtsverteilung und Altersdurchschnitt der Teilnehmer des BGS 98 sowie der Unterstichproben für die Bestimmung der Tocopherole und des α -Tocopherolchinons (α -TQ)	87

Tabelle 20: α -TQ-Gehalte in den Serumproben der Nehmer und Nichtnehmer	87
Tabelle 21: Vergleich der Prävalenz von Herzerkrankungen im höchsten (5.) Quintil und im 1.-4. Quintil der anhand des α -TQ/ α -Toc-Quotienten unterteilten TQ-Stichprobe.....	92
Tabelle 22: Vergleich der α -TQ-Konzentrationen und α -TQ/ α -Toc-Quotienten in den Serumproben des BGS 98 und in frischen Vergleichsproben.....	93

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung des Robert Koch-Instituts (RKI) durchgeführt. Die Arbeitsgruppe Arzneimittelepidemiologie dieser Abteilung beschäftigt sich bereits seit längerem u.a. mit Fragen des Einnahmeverhaltens von Vitamin-E-Präparaten in der deutschen Bevölkerung sowie der Bestimmung der Gehalte an α -, β -, γ - und δ -Tocopherol in Serumproben der großen deutschen Gesundheitssurveys.

Die Exposition der Bevölkerung gegenüber den Tocopherolen (Vitamin E) hat sich in den letzten Jahrzehnten erheblich verändert. Während die Vitamin-E-Zufuhr früher im Wesentlichen durch das natürliche Tocopherolmuster aus den konsumierten Lebensmitteln bestimmt wurde, hat in den letzten Jahren die Zufuhr von synthetischem (racemischem) bzw. aus dem Destillat von Pflanzenölen gewonnenem natürlichem RRR- α -Tocopherol stark zugenommen. Aufgrund massiver Werbekampagnen einzelner Pharmafirmen sowie der vermuteten Wirksamkeit von Vitamin E bei der Prävention zahlreicher Zivilisationskrankheiten ist die Zahl der Anwender von Vitamin-E (α -Tocopherol)- bzw. Multivitaminpräparaten in Deutschland wie auch in anderen Industrieländern in den letzten Jahrzehnten stark gestiegen. Durch den zunehmenden Einsatz von α -Tocopherol als Zusatzstoff in der Nahrungsmittelindustrie, als Hilfsstoff in Arzneimitteln [184] sowie als Bestandteil von Kosmetika hat die Exposition der Bevölkerung gegenüber α -Tocopherol ebenfalls erheblich zugenommen. Auch der vermehrte Einsatz von α -Tocopherol als Additiv in Tierfuttermitteln führt vermutlich über eine Steigerung der α -Tocopherol-Gehalte in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs zu einer erhöhten α -Tocopherol-Zufuhr. Die Größenordnung der Verwendung von synthetischem α -Tocopherol wird schon durch die Produktionsziffern der BASF verdeutlicht, die im Jahr 2001 ankündigte, ihre Produktionskapazität für Vitamin E bis 2004 auf jährlich 20.000 t zu verdoppeln, um dem steigenden Bedarf für die Tierernährung sowie für die Herstellung von Lebensmitteln und Kosmetika nachzukommen [238].

Die vermehrte α -Tocopherol-Zufuhr spiegelt sich auch in den Serumkonzentrationen von α -Tocopherol in der deutschen Bevölkerung wider. Bereits bei den im Zeitraum von 1984-1991 durchgeführten epidemiologischen Studien (Surveys) im Rahmen der Deutschen Herz-Kreislauf-Präventionsstudie wurde ein deutlicher Anstieg des durchschnittlichen α -Tocopherol-Gehaltes im Serum der untersuchten Bevölkerungsstichproben beobachtet [137].

Im Rahmen des vom RKI durchgeführten Bundes-Gesundheitssurveys 1998 (BGS 98), des ersten gesamtdeutschen Gesundheitssurveys, wurden erneut die Tocopherolgehalte in einer Auswahl von Serumproben untersucht. Die Tocopherolanalytik bzw. insbesondere eine Auswertung der gewonnenen Daten sind Bestandteile der vorliegenden Arbeit. Der wesentliche Schwerpunkt der Arbeit liegt jedoch bei der Entwicklung einer Bestimmungsmethode für Oxidationsprodukte der Tocopherole, speziell des α -Tocopherolchinons, im Humanserum und der Applikation der Methode auf eine Auswahl von Serumproben des BGS 98.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Eigenschaften und physiologische Bedeutung der Tocopherole

2.1.1 Struktur und Nomenklatur von Verbindungen der Vitamin-E-Gruppe

Bei den Tocopherolen handelt es sich um eine Gruppe lipophiler Antioxidanzien, die gemeinsam mit den strukturell eng verwandten Tocotrienolen unter der Bezeichnung Vitamin E zusammengefasst werden. Es sind Methyl-derivate des Tocols, des 2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyl-tridecyl)-chroman-6-ols. In Abhängigkeit von der Anzahl und Stellung der Methylgruppen am aromatischen Ring des Tocols werden vier verschiedene natürlich vorkommende Tocopherole unterschieden (α , β , γ , δ). Die Tocotrienole, bei denen eine analoge Unterteilung erfolgt, weisen im Gegensatz zu den Tocopherolen drei Doppelbindungen in der Isoprenoid-Seitenkette auf. Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die Struktur natürlich vorkommender Tocopherole und Tocotrienole.

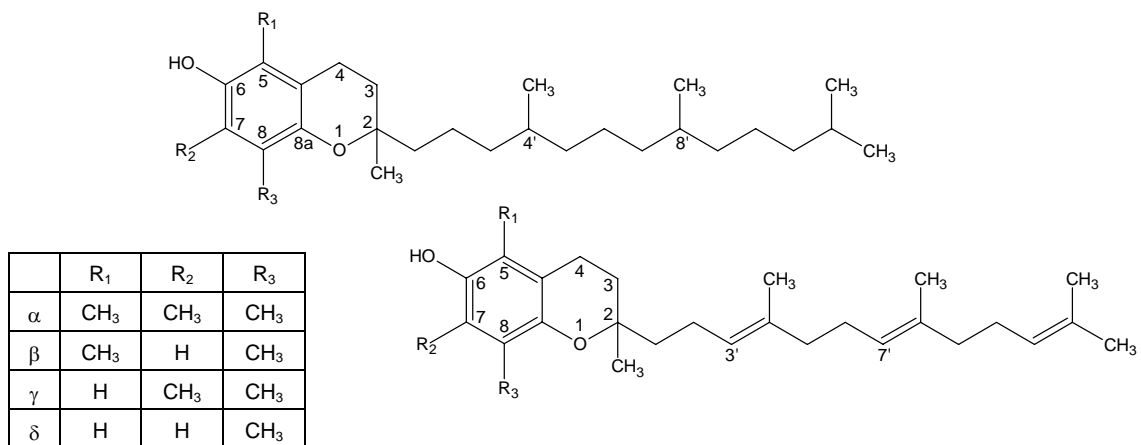


Abbildung 1: Strukturformeln natürlich vorkommender Tocopherole und Tocotrienole

In der älteren Literatur finden sich gelegentlich Hinweise auf weitere Tocopherole unter den Bezeichnungen ξ_1 -, ξ_2 -, ϵ - und η -Tocopherol, deren Vorkommen in Palmöl, Weizenkleie oder Reis beschrieben wurde. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich hierbei um die Tocotrienole handelte [101].

Das Tocopherolmolekül weist drei chirale Zentren (an Position 2,4',8') in der Isoprenoid (Phytyl)- Seitenkette auf, wodurch acht Stereoisomere möglich werden. Während es sich bei natürlich vorkommendem Vitamin E stets um die 2D,4'D,8'D- (oder kurz: RRR)- Isomere handelt, bestehen synthetisch hergestellte Tocopherole in Abhängigkeit vom Syntheseweg in der Regel entweder aus einer Mischung von acht möglichen Stereoisomeren (all-rac-Tocopherol) oder den Epimeren an Position 2 (2RS,R,R-Tocopherol, auch 2-ambo-Tocopherol) [97].

Gemäß IUPAC-Nomenklatur [88] erfolgt die Benennung von Tocopherolen mit nicht spezifizierter Konfiguration als Methyltocol (5,7,8-Trimethyltocol, 5,8-Dimethyltocol usw.). Gebräuchlicher sind aber die Bezeichnungen α -, β -, γ - und δ -Tocopherol.

Die Tocotrienole haben lediglich ein chirales Zentrum an C-2, so dass nur 2R- und 2S-Stereoisomere möglich sind. Andererseits können jedoch durch die Doppelbindungen an Position 3' und 7' geometrische cis/trans-Isomere auftreten.

2.1.2 Vorkommen von Tocopherolen

Tocopherole kommen in fast allen Lebensmitteln vor. Besonders hohe Gehalte weisen verschiedene Pflanzenöle, Ölsaaten und Nüsse auf. Geringere Mengen sind auch in Gemüse und Obst sowie in tierischen Lebensmitteln wie Fleisch, Eiern, Butter und Käse enthalten. Während in den tierischen Lebensmitteln fast ausschließlich α -Tocopherol vorkommt, dominieren in pflanzlichen Produkten in der Regel γ -Tocopherol und α -Tocopherol. Weiterhin sind häufig auch geringe Mengen, seltener sogar erhebliche Mengen (z.B. Soja-, Weizenkeim- und Walnussöl), an δ -Tocopherol enthalten, während das Vorkommen von β -Tocopherol und den Tocotrienolen seltener ist. Letztere sind aber z.B. im Palmöl und Weizenkeimöl sowie einigen Getreideprodukten (z.B. Weizenkleie) in recht hoher Konzentration vorhanden [52,193].

Neben den natürlichen Tocopherolquellen hat in der menschlichen Ernährung in den letzten Jahrzehnten die Zufuhr von synthetischem oder aus Pflanzenölen isoliertem α -Tocopherol stark an Bedeutung gewonnen. Dieses findet, teilweise auch in Form des entsprechenden α -Tocopherolacetats oder weiterer Derivate, sowohl in pharmazeutischen Präparaten und Nahrungsergänzungsmitteln als auch als Zusatzstoff in Lebensmitteln, Kosmetika und Tierfuttermitteln zunehmende Verwendung.

2.1.3 Physiologische Wirkungen der Tocopherole

Bereits 1922 beschrieben Evans und Bishop [53] die Bedeutung eines bisher unbekanntes essenziellen Ernährungsfaktors für die Fortpflanzung von Ratten, der später den Namen Tocopherol erhielt und als Vitamin E in die Gruppe der Vitamine eingereiht wurde. In den folgenden Jahrzehnten wurde eine Reihe weiterer Vitamin-E-Mangelsymptome bei Tieren beschrieben, wobei es sich im Wesentlichen um Funktionsstörungen im Bereich der Skelettmuskulatur, des Nervensystems und des kardiovaskulären Systems handelte [52]. Beim Menschen wurden ernährungsbedingte Vitamin-E-Mangelsymptome, mit Ausnahme von hämolytischer Anämie und Retinopathie bei zu früh geborenen Säuglingen, bisher nicht beobachtet [20]. Dies ist mit der hohen Speicherkapazität im Organismus (insbesondere im Fettgewebe) zu erklären, mit der eine vorübergehende Vitamin-E-Mangelversorgung über mehrere Monate hinweg gut ausgeglichen werden kann [14,52]. Ausgeprägte Erscheinungen eines Vitamin-E-Defizits werden jedoch bei Personen mit intestinalen Malabsorptionserscheinungen oder genetischen Störungen des Lipidstoffwechsels beobachtet. So können seltene genetische Defekte wie die A-Beta-Lipoproteinämie oder Defekte des α -Tocopherol-Transfer-Proteins (vgl. Abschnitt 2.2.1), aber auch intestinale Absorptionsstörungen in Verbindung mit Erkrankungen wie Cholestase oder Mukoviszidose zu massiven neurologischen Störungen führen. Zu nennen sind hier insbesondere die zerebellare Ataxie (Störung im Kleinhirn verbunden mit Bewegungsstörungen), Dysarthrie (Sprachstörungen), geistige Zurückgebliebenheit und der Verlust von

Sehnenreflexen. Weiterhin werden Symptome wie Skelettmuskel-Myopathie, Retinitis Pigmentosa und eine verringerte Stabilität der Erythrozyten beobachtet [52,5,20].

Trotz intensiver Forschungen in den acht Jahrzehnten seit der „Entdeckung“ des Vitamin E ist seine Funktion und Wirkungsweise noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Inzwischen sind unzählige Publikationen erschienen, die sich mit der Strukturaufklärung, Biosynthese oder chemischen Totalsynthese der Tocopherole beschäftigen, die Informationen über Vitamin-E-Mangelerscheinungen bei verschiedenen Tierspezies zusammentragen oder sich mit den vielfältigen physiologischen Funktionen und Hypothesen über die Wirkungsweise von Vitamin E sowie dem potenziellen Nutzen (aber auch den eventuellen Risiken) einer Vitamin-E-Supplementation im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen auseinandersetzen. Während man anfangs im Wesentlichen von antioxidativen Wirkungsmechanismen des Vitamin E ausging, wurden in den letzten Jahren vermehrt Arbeiten publiziert, die sich mit offensichtlich nicht-antioxidativen Wirkungen der Tocopherole beschäftigen. Die Fülle der vorhandenen Literatur spiegelt sich auch in der umfangreichen Literaturliste der vorliegenden Arbeit wider.

2.1.3.1 Antioxidative Wirkungen

Vitamin E, besonders in Form von α -Tocopherol, gilt als das wichtigste lipidlösliche, radikalkettenbrechende Antioxidationsmittel in biologischen Systemen. Es kann eine Lipid-Peroxidation verhindern oder verzögern und damit insbesondere zum Schutz und zur Stabilisierung von Biomembranen beitragen. Zusätzlich dient es dem Schutz weiterer oxidationsempfindlicher Zellbestandteile vor dem Angriff freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies.

Besonders empfänglich für eine Lipid-Peroxidation sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membran-Phospholipide und der zirkulierenden Lipoproteine im Blutplasma. In einer Initiationsreaktion (z.B. mit freien Radikalen) wird dabei zunächst das Allyl-Radikal (L^{\bullet}) gebildet. Dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff rasch zum Lipid-Peroxyradikal (LOO^{\bullet}). Das entstandene Lipid-Peroxyradikal ist wesentlich reaktionsfähiger als der Sauerstoff selbst und kann eine Radikalkettenreaktion propagieren (Abbildung 2) [52].

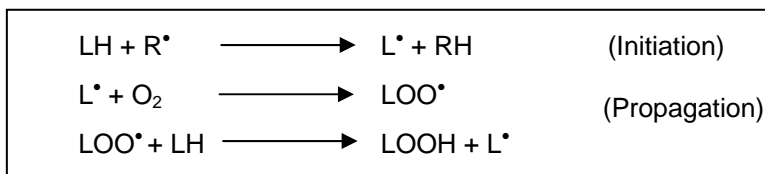
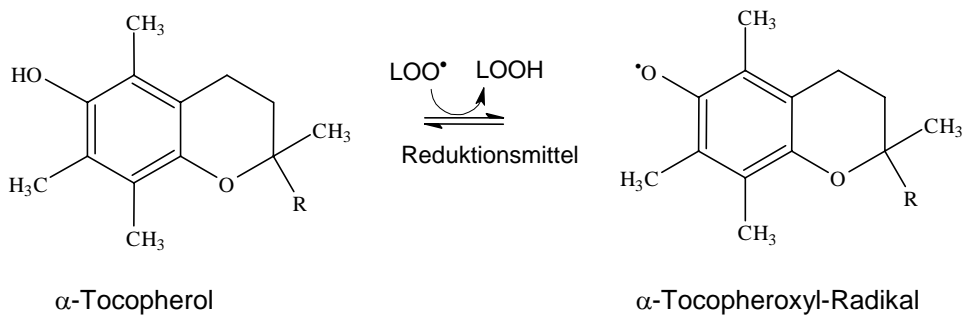


Abbildung 2: Reaktionen der Lipid-Peroxidation, Initiations- und Propagationsphase

Der Schutzmechanismus des Vitamin E beruht hauptsächlich auf der Reaktion der phenolischen Hydroxyl-Gruppe des Tocopherols mit den gebildeten Lipid-Peroxy-Radikalen (LOO^{\bullet}), wobei das Lipid-Hydroperoxid ($LOOH$) und das Tocopheroxy-Radikal entstehen (Abbildung 3) [196]. Durch die Bildung des resonanzstabilisierten Tocopheroxy-Radikals wird die Radikalkettenreaktion effektiv unterbrochen; das organische Hydroperoxid kann über nicht-radikalische Reaktionen zur unproblematischen Hydroxylverbindung umgesetzt werden [196,75].

Abbildung 3: Bildung des α -Tocopheroxyl-Radikals

Um einen biologisch stabilen Zustand aufrechtzuerhalten, ist es erforderlich, dass das gebildete Tocopheroxyl-Radikal wieder zum entsprechenden Tocopherol reduziert wird. Dies kann vermutlich sowohl durch nichtenzymatische als auch durch enzymatische Recycling-Reaktionen geschehen [164]. Das Zusammenspiel der verschiedenen zellulären Antioxidanzien und antioxidativen Enzymsysteme beim Schutz vor oxidativem Stress ist jedoch äußerst komplex und vor allem die in vivo ablaufenden Reaktionen wurden bisher nicht befriedigend geklärt. Zahlreiche in vitro Experimente lassen jedoch vermuten, dass eine Reduktion des Tocopheroxyl-Radikals durch weitere zelluläre Antioxidanzien wie z.B. Ascorbinsäure (Vitamin C) [163,44,164,69,25], Glutathion [121,49,164] oder Ubichinol [96,147] möglich ist und somit synergistische Wirkungsmechanismen zwischen den verschiedenen Antioxidanzien auch in vivo eine Rolle spielen könnten. Während im Zusammenspiel zwischen Vitamin E und Vitamin C eine direkte Interaktion zwischen den Redoxpartnern an der Phasengrenze zwischen Lipidkompartiment und wässrigem Kompartiment der Zelle angenommen wird [163,164], deuten die Ergebnisse der Untersuchungen mit Ubichinol darauf hin, dass dieses seine Recycling-Aktivität im Zusammenspiel mit NAD(P)H-abhängigen Enzymen der Elektronen-Transportkette entfaltet [96,164]. Inwiefern Glutathion am direkten oder enzymatischen Recycling des Tocopheroxyl-Radikals beteiligt ist, ist ebenfalls weitgehend unklar. Es wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass Glutathion ein Substrat einer Vitamin-E-regenerierenden Radikal-Reduktase sein könnte [176]. Weiterhin ist Glutathion wahrscheinlich in der Lage, Dehydroascorbat oder Semidehydroascorbat zum Ascorbat zu reduzieren und über diesen Mechanismus die ascorbat-abhängige Vitamin-E-Regeneration zu unterstützen [164].

Aufgrund seiner antioxidativen Wirkung wird ein präventiver oder auch kurativer Effekt des Vitamin E bei einer Reihe von Erkrankungen vermutet, die mit erhöhtem oxidativen Stress, also einem Ungleichgewicht zwischen Prooxidanzien und antioxidativen Schutzmechanismen [62], in Verbindung stehen. Hierzu zählen neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs auch akute und chronische Entzündungsprozesse, Diabetes mellitus, Katarakt (Grauer Star), Mukoviszidose oder neurologische Erkrankungen wie die Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung [135,20].

Die größte Beachtung fand bisher eine mögliche Bedeutung von α -Tocopherol bei der Prävention und Behandlung der Arteriosklerose und den damit verbundenen kardiovaskulären

Erkrankungen. Große Hoffnungen wurden in dieser Hinsicht durch die Ergebnisse einiger großer epidemiologischer Studien geweckt, die deutliche Hinweise auf ein verringertes Risiko für koronare Herzerkrankungen bei erhöhter Vitamin-E-Zufuhr lieferten [183,202,117]. Auch eine Auswertung des Zusammenhanges zwischen den mittleren Plasma- α -Tocopherol-Gehalten und der Sterblichkeit an koronaren Herzerkrankungen in verschiedenen europäischen Populationen zeigte eine starke inverse Korrelation zwischen dem Median der α -Tocopherol-Konzentration und der Sterblichkeit an koronaren Herzerkrankungen [62]. Im Gegensatz dazu ergaben verschiedene Interventionsstudien, die den Einfluss einer α -Tocopherol-Supplementation auf kardiovaskuläre Erkrankungen testeten, zum Teil widersprüchliche Resultate, die keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich einer eventuellen positiven Wirkung der Vitamin-E-Supplementation auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zulassen [51,204,64,17,254].

Diskutiert werden auch mögliche prooxidative Wirkungen einer hochdosierten α -Tocopherol-Supplementation unter speziellen Bedingungen in vivo und die eventuelle Notwendigkeit der gleichzeitigen Gabe von Ko-Antioxidanzien, wie z.B. Vitamin C, um solche Effekte zu verhindern [154,159,226,182]. Ebenfalls ungeklärt ist bisher die Relevanz der Beobachtung, dass hohe Serum- (bzw. Plasma-) Konzentrationen an α -Tocopherol, wie sie insbesondere durch die übliche Vitamin-E-Supplementation in Form von α -Tocopherol erzielt werden, mit reduzierten Gehalten an β - und γ -Tocopherol korrelieren [72,9,137,161]. Da in letzter Zeit vermehrt spezifische physiologische Wirkungen des γ -Tocopherols beschrieben wurden, könnte sich eine solche Reduktion der γ -Tocopherol-Gehalte im Organismus als nachteilig erweisen. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang z.B. die Fähigkeit des γ -Tocopherols, über seine unsubstituierte 5-Position am Chromanring reaktive Stickstoff-Spezies wie NO_2 oder Peroxynitrit abzufangen [32,29]. Ebenso haben epidemiologische Studien gezeigt, dass höhere Plasma- γ -Tocopherol-Konzentrationen mit einem reduzierten Risiko für Darmkrebs korrelieren [74] und dass bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen der Plasmaspiegel an γ -Tocopherol (aber nicht der von α -Tocopherol) signifikant geringer ist als bei gesunden Kontrollpersonen [160,110]. Jiang et al. haben kürzlich nachgewiesen, dass γ -Tocopherol und sein Metabolit γ -CEHC (vgl. Abbildung 4, Seite 10) eine deutlich stärkere Hemmung der Cyclooxygenase-2-(COX-2)-Aktivität bewirken als α -Tocopherol [91]. Da die Cyclooxygenase-katalysierte Prostaglandin-Synthese ein wesentliches Ereignis im Frühstadium von Entzündungsprozessen ist, spielt γ -Tocopherol somit möglicherweise eine Rolle bei der Prävention von Erkrankungen, die mit Entzündungsprozessen einhergehen [93]. Der genaue Mechanismus der COX-2-Inhibition ist noch unklar, jedoch handelt es sich hier offensichtlich nicht um einen einfachen antioxidativen Effekt, da die Wirkung der verschiedenen Tocopherole nicht mit der Reihenfolge ihrer antioxidativen Kapazität korreliert. Auch für das α -Tocopherol wurden verschiedene nicht-antioxidative Wirkungsmechanismen beschrieben, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

2.1.3.2 Nicht-antioxidative Wirkungen

Schon die Identifizierung verschiedener Proteine mit spezifischer Affinität für α -Tocopherol, wie zunächst des α -Tocopherol-Transfer-Proteins (α -TTP) und später des Tocopherol-assoziierten Proteins (TAP) und des Tocopherol-bindenden Proteins (TBP) (vgl. Abschnitt 2.2.1), lieferte Argumente gegen eine rein unspezifische antioxidative Rolle des α -Tocopherols im tierischen und menschlichen Organismus. Inzwischen mehren sich die Erkenntnisse, dass die Wirkungen von α -Tocopherol im Zusammenhang mit verschiedenen degenerativen Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose oder Krebs, nicht allein durch antioxidative Wirkungen, sondern auch durch spezifische Beeinflussung zellulärer Signalkaskaden und der Regulation der Expression einiger Gene auf der Ebene der Transkription zu erklären sind.

Ein besonderer Stellenwert kommt der Inhibition der Protein-Kinase-C (PKC) durch α -Tocopherol zu. Die Inaktivierung von PKC erfolgt dabei vermutlich indirekt über die Aktivierung der Protein-Phosphatase-2A durch α -Tocopherol, die eine Dephosphorylierung von PKC bewirkt [178]. Die Protein-Kinase-C gehört zu einer Familie von Isoenzymen, die eine entscheidende Rolle in zellulären Signalkaskaden spielen. So ist die PKC-Inhibition vermutlich das verbindende Element bei einer Reihe von zellulären Ereignissen, an deren Regulation α -Tocopherol beteiligt ist. Dazu gehören u.a. die Zell-Proliferation (z.B. die Inhibition der Proliferation der glatten Gefäßmuskulzellen [215]), die Zell-Adhäsion (Inhibition der Expression von Adhäsions-Molekülen [253]), die Modulation der Immunfunktion [143] wie auch die Inhibition der Thrombozytenaggregation [56]. Vermutlich PKC-unabhängig ist dagegen die Regulation der Expression verschiedener Gene, wie z.B. der Scavenger-Rezeptoren CD 36 und SR-A, der Collagenase und einiger Integrine [7]. Da eine ausführliche Erörterung dieser Zusammenhänge den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde, sei an dieser Stelle auf einige aktuelle Übersichtsartikel zu diesem Thema verwiesen [156,179,7,20].

Neueste Forschungsergebnisse werfen Fragen bezüglich möglicher Wechselwirkungen einer hochdosierten Vitamin-E-Supplementation mit dem Xenobiotika-Metabolismus auf. So haben z.B. Untersuchungen von Landes et al. [119] gezeigt, dass die verschiedenen Vertreter der Vitamin-E-Gruppe in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage sind, den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) zu aktivieren. PXR vermittelt die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Gene, wie beispielsweise der Gene für verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme, die am hepatischen Metabolismus einer Vielzahl von Xenobiotika beteiligt sind. Dies kann sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben – einerseits kann ein aktives System des Xenobiotika-Metabolismus vor Schäden durch ungesunde Nahrungsinhaltsstoffe oder Umweltgifte schützen, andererseits kann die Wirkung von eingenommenen Medikamenten durch deren beschleunigten Metabolismus beeinträchtigt werden [21].

2.2 Stoffwechsel der Tocopherole

2.2.1 Resorption und Verteilung im Organismus

Forschungsergebnisse zum Thema der Resorption und Distribution der Tocopherole im Organismus sind zahlreich und bereits in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst worden [223,19,239,75]. Demnach ist die Resorption der Tocopherole eng verknüpft mit den Prozessen der Verdauung und Resorption der Nahrungsfette. Enzyme der Bauchspeicheldrüse und Gallensäuren ermöglichen die Triglyceridhydrolyse und die Bildung von Micellen, in die auch die Tocopherole und andere hydrophobe Moleküle eingebunden werden und mit diesen im Dünndarm resorbiert werden. In den Intestinalzellen erfolgt eine Resynthese von Triglyceriden und die Bildung von Lipoproteinpartikeln, den Chylomikronen, mit denen die Nahrungsfette und lipophile Begleitsubstanzen wie die Tocopherole über das Lymphsystem in den Blutkreislauf und zur Leber gelangen. Auf dem Weg zur Leber unterliegen die Chylomikronen bereits einem partiellen Katabolismus, wobei die Lipoproteinlipase des Kapillarendotheliums durch ihre hydrolytische Aktivität die Aufnahme von Produkten der Triglyceridhydrolyse (freie Fettsäuren, Glycerin), aber auch den Transfer eines Teils der transportierten Tocopherole in die extrahepatischen Gewebe ermöglicht. Ebenso kann ein partieller Transfer der in den Chylomikronen transportierten Tocopherole zu anderen zirkulierenden Lipoproteinen (v.a. HDL) erfolgen. Der Hauptteil der resorbierten Tocopherole gelangt jedoch mit den Chylomikron-Resten in die Leber.

Wie Experimente mit Deuterium-markierten α - und γ -Tocopherolen bzw. RRR- und SRR- α -Tocopherolen gezeigt haben, erfolgt bis zu diesem Punkt keine wesentliche Unterscheidung zwischen den verschiedenen Tocopherolen oder den Stereoisomeren [220,221]. Die Absorptionsrate der Tocopherole beim Menschen wird auf bis zu 70% geschätzt, sie sinkt jedoch bei Steigerung der verabreichten Vitamin-E-Menge [75].

Bei der in der Leber erfolgenden Synthese der Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL) aus den endogenen und exogenen Lipiden kommt es über die Aktivität des hepatischen α -Tocopherol-Transfer-Proteins zu einer Biodiskriminierung der Tocopherole und zur bevorzugten Inkorporation von RRR- α -Tocopherol in die gebildeten VLDL. Das hepatische α -Tocopherol-Transfer-Protein (α -TTP), erstmals in den 70er Jahren beschrieben und isoliert [23,24], ist ein 30-36 kDa-Protein, das mittlerweile von mehreren Arbeitsgruppen in Reinform aus Rattenleber [187,252] und menschlicher Leber [116,6] isoliert wurde. Es zeichnet sich durch eine bevorzugte Affinität für RRR- α -Tocopherol aus und ist wahrscheinlich ein wesentlicher Faktor, der zur unterschiedlichen biologischen Aktivität der verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole beiträgt. Hosomi et al. [80] untersuchten die kompetitive Hemmung des RRR- α -Tocopherol-Transports zwischen Liposomen und isolierten Rattenleber-Membranen durch verschiedene α -Tocopherol-Analoga und errechneten aus diesen Daten die relative Affinität der untersuchten Verbindungen für das α -TTP (Tabelle 1). Die ermittelten Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit den im klassischen Tierversuch (z.B. Feten-Resorptionstest, Erythrozyten-

Hämolysetest) ermittelten biologischen Aktivitäten der entsprechenden Tocopherole.

Substanz	Relative Affinität [%]
RRR- α -Tocopherol	100
RRR- β -Tocopherol	38,1 \pm 9,3
RRR- γ -Tocopherol	8,9 \pm 0,6
RRR- δ -Tocopherol	1,6 \pm 0,3
RRR- α -Tocopherolacetat	1,7 \pm 0,1
α -Tocopherolchinon	1,5 \pm 0,1
SRR- α -Tocopherol	10,5 \pm 0,4
α -Tocotrienol	12,4 \pm 2,3

Tabelle 1: Relative Affinitäten des α -Tocopherol-Transfer-Proteins für verschiedene Tocopherole und Tocopherol-Analoga (in vitro) [80]

Während das natürliche RRR- α -Tocopherol bevorzugt gebunden und mit den VLDL wieder in die Blutbahn sezerniert wird und somit vermutlich auch gezielt vor einem Katabolismus durch körpereigene Enzymsysteme bewahrt wird [75], werden die „aussortierten“ β -, γ - und δ -Tocopherole und α -Tocopherol-Stereoisomere bevorzugt dem Katabolismus zugeführt oder über die Galle ausgeschieden.

Wie kürzlich von Azzi et al. [7] in einem Übersichtsartikel zusammengefasst, erfolgt die Expression von α -TTP nicht nur in der Leber, sondern auch in einigen Bereichen des Gehirns, in der Retina, in Lymphozyten, Fibroblasten sowie der Plazenta. Weitere Proteine mit spezifischer Affinität für α -Tocopherol wie das Tocopherol-assoziierte Protein (TAP, 46 kDa) und das Tocopherol-bindende Protein (TBP, 14,2 kDa) dienen möglicherweise dem intrazellulären Tocopherol-Transport.

Die Existenz solcher Proteine mit spezifischer Affinität für α -Tocopherol liefert auch eine Erklärung für die beobachtete deutliche Dominanz des α -Tocopherols in menschlichen und tierischen Organen und Geweben, die im Widerspruch zur natürlichen Verteilung der Tocopherole in der Nahrung steht, in der das γ -Tocopherol teilweise sogar überwiegt [92].

2.2.2 Katabolismus und bisher bekannte Ausscheidungswege von Tocopherol-Metaboliten

Die Kenntnisse zum Metabolismus und zu Ausscheidungswegen von Tocopherolen und ihren Metaboliten im Organismus sind auch nach acht Jahrzehnten der Vitamin-E-Forschung noch lückenhaft. Relativ umfassend erforscht ist bisher lediglich ein Zweig des Vitamin-E-Metabolismus, nämlich der Weg des oxidativen Seitenkettenabbaus der Tocopherole ohne vorherige oxidative Öffnung des Chromanringes. Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die Zwischenschritte dieses Stoffwechselweges am Beispiel von γ -Tocopherol.

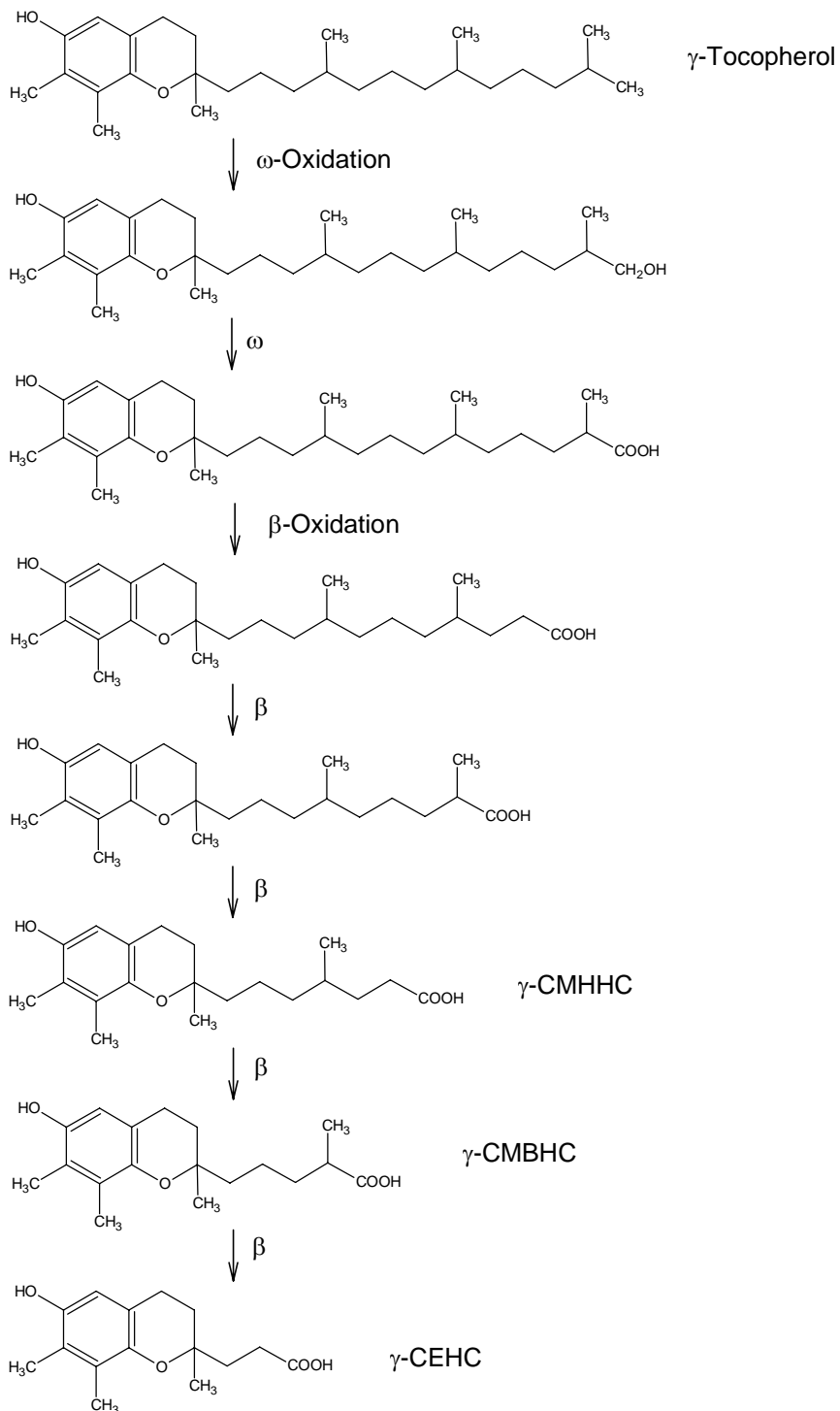


Abbildung 4: Seitenkettenoxidation der Tocopherole am Beispiel von γ -Tocopherol

Der Seitenkettenabbau der Tocopherole startet mit einer ω -Oxidation der Phytol-Seitenkette unter Beteiligung von Cytochrom-P450-Enzymen [165,16,118]. Anschließend erfolgt ein schrittweiser Abbau der Seitenkette in fünf β -Oxidations-Zyklen bis zum Carboxyethylhydroxychroman (CEHC), das schließlich – im Wesentlichen als Glucuronid- oder Sulfat-Konjugat [26,191,171] – über den Urin ausgeschieden wird. Neben den entsprechenden CEHC-Metaboliten wurden

auch deren Vorläufer in der β -Oxidationskette, die Carboxymethylbutylhydroxychromane (CMBHC, vgl. Abbildung 4), für α -Tocopherol [190,170] und γ -Tocopherol [166] in Humanurin sowie für δ -Tocopherol in Hepatozyten-Zellkultur (HepG2/C3A) [165] nachgewiesen. Auch der Vorläufer von α -CMBHC, das α -Carboxymethylhexylhydroxychroman (α -CMHHC), wurde bereits in Hepatozyten-Zellkultur (HepG2) detektiert [16]. Für γ -Tocopherol gelang Sontag und Parker [200] inzwischen der Nachweis sämtlicher wichtiger Zwischenstufen, inklusive der Produkte der vorhergehenden ω -Oxidation, in HepG2-Kultur.

Wie von Swanson et al. [212] gezeigt wurde, stellt dieser Stoffwechselweg für das γ -Tocopherol beim Menschen die wichtigste Eliminationsroute dar. Dies trifft vermutlich ebenso für den Metabolismus des δ -Tocopherols zu, für das bereits 1984 von Chiku et al. [26] nachgewiesen wurde, dass etwa 50% der oral verabreichten Dosis bei Ratten als δ -CEHC im Urin ausgeschieden wurden. Zusätzliche Relevanz erhält der Weg des Seitenkettenabbaus für das γ -Tocopherol auch dadurch, dass es sich beim γ -CEHC um eine physiologisch aktive Substanz handelt. So wurde 1996 von Wechter et al. [240] gezeigt, dass das γ -CEHC eine natriuretische Wirkung¹ aufweist und somit als natriuretischer Faktor an der Kontrolle des Pools an extrazellulärer Flüssigkeit im Organismus beteiligt sein könnte.

Im Gegensatz dazu wird α -Tocopherol nur in geringem Maße (< 5%) über den Seitenkettenabbau metabolisiert [191,190] und eine natriuretische Wirkung des α -CEHC ist nicht nachweisbar [240]. Ebenso scheint dieser Stoffwechselweg auch für das β -Tocopherol nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Fehlen der Methylsubstitution an C-5 eine entscheidende Determinante für den Tocopherol-Metabolismus darstellt [16].

Weitere Stoffwechselwege der Tocopherole wurden bisher nicht hinreichend erforscht. Es ist anzunehmen, dass ein erheblicher Anteil über die Galle und Fäzes ausgeschieden wird, entweder direkt oder nach Oxidation der Tocopherole und nachfolgender Konjugation [27,103]. Beispielsweise haben Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem SRR- und RRR- α -Tocopherol bei Ratten ergeben, dass mehr als 80% der verabreichten Dosis innerhalb von 96 h über die Fäzes ausgeschieden wurde [99]. Allerdings wurde hier nicht zwischen den Effekten einer unvollständigen Resorption und einer Re-Sekretion von Tocopherolen oder ihren Metaboliten in den Darm nach zuvor erfolgter Resorption unterschieden.

2.3 Oxidationsprodukte der Tocopherole

2.3.1 Oxidationsprodukte der Tocopherole in vitro

Der bisherige Kenntnisstand zu Oxidationsprodukten der Tocopherole beruht im Wesentlichen auf zahlreichen Untersuchungen zur Oxidation der Tocopherole, meist des α -Tocopherols, in diversen Modellsystemen unter Einwirkung verschiedenster Oxidanzien oder Radikalinitiatoren.

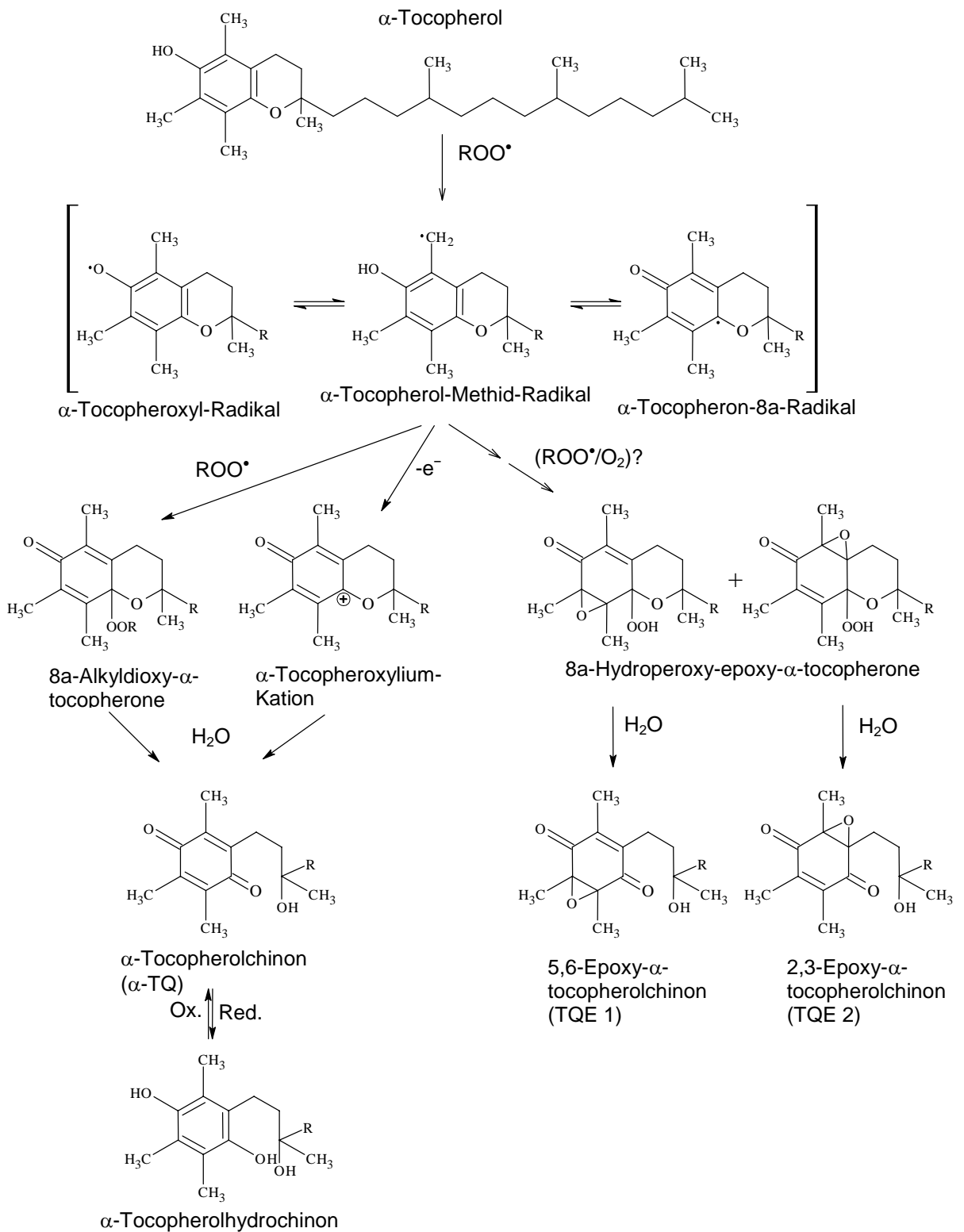
¹ Förderung der renalen Natriumausscheidung

Die Palette der untersuchten Modellsysteme umfasst dabei neben einfachen Lösungsmitteln [211,242,124,38,68,197,78,128,43], Methylolinoleat [136,66,245,248] oder Triglyceriden [236,237] auch physiologische Modellsysteme wie Liposomen [125,126,246], Rattenleber-Mikrosomen [227] oder –Mitochondrien [70], Rattenhirn-Synaptosomen [235], Erythrozyten-Membranen [231], Thrombozyten [229], Rindfleisch und Rindermuskel-Mikrosomen [54], perfundierte Rattenleber [71] oder LDL von isolierten arteriosklerotischen Läsionen [216]. Als Oxidationsmittel bzw. Radikalinitiatoren wurden beispielsweise Linolsäuremethylester-Hydroperoxide [136,66,248,216], Azoverbindungen wie AVMN [242,124,125,245,128] oder ABAP [70,54], tert-Butylhydroperoxid [211,71], das Superoxid-Radikal-Anion [38,68], Singulett-Sauerstoff (NDPO_2) [197], Stickstoffmonoxid (NO) [43], Peroxynitrit [78,235] oder UV-Licht [111,113] eingesetzt.

In Abhängigkeit von den jeweiligen Modellsystemen und den agierenden Oxidanzien wurde eine Vielzahl verschiedener Tocopheroloxidationsprodukte identifiziert. Abbildung 5 und Abbildung 6 geben einen Überblick über eine Auswahl wichtiger monomerer bzw. di-/trimerer Oxidationsprodukte der Tocopherole sowie bedeutender Zwischenprodukte am Beispiel von α -Tocopherol.

Der erste Schritt bei der Oxidation des α -Tocopherols ist in der Regel die Bildung des resonanzstabilisierten α -Tocopheroxyl-Radikals (vgl. Abschnitt 2.1.3.1). Durch die Delokalisation des ungepaarten Elektrons steht dieses Radikal im Gleichgewicht mit dem Tocopherol-Methid-Radikal und dem Tocopheron-8a-Radikal¹ (Abbildung 5, S. 13) [97]. Diese Radikale sind sehr reaktiv gegenüber Alkyl-Hydroperoxid-Radikalen, wobei Radikal-Kopplungsreaktionen unter Entstehung von 8a-Alkyldioxy- α -tocopheronen das Reaktionsgeschehen dominieren. Die 8a-Alkyldioxy-tocopherone hydrolysieren in einem weiteren Reaktionsschritt leicht zum α -Tocopherolchinon (α -TQ) [242,124,127,247]. Alternativ kann die α -TQ-Bildung auch über die Hydrolyse des α -Tocopheroxylium-Kations erfolgen, das durch Abgabe des ungepaarten Elektrons aus dem Tocopheroxyl-Radikal an ein anderes Radikal gebildet werden kann [97]. Ein weiterer Reaktionsweg führt über die Zwischenstufe der 8a-Hydroperoxy-epoxy- α -tocopherone zu den Epoxy- α -tocopherolchinonen TQE 1 und 2 [242,124,127,247]. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus bei der Epoxid-Bildung ist bisher nicht hinreichend geklärt. Die Arbeitsgruppe von Liebler [127] hat jedoch gezeigt, dass es vermutlich zunächst zur Epoxidierung des Tocopheroxyl-Radikals und anschließend zur Addition von Sauerstoff an der 8a-Position und Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem Wasserstoff-Donor kommt, während eine nachträgliche Epoxidierung der 8a-Alkyldioxy-tocopherone lediglich eine Nebenreaktion ist, die in Gegenwart von nichtverbrauchtetem α -Tocopherol nicht auftritt.

¹ 8a bezieht sich auf die Position am Chromanring (vgl. Abbildung 1, S. 2)

Abbildung 5: Wichtige Oxidationsprodukte von α -Tocopherol: Bildung monomerer Produkte

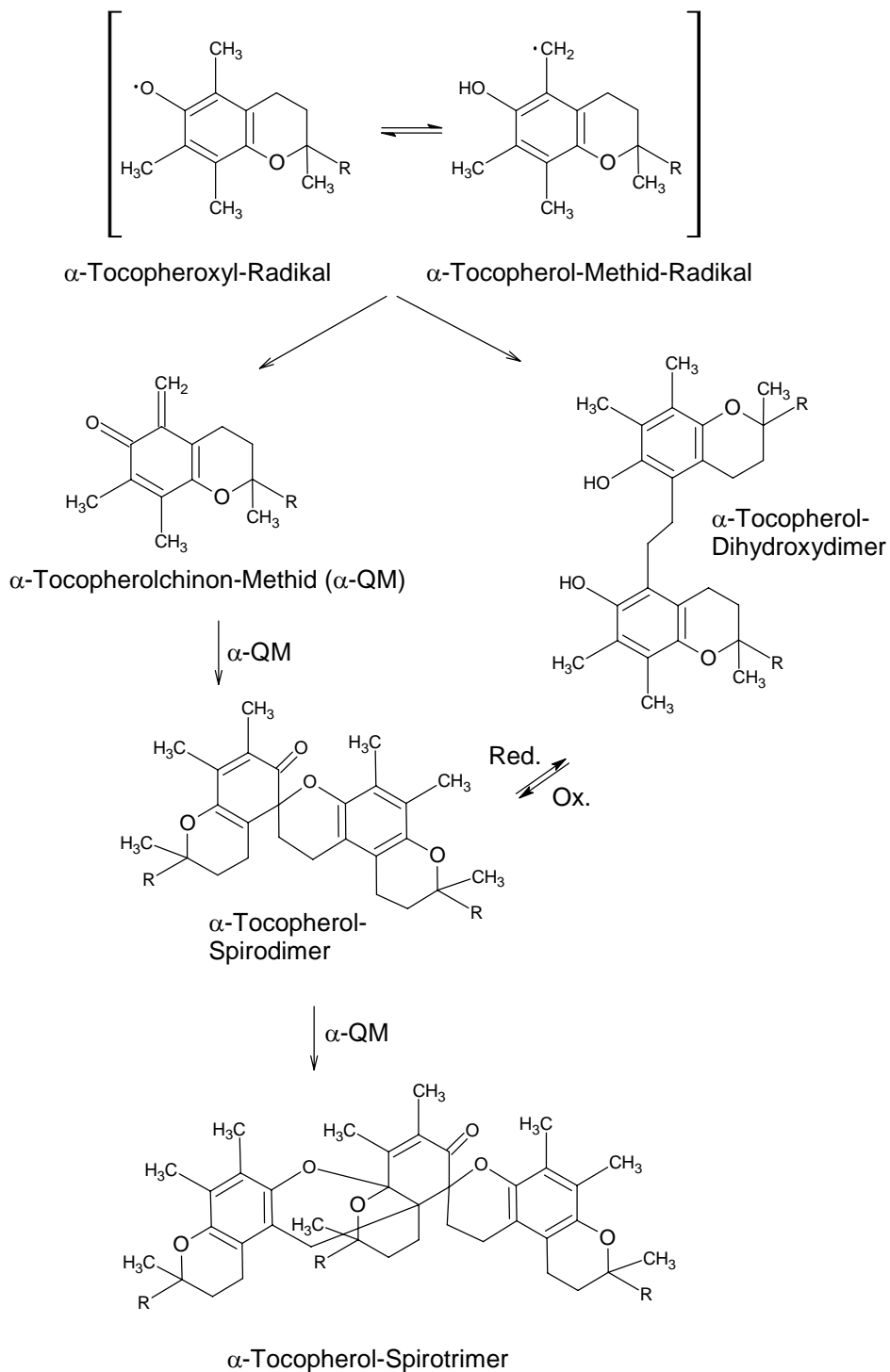


Abbildung 6: Wichtige Oxidationsprodukte von α -Tocopherol: Bildung von Dimeren und Trimeren

Neben den monomeren Reaktionsprodukten ist auch die Bildung von verschiedenen Tocopherol-Dimeren und -Trimeren beschrieben worden. Die Entstehung dieser Produkte erfolgt ebenfalls über die Zwischenstufe des Tocopheroxy-Radikals bzw. des Tocopherol-Methid-Radikals (Abbildung 6). Zwei α -Tocopherol-Methid-Radikale können entweder über eine

Disproportionierungsreaktion zum α -Tocopherolchinon-Methid und α -Tocopherol reagieren oder in einer einfachen Dimerisierungsreaktion das α -Tocopherol-Dihydroxydimer bilden. Das α -Tocopherol-Spirodimer kann in einer Diels-Alder-artigen Reaktion über die Zwischenstufe des α -Tocopherolchinon-Methids entstehen. In einem weiteren Reaktionsschritt kann über den gleichen Mechanismus auch das Spirotrimer gebildet werden [153,158,241,97,113]. Zahlreiche weitere Dimere und Trimere sind möglich, wurden jedoch in Abbildung 6 (S. 14) der Übersichtlichkeit wegen nicht mit aufgeführt. So entstehen weitere Dimere beispielsweise durch schrittweise Oxidation des Dihydroxydimers oder durch Radikal-Kopplungsreaktion zwischen dem Tocopheroxy- und dem Tocopherol-Methid-Radikal [97].

Während die Oxidation des α -Tocopherols bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, wurde den anderen Tocopherolen wesentlich weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Die vorhandenen Arbeiten [157,158,109,65,66,243,244,33,29] zeigen jedoch, dass prinzipiell ähnliche Produkte wie beim α -Tocopherol gebildet werden, wobei jedoch durch die unsubstituierten Positionen am Chromanring die Produktvielfalt noch erhöht wird. So ist beispielsweise neben den para-Tocopherolchinonen beim γ - und δ -Tocopherol auch die Bildung des ortho-Tocopherolchinons („Tocored“) beschrieben worden, bei dem keine Öffnung des Chromanringes erfolgt [244,33,29]. Weiterhin scheint die Bildung von Dimeren von größerer Bedeutung zu sein als beim α -Tocopherol, wobei insbesondere die Bildung von Phenol-Phenylether-Dimeren häufiger auftritt [158,65,66]. Für das γ -Tocopherol wurde von Cooney et al. [32,33] und Christen et al. [29] gezeigt, dass es über die nucleophile 5-Position des Chromanrings in der Lage ist, mutagene Elektrophile wie Peroxynitrit oder NO_2 abzufangen.

2.3.2 Oxidationsprodukte in vivo

Der Kenntnisstand zu Tocopheroloxidationsprodukten in vivo ist bisher relativ begrenzt. Zwar wurden bereits 1956 von Simon et al. zwei α -Tocopherol-Metaboliten im Urin von Kaninchen [199] bzw. im Humanurin [198] nachgewiesen, die aus der Oxidation des α -Tocopherols zum α -TQ und nachfolgendem Seitenkettenabbau (vermutlich durch β -Oxidation, vgl. Abschnitt 2.2.2) hervorzugehen schienen. Es handelte sich um das 2-(3-hydroxy-3-methyl-5-carboxypentyl)-3,5,6-trimethyl-Benzochinon (**1**, Abbildung 7) und sein γ -Lacton (**2**, Abbildung 7), nach ihrem Entdecker später als „Simon-Metaboliten“ bezeichnet.

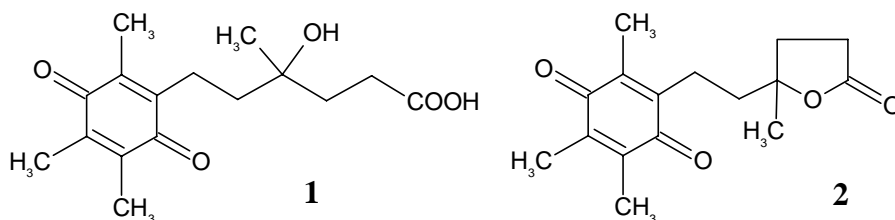


Abbildung 7: Simon-Metaboliten

Diese Verbindungen wurden, überwiegend als Glucuronid-Konjugate, in Mengen von 15-30 mg im 24-Stunden-Urin von Versuchspersonen nachgewiesen, die α -Tocopherol in extrem hoher Dosierung (3-5 g täglich) zu sich genommen hatten. Sie galten über Jahrzehnte als die wichtigsten Metaboliten von α -Tocopherol im Urin. Erst 1995 wurde von Schultz et al. [191] das 2,5,7,8-Tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (α -CEHC), ein Produkt des Seitenkettenabbaus von α -Tocopherol mit intakter Chromanringstruktur (analog zu γ -CEHC, vgl. Abbildung 4, S. 10), als wichtigster Metabolit im Humanurin nachgewiesen und gezeigt, dass es sich bei den von Simon et al. identifizierten Metaboliten vermutlich hauptsächlich um Artefakte der Probenaufbereitungsprozedur gehandelt hatte, die aus dem α -CEHC durch oxidative Ringöffnung hervorgegangen waren. Ähnliche Metabolite mit intakter Chromanringstruktur wurden auch für das γ - und δ -Tocopherol nachgewiesen [26,240,224,212]. Auch im Humanserum wurde inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen α - und γ -CEHC detektiert [201,174,76,144].

Bereits 1962 wurden von Csallany und Draper [37,47] das α -Tocopherolchinon und ein α -Tocopherol-Dimer in der Leber von Ratten nachgewiesen, die ^{14}C -markiertes α -Tocopherol intraperitoneal erhalten hatten. Später wurde von den gleichen Autoren auch die Bildung eines α -Tocopherol-Trimers in vivo nachgewiesen [48]. Strauch et al. [207] bestätigten 1969 die Bildung von α -Tocopherol-Dimeren und -Trimeren in Ratten- und Mäuseleber nach intravenöser Gabe von ^{14}C - α -Tocopherol, zeigten jedoch gleichzeitig, dass nach oraler α -Tocopherol-Verabreichung bzw. ohne Supplementation keine nennenswerte Dimer- und Trimerbildung zu beobachten ist (Dimer+Trimer-Gehalt in Hundeleber < 0,03 $\mu\text{g/g}$). Andere Autoren waren dagegen nicht in der Lage, eine Dimer- oder Trimer-Bildung bei intraperitoneal- oder oral ^{14}C - α -Tocopherol supplementierten Ratten zu bestätigen [168,141]. Eindeutige quantitative Angaben zu Dimer- oder Trimer-Gehalten in Körpergeweben oder -flüssigkeiten fehlen bis heute, was sicherlich nicht zuletzt mit den vermutlich sehr niedrigen Konzentrationen dieser Produkte zu begründen ist.

Auch für andere Tocopheroxidationsprodukte beschränken sich quantitative Gehaltsangaben - abgesehen von den bereits in Abschnitt 2.2.2 besprochenen Produkten des oxidativen Seitenkettenabbaus - bisher im Wesentlichen auf Angaben für das α -TQ sowie wenige Angaben zum α -THQ und γ -TQ.

So wurden von Takeda et al. [214] im Rattenplasma α -TQ-Gehalte von $23 \pm 5 \mu\text{g/l}$ gemessen, entsprechend etwa 0,5% des α -Tocopherol-Gehaltes in den Plasma-Proben. Ähnliche α -TQ/ α -Tocopherol (α -Toc)-Mengenverhältnisse (α -TQ/ α -Toc-Quotient in %) wurden auch von Kiyose et al. (0,2%) [104] und Murphy et al. (1,1%) [149] im Ratten- bzw. Hühnerplasma ermittelt. Der γ -TQ/ γ -Tocopherol-Quotient im Hühnerplasma lag dagegen deutlich höher (ca. 7%) [149].

Ausgesprochen niedrige α -TQ-Gehalte (3,1-5,8 $\mu\text{g/l}$) wurden von Vatassery et al. [230] im Serum von fünf gesunden Versuchspersonen gemessen, was sich auch in dem geringeren α -TQ/ α -Toc-Quotienten von 0,04-0,05% widerspiegelt. Im Gegensatz dazu liegen die von

Murphy et al. [150] gemessenen α -TQ Werte in 10 Humanplasma-Proben bei $44,7 \pm 26,8 \mu\text{g/l}$ und somit in einer ähnlichen Größenordnung wie die von Jain et al. [89] im Plasma von 26 Müttern ($71,4 \pm 8,9 \mu\text{g/l}$) und deren neugeborenen Säuglingen ($49,1 \pm 8,9 \mu\text{g/l}$) gemessenen α -TQ-Konzentrationen bzw. die von Pacht et al. [162] bestimmten Werte im Serum von 7 Rauchern ($80 \pm 20 \mu\text{g/l}$) und 12 Nichtrauchern ($90 \pm 30 \mu\text{g/l}$). Ein etwas höherer Wert wurde von Kohar et al. [108] im Plasma einer einzelnen Versuchsperson gemessen ($134 \mu\text{g/l}$), wobei fünf Stunden nach oraler Aufnahme von 350 mg α -TQ ein Anstieg des Plasmaspiegels auf $802 \mu\text{g/l}$ α -TQ sowie $134 \mu\text{g/l}$ α -THQ (vorher $0 \mu\text{g/l}$) beobachtet wurde.

α -TQ Konzentrationen ähnlicher Größenordnung wurden auch in Erythrozyten gemessen. So wurden von Jain et al. [89] bei Müttern und deren Neugeborenen Werte von $53 \pm 4 \mu\text{g/l}$ bzw. $67 \pm 9 \mu\text{g/l}$ ermittelt. Die von Vatassery et al. [233] gemessenen Werte liegen mit $17\text{-}33 \mu\text{g/l}$ etwas niedriger, während bei Ratten mit $154 \pm 61 \mu\text{g/l}$ etwas höhere Werte ermittelt wurden [214]. Generell scheint jedoch der α -TQ/ α -Toc-Quotient (in %) in Erythrozyten höher zu sein als im Plasma bzw. Serum. So lässt sich aus den angegebenen α -TQ und α -Tocopherol Werten berechnen, dass die ermittelten α -TQ-Konzentrationen etwa 4-5% [89] bzw. 6% [214] der gemessenen α -Tocopherol-Konzentrationen erreichen. Andererseits ergibt die Berechnung auf Basis der von Vatassery et al. [233] ermittelten Konzentrationen einen Quotienten von lediglich 0,8-1,1%. Da von Vatassery ein wesentlich größerer Aufwand bezüglich der Vermeidung einer α -Tocopherol-Oxidation während der Probenvorbereitung betrieben wurde (Zusatz von BHT, Ascorbinsäure und Pyrogallol als Antioxidanzien), besteht die Möglichkeit, dass die gemessenen höheren Werte der anderen Arbeitsgruppen ihre Ursache in der Bildung von α -TQ als Artefakt der Probenvorbereitung haben.

In verschiedenen tierischen Gewebeproben wurden α -TQ-Konzentrationen im unteren $\mu\text{g/g}$ -Bereich gemessen. So bestimmte die Arbeitsgruppe von Leray [123] bei unbehandelten Ratten α -TQ-Gehalte in der Leber von $0,67 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$, während diese Konzentration bei Ratten, die über vier Tage eine tägliche orale Dosis von 20 mg α -TQ erhielten, auf $13,8 \pm 2,2 \mu\text{g/g}$ anstieg. Gleichzeitig wurde bei der Kontrollgruppe ein α -THQ-Gehalt von etwa $0,09 \mu\text{g/g}$ gemessen, während dieser Wert bei den supplementierten Ratten bei $5,7 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ lag. Kiyose et al. [105] ermittelten die α - und γ -TQ-Konzentrationen in Plasma, Leber, Niere, Herz, Gehirn und Nebenniere von 5-6 Ratten mit experimentell erzeugtem Vitamin-E-Mangel nach intravenöser Verabreichung von $\alpha + \gamma$ -Tocopherol bzw. γ -Tocopherol. Die entsprechenden α - und γ -TQ-Werte lagen in vielen Fällen unterhalb der Bestimmungsgrenze des Verfahrens. 24 Stunden nach der $\alpha + \gamma$ -Tocopherol-Injektion lagen die mittleren Konzentrationen für α -TQ im Bereich von $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ (Herz, Hirn), $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ (Niere), $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ (Nebenniere) und $0,9 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ (Leber), γ -TQ wurde nur im Gehirn ($0,3 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$) und der Leber ($1,5 \pm 2,5 \mu\text{g/g}$) detektiert. Die TQ-Konzentrationen nach γ -Tocopherol-Injektion lagen generell niedriger.

Wesentlich höhere Konzentrationen an α -TQ und α -THQ wurden von Hughes und Tove [84] in

Leber, Fettgewebe, Hirn, Herz und Milz von Ratten nachgewiesen. Die nach umfangreicher Probenvorbereitung photometrisch quantifizierten Gehalte bewegten sich zwischen $6,2 \mu\text{g/g}$ $\alpha\text{-TQ}$ + $2,7 \mu\text{g/g}$ $\alpha\text{-THQ}$ im Fettgewebe und $55,3 \mu\text{g/g}$ $\alpha\text{-TQ}$ + $40,3 \mu\text{g/g}$ $\alpha\text{-THQ}$ in der Leber. Das Verhältnis von $\alpha\text{-TQ}$ zu $\alpha\text{-THQ}$ betrug in allen Organen etwa 1:1, nur im Gehirn lag die $\alpha\text{-THQ}$ -Konzentration mit $45,2 \mu\text{g/g}$ deutlich über der $\alpha\text{-TQ}$ -Konzentration von $8,5 \mu\text{g/g}$. Die ungewöhnlich hohen Konzentrationen an $\alpha\text{-TQ}$ und $\alpha\text{-THQ}$ im Vergleich zu den von anderen Arbeitsgruppen gemessenen Werten wurden mit den strikt anaeroben Verhältnissen während der Probenvorbereitung begründet, wodurch Verluste an $\alpha\text{-TQ}$ und $\alpha\text{-THQ}$ vermieden werden sollen. Die Werte wurden jedoch von Chow [28] sowie Bieri und Tolliver [13] in Frage gestellt. Letztere ermittelten mit ihrer HPLC-Methode in Rattenleber nur $\alpha\text{-TQ}$ -Konzentrationen von maximal $1,8 \mu\text{g/g}$, wobei das $\alpha\text{-THQ}$ bei der eingesetzten Probenvorbereitungsmethode als $\alpha\text{-TQ}$ miterfasst wurde.

Erhöhte $\alpha\text{-TQ}$ -Konzentrationen bzw. insbesondere ein erhöhter $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotient wurde von einigen Arbeitsgruppen als Marker für oxidativen Stress unter verschiedenen physiologischen Bedingungen vorgeschlagen. So haben Frey et al. [57] gezeigt, dass im Serum von Patienten, die sich einem herzchirurgischen Eingriff unterzogen hatten und bei denen es zu postoperativen Komplikationen wie Ganzkörperentzündungssyndrom (SIRS), Thrombozytopenie (Verringerung der Thrombozytenzahl) oder multiplem Organversagen (MOF) kam, der $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotient im Vergleich zum präoperativen Wert bzw. den postoperativen Kontrollen ohne Komplikationen deutlich erhöht war. Der Unterschied war allerdings nur beim Vergleich der MOF-Patienten ($\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc} = 9,7 \pm 4,1\%$) mit den postoperativen Kontrollen ($\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc} = 1,4 \pm 1,2\%$) statistisch signifikant.

Auch Murphy et al. [150] ermittelten einen signifikant erhöhten $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotienten ($3,7 \pm 1,5\%$) im Plasma von Patienten während der ischämischen Phase bei der Operation eines Aortenaneurysmas im Vergleich zum präoperativen ($1,7 \pm 0,9\%$) und postoperativen Zustand ($2,1 \pm 1,1\%$). Messungen von Pacht et al. [162] in der Bronchoalveolar-Flüssigkeit der Lunge zeigten einen signifikanten Unterschied des $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotienten bei Rauchern und Nichtrauchern auf, welcher bei den Rauchern sehr hohe Werte von $108 \pm 26\%$ erreichte, was allerdings vor allem durch deutlich erniedrigte $\alpha\text{-Tocopherol}$ -Gehalte verursacht wurde. Nach hochdosierter $\alpha\text{-Tocopherol}$ -Supplementation über einen Zeitraum von drei Wochen wurde der $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotient auf etwa 51% reduziert und wies damit keinen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Werten der Nichtraucher vor und nach der Supplementation auf, obwohl der $\alpha\text{-Tocopherol}$ -Gehalt in der Bronchoalveolar-Flüssigkeit von Rauchern noch immer signifikant geringer war als bei den Nichtrauchern. Im Gegensatz dazu wiesen die $\alpha\text{-Tocopherol}$ -Gehalte im Serum der Raucher und Nichtraucher keine signifikanten Unterschiede auf und der $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotient lag für beide Gruppen vor und nach der Supplementation bei $< 1,1\%$. Untersuchungen von Kanazawa et al. [98] ergaben erhöhte Werte für den $\alpha\text{-TQ}/\alpha\text{-Toc}$ -Quotienten in Hirn, Herz, Lunge, Leber und Niere von Ratten nach oxidativem

Stress in Form einer Hyperoxie (Maximum 2,85%, Lunge). Auch eine chronische Ethanol-Exposition führte zu verminderten α -Tocopherol-Gehalten und einem signifikant erhöhten α -TQ/ α -Toc-Quotienten in der Leber von Ratten, besonders wenn diese mit einer Vitamin-E-armen Diät ernährt wurden [102].

2.3.3 Physiologische Bedeutung von Tocopheroloxidationsprodukten

Einige Tocopheroloxidationsprodukte sind von besonderem Interesse, da für sie eigene physiologische Wirkungen nachgewiesen wurden. So haben beispielsweise Arbeiten von Mackenzie et al. [132-134] gezeigt, dass das α -TQ sowie insbesondere das α -THQ eine partielle Vitamin-E-Aktivität aufweisen. Bei Kaninchen konnte durch intravenöse Gabe von α -TQ bzw. α -THQ eine durch Vitamin-E-Mangel hervorgerufene Muskeldystrophie kuriert bzw. verhindert werden [132]. Eine Einmaldosis von 5 mg α -THQ zeigte dabei etwa die gleiche Wirkung wie 5 mg α -Tocopherol, während eine ähnliche Wirkung beim α -TQ erst nach Injektion einer 50 mg Dosis erzielt wurde. Bei Verabreichung von α -TQ bzw. α -THQ über eine Magensonde wurde eine wesentlich geringere Wirkung erzielt. Bei der Ratte ließ sich die durch Vitamin-E-Mangel erzeugte Muskeldystrophie ebenfalls durch intravenöse Gabe von α -THQ kurieren, wobei sich das α -THQ erneut als ähnlich wirksam wie das α -Tocopherol erwies. Ebenso war α -THQ gegen die durch Vitamin-E-Mangel induzierte Sterilität bei Ratten wirksam [134].

Die beobachtete Wirkung könnte durch die antioxidative Kapazität des α -THQ begründet sein. Bei in vitro Experimenten erwies es sich jedenfalls als hochwirksam bei der Inhibition der Lipid-Peroxidation [15,155]. Möglicherweise beruht auch die für das α -TQ beobachtete Wirksamkeit auf seiner Reduktion zum α -THQ in vivo. Dass dies möglich ist, zeigen Experimente von Hayashi et al. [73] mit isolierten Ratten-Hepatozyten, bei denen eine NAD(P)H- α -TQ-Reduktase-Aktivität und somit die Reduktion von α -TQ zu α -THQ nachgewiesen wurde. Diese Reduktase-Aktivität wurde später im Wesentlichen der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase, EC 1.6.99.2) zugeschrieben [152], was von Siegel et al. [195] in Experimenten mit isolierter DT-Diaphorase bzw. in Zellkultur bestätigt wurde. Die DT-Diaphorase gilt allgemein als ein Entgiftungs-Enzym, das reaktive Chinone in die weniger reaktiven Hydrochinone umwandelt, und zwar über eine 2-Elektronen-Reduktion ohne Bildung der Semichinone als reaktive Zwischenstufe [195].

Weiterhin erwies sich α -TQ als starker (irreversibler) Inhibitor der Vitamin-K-abhängigen Carboxylase, einem Enzym, das an der Regulation des Blutgerinnungsprozesses beteiligt ist und eine mögliche Verwendung als gerinnungshemmender Wirkstoff wurde angesprochen [46].

Auch eine blutdrucksenkende Wirkung von α -TQ bei Bluthochdruck-Patienten wurde beschrieben [22,180,55] und α -TQ war in antihypertensiven Präparaten (z.B. Tocopressina® der italienischen Firma Ripari-Gero) als Arzneimittel zugelassen [213].

Von Infante [86] wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich beim α -TQ um einen essenziellen Kofaktor von Fettsäuredesaturasen des mitochondriellen, carnitinabhängigen

Fettsäure-Desaturations-Elongationsweges handelt. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus erfolgt nach der Bindung des Fettsäure-Substrates am aktiven Zentrum der Desaturase eine simultane, NADH-unterstützte 1-Elektronen-Reduktion (über Cytochrom-b₅, NADH-Chinon-Oxidoreduktase-Reaktion) von zwei enzymgebundenen Molekülen α -TQ unter Bildung der Semichinon-Radikale. Diese abstrahieren in einer konzertierten Aktion stereospezifisch zwei H-Atome vom Substrat unter Bildung der cis-ungesättigten Fettsäure und zwei Molekülen α -THQ. Letzteres wird anschließend wieder zum α -TQ oxidiert, was nicht direkt an der Desaturase geschehen muss, sondern möglicherweise mit Hilfe einer speziellen Hydrochinon-Oxidase erfolgt. Alternativ könnte das Hydrochinon seine Elektronen auf mobile Carrier wie Ubichinon übertragen, die sie dann zur inneren Mitochondrien-Membran transportieren und in die Elektronentransport-Kette der Atmung einspeisen. Ein Mangel an Produkten des mitochondrialen Fettsäure-Desaturations-Elongationsweges könnte daher nach Ansicht von Infante die Ursache für Symptome wie Ataxie, Myopathie oder Retinopathie im Zusammenhang mit Vitamin-E-Mangel sein, da hier das α -Tocopherol als Vorstufe zur α -TQ-Bildung fehlt. Dies trifft insbesondere auf die Docosahexaensäure (22:6n-3) zu, da angenommen wird, dass diese ausschließlich über den mitochondrialen Weg produziert wird, während andere Polyenfettsäuren wie 20:4n-6, 22:4n-6, 20:5n-3 und 22:5n-3 auch über den mikrosomalen Weg der Fettsäure-Desaturations-Elongation produziert werden können, der bei Vitamin-E-Mangel kompensatorisch aktiviert wird [85,86].

Neueste Ergebnisse von Stocker und Baumann [205] zeigen eine mögliche Verbindung zwischen α -TQ und der Cholesterin-Biosynthese. α -TQ erwies sich hier als spezifisches Substrat für SPF (*engl. supernatant protein factor*), ein Lipid-Transfer-Protein, das die Squalen-Epoxidation, den ersten oxidativen Schritt in der Cholesterin-Biosynthese, über einen bisher unbekanntem Mechanismus stimuliert. Die genaue Funktion des α -TQ-SPF-Komplexes ist jedoch bisher nicht geklärt.

Bei Untersuchungen der Gruppe von Cornwell [218,34,94] erwiesen sich γ - und δ -TQ, aber nicht α -TQ, in Kulturen von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC, *engl. vascular smooth muscle cells*) sowie in Zelllinien der akuten lymphatischen Leukämie (CEM, CEM/VLB₁₀₀) in höheren Konzentrationen als zytotoxisch, während geringe Konzentrationen in SMC-Kultur antioxidative Wirkungen zeigten. Die Zytotoxizität der am chinoiden Ring nicht vollständig methylierten γ - und δ -Tocopherolchinone wird dabei mit ihrer Fähigkeit erklärt, als α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen Michael-Addukte mit nucleophilen Thiol-Gruppen zu bilden. So wurde gezeigt, dass γ - und δ -TQ Addukte mit Glutathion bilden, ein Mechanismus, der vermutlich auch der Detoxifikation geringer physiologischer Konzentrationen dieser Substanzen dient. Möglicherweise stellt die Zytotoxizität der γ - und δ -Tocopheroloxidaionsprodukte γ - und δ -TQ auch einen Erklärungsansatz für die evolutionäre Entwicklung einer bevorzugten Retention von α -Tocopherol im tierischen Organismus durch die Aktivität der verschiedenen α -Tocopherol-affinen Proteine (s.o.) dar [35].

Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von γ - und δ -TQ in Leukämie-Zelllinien, sogar in der multi-medikamentenresistenten CEM/VLB₁₀₀-Linie, wurde außerdem ein mögliches Potenzial dieser Substanzen als chemotherapeutische Wirkstoffe diskutiert [218,34,94].

2.4 Analytik der Tocopherole und ihrer Oxidationsprodukte in physiologischen Matrices

2.4.1 Methoden der Tocopherol-Analytik

2.4.1.1 Klassische Methoden

In der Zeit vor der allgemeinen Verbreitung moderner chromatographischer Methoden erfolgte die Tocopherol-Analytik relativ unspezifisch über verschiedene oxidative Reaktionen und Bestimmung der Reaktionsprodukte mittels photometrischer, titrimetrischer oder elektrochemischer Methoden. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Methode nach Emmerie-Engel, eine photometrische Methode, die auf der Bildung eines roten Komplexes zwischen Eisen-II-Ionen und 2,2'-Bipyridin nach der Reduktion von Eisen-III-chlorid durch das Tocopherol beruht. Allgemein gilt für die verschiedenen oxidativen Verfahren, dass sie insbesondere zur Gehaltsbestimmung reiner Tocopherollösungen verwendbar sind. Bei komplexeren Matrices kann eine vorherige Verseifung zu besseren Ergebnissen beitragen, jedoch ist auch in diesem Fall mit Störungen durch andere oxidierbare Substanzen zu rechnen und eine Unterscheidung der verschiedenen Tocopherole ist nicht möglich [107,41].

2.4.1.2 Moderne chromatographische Methoden

Die Einführung moderner chromatographischer Methoden wie der Gaschromatographie (GC) und der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) hat zu einer entscheidenden Verbesserung der Spezifität und Sensitivität der Tocopherolbestimmung beigetragen. Da die Anzahl an Veröffentlichungen zu diesem Thema sehr groß ist, werden in diesem Abschnitt im Wesentlichen einige umfassende Übersichtsartikel zu diesem Thema zitiert [39,2,186].

Gaschromatographie (GC)

Vor der Entwicklung der HPLC wurde verbreitet die GC mit Flammenionisationsdetektion (GC/FID) zur Tocopherolanalytik eingesetzt. Schon der Einsatz gepackter GC-Säulen ermöglichte die Trennung der Tocopherole und Tocotrienole, allerdings in der Regel mit Ausnahme der β - und γ -Isomere [39,2]. Nair et al. [151] erreichten jedoch eine Trennung von β - und γ -Tocopherol an einer gemischten stationären Phase aus SE 52 und XE 60 (2:1) nach oxidativer Umwandlung der Tocopherole in die entsprechenden Tocopherolchinone. Mit den später eingeführten Kapillarsäulen wurden die Möglichkeiten der GC-Analytik erheblich verbessert und eine Trennung der β - und γ -Isomere wurde möglich. Die Empfindlichkeit der Messung erhöhte sich gegenüber der Analytik an gepackten Säulen etwa um den Faktor 20, so dass Nachweisgrenzen im untersten ng-Bereich erreicht werden können [2]. Als Säulenmaterialien dominieren bei der Kapillar-GC der Tocopherole unpolare 100%-Dimethylpolysiloxan-Phasen und 5%-Phenyl-

Dimethylpolysiloxan-Phasen [39]. Vorteilhaft für die gaschromatographische Messung ist eine vorherige Derivatisierung der Substanzen, wobei die Umwandlung in TMS-Derivate die allgemein bevorzugte Methode darstellt.

Heute findet die GC/FID bei der Tocopherolanalytik kaum noch Anwendung, da sie als Routinemethode weitgehend von der HPLC verdrängt wurde. Von einigen Arbeitsgruppen werden jedoch gaschromatographische Methoden mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS) eingesetzt, insbesondere wenn eine zweifelsfreie Identifikation der Analyten in komplexen Matrices, die Bestimmung sehr geringer Gehalte oder die gleichzeitige Bestimmung von Tocopherolen und ihren Oxidationsprodukten bzw. Metaboliten erfolgen soll [129,228,185,59,140].

Ein entscheidender Nachteil der GC-Analytik von Tocopherolen in biologischen Matrices ist die erforderliche, relativ aufwendige Probenvorbereitung zur Isolierung der Analyten aus der störenden Matrix (s.u.).

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die Bestimmung der Tocopherole mittels HPLC bietet einige Vorteile im Vergleich zur GC und findet daher erheblich breitere Anwendung als die GC-Bestimmung. Die Technik ist verhältnismäßig einfach, schnell und in der Regel robuster als die GC. Der Aufwand für die Probenvorbereitung ist bei der HPLC geringer, insbesondere bei Anwendung der Normalphasen-HPLC, die verhältnismäßig hohe Gehalte an unpolaren Lipiden in der Messlösung toleriert, da diese nicht retardiert werden. Weiterhin kann eine Derivatisierung der Analyten unterbleiben und bei Verwendung der Fluoreszenz- oder elektrochemischen Detektion wird eine hervorragende Sensitivität und gute Selektivität der Bestimmung erreicht. Zur Anwendung kommen sowohl die Normalphasen- (NP, stationäre Phase polarer als mobile Phase) als auch die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC, *engl. reversed phase*, mobile Phase polarer als stationäre Phase).

Normalphasensysteme ermöglichen eine problemlose Trennung von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol (Toc) sowie der entsprechenden Tocotrienole (T3), wobei die Elution in der Reihenfolge steigender Polarität erfolgt (α -Toc \rightarrow α -T3 \rightarrow β -Toc \rightarrow γ -Toc \rightarrow β -T3 \rightarrow γ -T3 \rightarrow δ -Toc \rightarrow δ -T3). Die Trennung erfolgt meist an normalen Kieselgelphasen; seltener kommen Diol-, Amino-, Cyano-, Cyclodextrin- oder Nitro-modifizierte Kieselgele zum Einsatz. Als Eluent werden überwiegend binäre Systeme aus Hexan (oder seltener Isooctan) und geringen Anteilen eines polaren organischen Lösungsmittels (Alkohole, Ether oder Ester) verwendet. Besonders häufig eingesetzt wird die Kombination Hexan-Isopropanol, mit Isopropanol-Anteilen zwischen 0,2-1,2%. Eine isokratische Elution ist in der Regel ausreichend, seltener wird die Gradientenelution herangezogen. [2,186]

Für die Routineanalytik kommt wegen ihrer etwas größeren Robustheit häufig die RP-HPLC zum Einsatz. RP-Systeme mit konventionellen Umkehrphasen (RP-18, RP-8) haben allerdings den Nachteil, dass mit ihnen eine Trennung der β - und γ -Isomere der Tocopherole und der Tocotrienole nicht möglich ist [39,2,186]. Es wurde jedoch von der erfolgreichen Trennung der

Isomere an unkonventionellen Phasen wie Pentafluorphenyl-Kieselgelen [181,1], Triacetyl-(C30)-Phasen [209] bzw. Octadecanoyl-Polyvinylalkohol-Phasen [1] berichtet.

Die Trennung an Umkehrphasen führt zu einer Elution der Substanzen in der Reihenfolge steigender Lipophilie (δ -T3 \rightarrow β/γ -T3 \rightarrow α -T3 \rightarrow δ -Toc \rightarrow β/γ -Toc \rightarrow α -Toc). Als Eluenten werden meist Methanol, Acetonitril oder Mischungen beider Lösungsmittel in Kombination mit geringen Anteilen an Wasser oder anderen Lösungsmitteln (Ethanol, Dichlormethan, Ether, Ester, Hexan) verwendet. Am weitesten verbreitet ist die isokratische Elution mit Methanol, entweder pur oder häufiger mit geringem Wasseranteil (2-10%). [2,186]

Die empfindlichste Detektion der Tocopherole und Tocotrienole in der HPLC ermöglicht der elektrochemische Detektor. Hiermit können Nachweisgrenzen im untersten pg-Bereich erzielt werden. Seine Anwendung ist jedoch auf die RP-HPLC beschränkt, da die erforderlichen Elektrolyte (z.B. Perchlorate oder Acetate, 5-50 $\mu\text{mol/l}$) in den für die NP-HPLC verwendeten Eluenten nicht ausreichend löslich sind. Eine sowohl für die RP- als auch die NP-HPLC einsetzbare Alternative ist die Fluoreszenzdetektion. Zwar ist deren Empfindlichkeit im Vergleich zur elektrochemischen Detektion etwa um den Faktor 10 geringer, trotzdem wird die Fluoreszenz-Detektion von vielen Arbeitsgruppen auch bei der RP-HPLC wegen ihrer einfacheren Handhabbarkeit vorgezogen. Eine UV-Detektion der Analyten bei 292-298 nm ist ebenfalls möglich, jedoch bei wesentlich geringerer Sensitivität und Spezifität verglichen mit den anderen beiden Methoden [39,2,186].

In jüngerer Zeit kommen auch HPLC-MS-Methoden zum Einsatz. Lauridsen et al. erreichten dabei beispielsweise mit ihrer RP-APCI-HPLC-MS/MS-Methode eine Nachweisgrenze von 10 pmol (4,3 ng) für α -Tocopherol [120], während von Stöggel et al. [206] mit einer RP-APCI-HPLC-MS-Methode Nachweisgrenzen von 50 pg für α -Tocopherol, 1 ng für β/γ -Tocopherol und 5,4 ng für δ -Tocopherol erzielt wurden.

Probenvorbereitung

Die Analytik der Tocopherole in physiologischen Matrices erfordert in der Regel eine relativ aufwändige Probenvorbereitung. Dies trifft besonders auf die GC-Methoden zu. Hier kommt häufig eine Verseifung des Probenmaterials oder einer isolierten Lipid-Fraktion mit Kaliumhydroxid in Ethanol oder Methanol zum Einsatz, gefolgt von einer Extraktion der unverseifbaren Anteile mit einem unpolaren Lösungsmittel wie z.B. Hexan, meist in Kombination mit weiteren Reinigungsschritten wie der Dünnschicht- oder Säulenchromatographie. Dieser Prozess ist zeit- und arbeitsaufwändig und birgt durch die Vielzahl der Arbeitsschritte und die wenig schonenden Bedingungen eine erhebliche Gefahr von oxidativen Verlusten bei den Tocopherol-Analyten, so dass oft Antioxidanzien wie BHT, Ascorbinsäure oder Pyrogallol (allein oder in Kombination) zugesetzt werden. [186]

Obwohl auch für die HPLC-Analytik häufig eine Verseifung mit anschließender Extraktion der unverseifbaren Bestandteile zum Einsatz kommt, hat sich hier auch eine einfache Lipidextraktion zur Isolierung der Tocopherole als ausreichend erwiesen. Diese erfolgt meist mit

Hexan oder Heptan nach vorheriger Fällung der Proteine mit Methanol oder Ethanol, gelegentlich unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS). Bei dieser schonenden Vorgehensweise kann auf den Einsatz von Antioxidanzien weitgehend verzichtet werden. [186]

Nur wenige Arbeitsgruppen unterziehen sich der Mühe einer zusätzlichen Reinigung des Lipidextraktes durch Dünnschicht- oder Säulenchromatographie [122,138], obwohl besonders in der RP-HPLC eine vorherige Abtrennung der stark unpolaren Lipide im Hinblick auf die Lebensdauer der analytischen Trennsäule und die Qualität der Trennung empfehlenswert ist.

2.4.2 Methoden zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten

2.4.2.1 Papier-, Dünnschicht-, Säulen- und Gelpermeationschromatographie

Zwischen 1950 und 1970, also dem Zeitraum, in dem die ersten Nachweise von Tocopheroloxidationsprodukten und Tocopherolmetaboliten *in vivo* gelangen, kamen zu deren Trennung und Identifizierung im Wesentlichen die Papierchromatographie, die Dünnschichtchromatographie oder verschiedene Methoden der Säulenchromatographie, zum Teil in Kombination mit der UV- oder IR-Spektroskopie, zum Einsatz.

Csallany und Draper et al. [37,47,27,48] setzten in ihren frühen Arbeiten zur Isolierung von α -TQ, α -THQ und α -Tocopherol-Dimeren und -Trimeren aus Rattenleberextrakten oder Urin beispielsweise die Papierchromatographie auf Silicon-, Paraffin- oder ZnCO_3 -beschichtetem Papier oder die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten, in Kombination mit der Säulenchromatographie an einer Paraffin-imprägnierten Kieselgursäule oder an neutralem Aluminiumoxid ein.

Auch Simon et al. [198] verwendeten bei ihren Versuchen zur Isolierung der α -Tocopherol-Metaboliten aus Kaninchenurin neben verschiedenen Extraktionsschritten eine säulenchromatographische Trennung an Florex XXS (Magnesium-Aluminium-Silikat).

Von Dompert und Beringer [45] wurde 1976 eine erfolgreiche dünnschichtchromatographische Trennung von α -, β/γ - und δ -TQ sowie α -, β/γ - und δ -Tocopherol auf Kieselgel GF₂₅₄ mit Dichlormethan als Eluent vorgestellt, die allerdings nur bei vorheriger Konditionierung der Platte über 80%iger Schwefelsäure (rel. Luftfeuchtigkeit \cong 0%) die optimalen Trennergebnisse für die Tocopherolchinone lieferte.

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde die lipophile Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 zur Isolierung von Tocopheroloxidationsprodukten aus Reaktionsgemischen eingesetzt [18,172,136]. In Kombination mit der Dünnschichtchromatographie nutzten Pokorny et al. [169] die lipophile Gelchromatographie an einem S-832-Gel zur Isolation von Tocopheroloxidationsprodukten aus dem Unverseifbaren von Pflanzenölen.

Während die Papierchromatographie inzwischen weitgehend in Vergessenheit geraten ist, wurden Dünnschicht-, Säulen- und Gelpermeationschromatographie auch in den letzten Jahren noch zur Isolierung von Tocopheroloxidationsprodukten aus Syntheseansätzen und Reaktions-

mischungen [33,34,4,105] oder im Rahmen der Probenvorbereitung zur Isolierung der Analyten aus komplexen Matrices [84,140,249] eingesetzt.

2.4.2.2 HPLC

Seit etwa 1980 hat sich die HPLC als dominierende Methode zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten durchgesetzt und wurde bereits zur Quantifizierung von α -TQ sowie deutlich seltener auch von γ -TQ oder α -THQ in physiologischen Matrices eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.3.2).

Zur Bestimmung anderer Oxidationsprodukte von α -Tocopherol, wie den Epoxy- α -tocopherolchinonen TQE1 und 2, verschiedenen 8a-Alkyldioxy- α -tocopheronen und 8a-Alkyloxy- α -tocopheronen sowie α -Tocopherol-Dimeren (vgl. Abbildung 5 und 6, Abschnitt 2.3) wurde die HPLC bisher im Wesentlichen nur zur Vorfraktionierung mit anschließender off-line Detektion der Analyten eingesetzt. So gelang z.B. der Arbeitsgruppe um Liebler [124-126,70,128,112] die Detektion von α -TQ, α -TQE1, α -TQE2, 8a-Alkyldioxy- α -tocopheronen, Epoxy- α -tocopheronen, des Spirodimers und des Dihydroxydimers als Produkte der Oxidation von ^{14}C -markiertem α -Tocopherol in verschiedenen physiologischen Modellsystemen mittels off-line Flüssigkeits-Scintillationszählung nach vorheriger Fraktionierung der Extrakte mittels RP-HPLC. Der Nachweis eines ähnlichen Produktspektrums (+ Spiro-Trimer) von α -Tocopherol- [242,244-246] wie auch von entsprechenden γ - [243] bzw. δ -Tocopheroloxidationsprodukten [244] gelang auch Yamauchi et al. nach Oxidation der Tocopherole in verschiedenen Modellsystemen und anschließender Isolierung der Produkte über eine Kombination von präparativer RP-HPLC, NP-HPLC und off-line Charakterisierung der Analyten durch MS-, NMR- und IR-Messungen.

Kürzlich wurde jedoch von Yamauchi et al. [249] eine RP-HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion publiziert, die eine direkte Bestimmung von α -TQ, α -TQE1 und α -TQE2 neben α -, γ - und δ -Tocopherol ermöglicht. Das α -TQ und die Epoxy- α -tocopherolchinone werden dabei nach der HPLC-Trennung durch eine Nachsäulenderivatisierung an einer kleinen Zink-Reduktionssäule in eine im oxidativen Modus des elektrochemischen Detektors messbare Form (α -THQ) überführt. Diese Methode wurde erfolgreich zur Bestimmung der genannten Oxidationsprodukte im Extrakt eines experimentell peroxidierten Humanserums eingesetzt. Eine ähnliche Trennung gelang Leray et al. [123] bereits 1998, ebenfalls unter Verwendung der Nachsäulenreduktion an einer Zink-Säule sowie elektrochemischer Detektion. Die Trennung umfasste hier zusätzlich die Tocotrienole sowie Ubichinole und Ubichinone, jedoch wurden die beiden Epoxy- α -tocopherolchinone nicht getrennt.

Generell zeigen die bisher publizierten HPLC-Methoden eine nahe Verwandtschaft zu den entsprechenden Methoden der Tocopherolanalytik. Überwiegend handelt es sich um RP-HPLC-Methoden. Hierbei kommen fast ausschließlich chemisch gebundene C18-Phasen (Octadecylsilan, ODS) zum Einsatz. Der bevorzugte Eluent ist Methanol/Wasser (isokratisch), mit Wassergehalten von 2-5% [13,210,230,89] oder reines Methanol [162], häufig mit Elektrolytzusätzen

(Perchlorate, Acetate) für die elektrochemische Detektion [167,108,214,123,251,98,249]. Alternativ wurden ternäre Eluentensysteme wie Methanol/ Acetonitril/ Phosphatpuffer (83/ 12/ 5) [233,234] oder Ethanol/ Methanol/ Isopropanol (736/ 225/ 39) [188] eingesetzt.

Anhand der bisher publizierten Arbeiten lässt sich für die α -Tocopheroloxidationsprodukte in der RP-HPLC folgende Elutionsreihenfolge aufstellen: α -THQ \rightarrow α -TQE1 \rightarrow α -TQE2 \rightarrow α -TQ \rightarrow α -Toc \rightarrow α -Tocopherol-Dimere \rightarrow α -Tocopherol-Trimere. Die verschiedenen Tocopherole eluieren in der Reihenfolge $\delta \rightarrow \gamma+\beta \rightarrow \alpha$, ähnliches trifft vermutlich für die entsprechenden Oxidationsprodukte zu. Dies haben Murphy und Kehler [149] jedenfalls für α -, γ - und δ -TQ gezeigt (Elutionsreihenfolge δ -TQ \rightarrow γ -TQ \rightarrow α -TQ \rightarrow δ -Toc \rightarrow γ -Toc \rightarrow α -Toc).

Die NP-HPLC hat bisher relativ wenig Anwendung gefunden. Ihre Anwendbarkeit wurde im Wesentlichen unter Verwendung von Referenzsubstanzen demonstriert, so beispielsweise von Ha und Csallany [68] zur Trennung von α -Tocopherol, α -TQ, α -Tocopherol-Spirodimer und Dihydroxydimer sowie Spirotrimer und 8a-Methoxy- α -Tocopheron. Die Trennung erfolgte an einer Kieselgelphase mit Hexan/ Chloroform/ Isopropanol (95/ 4,5/ 0,5, v/v) als Eluent und UV-Detektion bei verschiedenen Wellenlängen. Das gleiche Trennsystem wurde später auch zur Bestimmung der entsprechenden Produkte der α -Tocopherol-Oxidation mit dem Superoxid-Anion eingesetzt. Cillard et al. [30] setzten die NP-HPLC mit einem Heptan/ Isopropanol-Eluenten (99,85/ 0,15) zur Trennung verschiedener α -Tocopherol-Dimere ein. Allgemein bietet die NP-HPLC bei der Analytik der Tocopherol-Dimere und -Trimere Vorteile gegenüber der RP-HPLC, da diese leichter zu eluieren sind als in der RP-HPLC. Andererseits werden jedoch in der NP-HPLC die Tocopherolchinone als relativ polare Verbindungen sehr stark retardiert, was mit langen Analysenzeiten für diese Substanzgruppe verbunden ist.

Von Kiyose et al. [105] wurde eine interessante Applikation zur Bestimmung von α - und γ -Tocopherol sowie α - und γ -TQ an einer chemisch gebundenen Aminophase (Nucleosil 5NH₂) vorgestellt. Hierbei erfolgte die Trennung mit einem typischen NP-Eluenten (Hexan/ Isopropanol), was eine ungewöhnliche Elutionsreihenfolge bewirkte (α -TQ \rightarrow α -Toc \rightarrow γ -TQ \rightarrow γ -Toc).

Detektion

Als Detektoren kamen bisher im Wesentlichen UV-, Diodenarray- bzw. elektrochemische Detektoren zur Anwendung. So erweist sich die UV-Detektion beispielweise für die Analytik der Tocopherolchinone als gut geeignet, da diese aufgrund ihres chinoiden Systems eine relativ starke Absorption bei etwa 260-270 nm aufweisen. Eine Bestimmung der Tocopherolchinone mittels der elektrochemischen Detektion ist unmittelbar nur im reduktiven Modus durchführbar, der wegen der Gefahr von Störungen durch gelösten Sauerstoff oder Schwermetalle aus den HPLC-Kapillaren wenig eingesetzt wird. Nur Sattler et al. [188] nutzten bisher diese Möglichkeit. Soll die Bestimmung dagegen im günstigeren oxidativen Modus erfolgen, so muss zunächst eine Reduktion der Tocopherolchinone (oder auch Epoxytocopherolchinone) zum entsprechenden Tocopherolhydrochinon erfolgen, um dieses anschließend oxidativ bestimmen zu können.

Hierzu wurden zwei Wege beschrieben, entweder eine on-line Nachsäulenreduktion an einer Zink-Reduktionssäule (s.o.) [123,194,249] oder der Einsatz eines coulometrischen elektrochemischen Detektors mit zwei bis vier hintereinandergeschalteten Elektroden, die eine Reduktion der Analyten an einer ersten Elektrode und die oxidative Messung an einer zweiten Elektrode ermöglichen [149,167,150,233,234,214,250].

Mit der elektrochemischen Detektion wurden für α -TQ Nachweisgrenzen im unteren pg-Bereich erreicht (5 pg [167], 20 pg [149], 100 pg [214,251] bzw. 140 pg [98]). Die UV-Detektion ist deutlich unempfindlicher und erreicht für α -TQ Nachweisgrenzen im unteren ng-Bereich (1 ng [162], 10 ng [67]), für die α -Tocopherol-Dimere und Trimere von 50-100 ng [67].

2.4.2.3 HPLC/MS und GC/MS

Die Pionierarbeit zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten mittels GC/MS wurde von der Arbeitsgruppe um Liebler geleistet. Sie publizierten 1996 [129] eine Methode zur Bestimmung der TMS-Derivate von α -TQE1, α -TQE2, α -TQ, α -Tocopherol und α -THQ (in dieser Elutionsreihenfolge) an einer 30 m DB-5ms-Säule. Es folgten weitere Publikationen zu Applikationen der Methode zur Identifikation der entsprechenden Substanzen in Rattenleber [71], Rindfleisch bzw. Rindermuskelmikrosomen [54] oder Mäusehaut [130].

Eine APCI-LC/MS-MS-Methode zur Bestimmung von α -Tocopherol und α -TQ in Rattenplasma-, Leber und Niere an einer RP 8-Säule (150 x 2,1 mm) mit Acetonitril/ 0,1% Essigsäure (97/ 3) als Eluent wurde 2001 von Gautier et al. [60] beschrieben. Eine Arbeitsgruppe aus dem gleichen Laboratorium [146] verglich kürzlich die Anwendung einer ESI-LC/MS-MS-Methode und einer GC/MS-Methode zur Quantifizierung der α -Tocopherol- und α -TQ-Gehalte im Humanplasma. Die GC/MS-Trennung der TMS-Derivate erfolgte dabei an einer 25 m HP 1-Säule, die ESI-LC/MS-MS-Trennung der freien Substanzen an einer RP 8-Säule (150 x 2,1 mm) mit einem Acetonitril/ Wasser-Gradienten (mit 0,1% Ameisensäure). Die LC/MS-MS zeigte eine bessere Reproduzierbarkeit und Sensitivität als die GC/MS, allerdings bereitete die Matrix der durch Verseifung und anschließende Extraktion gewonnenen Plasmaextrakte Probleme bei der LC-Methode (Ion Suppression, Signalreduktion). Die erreichten Nachweisgrenzen lagen bei beiden Methoden im unteren pg-Bereich.

2.4.2.4 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten in physiologischen Matrices entspricht im Wesentlichen den zur Tocopherolanalytik verwendeten Methoden. Während von einigen Arbeitsgruppen Verseifungsmethoden eingesetzt werden, verwenden andere die einfache Lipidextraktion mit vorheriger Proteinfällung durch Methanol oder Ethanol, gelegentlich mit Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS).

Besondere Bedeutung kommt der Vermeidung einer Oxidation der in den untersuchten physiologischen Proben immer vorhandenen Tocopherole im Laufe der Probenvorbereitung zu. Wegen der für gewöhnlich äußerst geringen Konzentrationen an Tocopheroloxidations-

produkten in den Proben kann schon die Oxidation eines Bruchteils der enthaltenen Tocopherole eine erhebliche Überschätzung des Gehaltes an Oxidationsprodukten bewirken.

Das Risiko der Entstehung von Artefakten der Probenvorbereitung, beispielsweise von α -TQ durch partielle Oxidation des α -Tocopherols, ist besonders bei der Verseifungsprozedur mit ihren wenig schonenden Bedingungen und vielen Arbeitsschritten gegeben. Daher setzen alle Arbeitsgruppen, die sich der Verseifung als Probenvorbereitungsmethode zur Bestimmung von α -TQ in physiologischen Proben (Serum, Plasma, Erythrozyten, tierische Gewebe) bedienen, Antioxidanzien ein. Dies reicht von der alleinigen Zugabe von Pyrogallol oder Ascorbinsäure zur Verseifungsmischung [13,162,104] über die Zugabe einer Kombination verschiedener Antioxidanzien wie Ascorbinsäure + BHT [232] oder Ascorbinsäure + BHT + Pyrogallol [233,234,98] bis hin zur Kombination der drei Antioxidanzien + Deferoxamin-Mesylat als Eisen-Chelator [146]. Zusätzlich erfolgt meist auch ein Zusatz von BHT (0,01-0,025%) zum Lösungsmittel, mit dem die Extraktion der Analyten aus der Verseifungslösung erfolgt [230,233,234,98,105].

Zur Verseifung wird bei den aufgeführten Arbeiten generell KOH in ethanolischer Lösung eingesetzt. Die KOH-Konzentration ist dabei allgemein etwas geringer als bei der Tocopherolbestimmung, da Vatassery und Smith bereits 1987 [230] gezeigt haben, dass andernfalls Verluste an α -TQ zu beobachten sind. Vor der Extraktion wird Wasser oder Natriumchloridlösung zugegeben und anschließend mit Hexan oder Hexan/Ethylacetat (9/ 1) extrahiert. Der Extrakt wird nach Entfernung des Lösungsmittels und Aufnahme in einem RP-HPLC-kompatiblen Lösungsmittel direkt vermessen, nur Bieri und Tolliver [13] lassen eine zusätzliche Reinigung mittels zwei-dimensionaler-DC folgen. Die Wiederfindungsraten für α -TQ, sofern angegeben, lagen in der Regel bei > 94%, nur Mottier et al. [146] erzielten mit 44% bei der LC/MS- und 70% bei der GC/MS-Methode schlechte Wiederfindungen, die jedoch durch Einsatz von deuteriertem internen Standard (d_6 - α -TQ) ausgeglichen werden konnten.

Wird die Probenvorbereitungsmethode der einfachen Lipid-Extraktion eingesetzt, so ist die Gefahr der Artefaktbildung geringer, so dass hier in der Regel nur ein Antioxidans (BHT oder Pyrogallol) zugesetzt wird [210,150,123,130,249] oder ganz darauf verzichtet wird [81,149,167,214,112,251]. Ohne Antioxidanzienzusatz wurde jedoch auch hier wiederholt von Problemen mit Artefaktbildung berichtet [210,149]. Nur Gautier et al. [60] setzten einen Cocktail aus BHT, Pyrogallol und Deferoxamin ein. Die Extraktion erfolgt meist mit Hexan nach vorheriger Denaturierung der Proteine mit Ethanol oder Methanol [81,210,167,214,251], andere Arbeitsgruppen setzen zur Proteindenaturierung zusätzlich [149,123,112,130] oder ausschließlich [60] SDS ein. Einen etwas anderen Weg beschreiten lediglich Yamauchi et al. [249], indem sie ihre Plasmaproben mit einem Chloroform/ Methanol-Gemisch extrahieren und den Extrakt anschließend in Chloroform über eine selbstgepackte Supelcoclean LC-NH₂-Minisäule fraktionieren.

3 Problemstellung

Wie bereits im Kapitel Theoretische Grundlagen erläutert, beruht eine wesentliche physiologische Wirkung von Vitamin E auf seinen antioxidativen Eigenschaften, die eine Lipidperoxidation verhindern oder verzögern und damit insbesondere zur Stabilisierung von Membranstrukturen beitragen. Die leicht oxidierbaren Tocopherole verhindern durch ihre Reaktion zum resonanzstabilisierten Tocopheroxyl-Radikal ein Fortschreiten der durch freie Radikale oder Hydroperoxide initiierten Radikalkettenreaktionen. Das gebildete Tocopheroxyl-Radikal kann vermutlich in der zellulären Umgebung durch geeignete Reaktionspartner („Ko-Antioxidanzien“ wie z.B. Vitamin C oder Glutathion) wieder zu dem entsprechenden Tocopherol reduziert werden. Dieser Prozess konkurriert jedoch mit Folgereaktionen des Tocopheroxyl-Radikals zu nichtradikalischen Reaktionsprodukten wie den Tocopherolchinonen, Tocopherolhydrochinonen, Epoxytocopherolchinonen, aber auch zu verschiedenen Tocopherol-Dimeren bzw. -Trimeren. Solche Tocopheroloxidationsprodukte zeigen neben z.T. eigener antioxidativer Kapazität auch weitere physiologische Wirkungen, wie bisher insbesondere für das α -Tocopherolchinon gezeigt werden konnte. Für dieses wurden beispielsweise eine blutdrucksenkende Wirkung, eine Hemmung der Aggregation der Blutplättchen sowie eine mögliche Funktion als essenzieller Kofaktor mitochondrieller Fettsäuredesaturasen beschrieben. Weiterhin stellt die Bildung der nichtradikalischen Tocopherol-Oxidationsprodukte, insbesondere der Tocopherolhydrochinone, vermutlich eine Phase-I-Reaktion des Metabolismus der Tocopherole dar. Die in der nachfolgenden Phase-II-Reaktion gebildeten Konjugate (z.B. Glucuronide oder Sulfate) werden wahrscheinlich überwiegend über die Fäzes eliminiert. Im Urin erscheinen dagegen vorwiegend Konjugate, die aus dem oxidativen Seitenkettenabbau der Tocopherole hervorgehen.

Generell bestehen zum Thema Vitamin E trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung noch erhebliche Wissenslücken - sowohl bezüglich des Metabolismus der Tocopherole als auch im Hinblick auf Wirkungsmechanismen. Besonders die Kenntnisse zu Vorkommen, Verteilung, physiologischer Bedeutung sowie der Ausscheidung von Tocopherol-Oxidationsprodukten in vivo sind bisher ausgesprochen begrenzt. Auch über potenzielle Risiken einer jahrelangen hochdosierten α -Tocopherol-Supplementation oder mögliche prooxidative Wirkungen in vivo liegen trotz steigender Anwenderzahlen solcher Präparate bisher kaum Untersuchungen vor. Dass α -Tocopherol zumindest in vitro auch prooxidativ wirken kann, ist jedoch bekannt [226].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte eine Bestimmungsmethode zum Nachweis von Tocopherol-Oxidationsprodukten im Humanserum erarbeitet werden. Auf Basis einer umfangreichen Literatur-Recherche wurde dabei zunächst geklärt, welche Oxidationsprodukte:

- unter physiologischen Bedingungen vermutlich von Bedeutung sind,
- als Referenzsubstanzen käuflich zu erwerben sind bzw. mit vertretbarem Aufwand selbst synthetisiert werden können,

- mit den im Labor zur Verfügung stehenden Methoden (DC, GPC, HPLC mit UV-, Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion, GC/FID und GC/MS) isoliert, charakterisiert und bestimmt werden können.

Als Ergebnis dieser Literaturrecherche wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die Bestimmung von α -Tocopherolchinon (α -TQ) gelegt. Weiterhin sollte die Möglichkeit der Bestimmung der entsprechenden β -, γ - und δ -Tocopherolchinone sowie der Tocopherolhydrochinone (THQ) geprüft werden. Besonders beim α -Tocopherolchinon und α -hydrochinon handelt es sich um nachweislich physiologisch relevante Tocopheroloxidationsprodukte, für die einfache Synthesvorschriften existieren und die sowohl mittels HPLC- als auch GC-Methoden gut analysierbar sind.

Im Hinblick auf die eventuelle Anwendung der entsprechenden Methode für die spätere Analytik im Rahmen zukünftiger Gesundheitssurveys bestand eine wesentliche Zielsetzung der Arbeit in der Entwicklung einer routinefähigen Methode, die auch zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten in größeren Stichproben eingesetzt werden kann.

Zunächst sollte die entwickelte Methode jedoch für die Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten in einer kleineren Unterstichprobe von Serumproben des vom Robert Koch-Institut durchgeführten Bundes-Gesundheitssurveys 1998 eingesetzt werden. Hierbei sollte beispielsweise untersucht werden, inwiefern die Einnahme von α -Tocopherol-Supplementen möglicherweise einen Einfluss auf den Gehalt an α -Tocopherolchinon im Serum ausübt oder ob sich anhand der gemessenen Konzentrationen an Tocopheroloxidationsprodukten bzw. dem Grad der Tocopheroloxidation Hinweise auf die Verwendbarkeit dieser Werte als Marker für oxidativen Stress *in vivo* ergeben. Als Hilfsmittel zur weiteren Interpretation der gewonnenen Daten konnte der in den Proben ebenfalls bestimmte Gehalt an Tocopherolen herangezogen werden. Außerdem bestand die Möglichkeit, auch andere bereits ermittelte klinische Parameter, wie z.B. den Lipidstatus, zur Beurteilung der gewonnenen Daten heranzuziehen sowie auf Informationen aus den begleitenden Fragebögen (z.B. zum Gesundheitszustand oder zur Medikamenten- bzw. Supplementeneinnahme der Surveyteilnehmer) zurückzugreifen.

Als weiterer Bestandteil der Arbeit sollten die mittels einer bereits etablierten Labormethode bestimmten Gehalte an α -, β -, γ - und δ -Tocopherol in Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 ausgewertet werden. Als Probenmaterial dienten hierzu die Serumproben sämtlicher Personen, die in einem detaillierten Arzneimittel-Fragebogen angegeben hatten, innerhalb der letzten sieben Tage vor der Untersuchung Vitamin-E-haltige Präparate eingenommen zu haben, sowie die Serumproben einer etwa doppelt so großen Kontrollgruppe von Personen, die in diesem Zeitraum keinerlei Medikamente eingenommen hatten.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien (alphabetisch)	Hersteller
2,2'-Bipyridin, p.a.	Aldrich
Bipyridin-Lösung für TQ-Synthese nach Nair: 900 mg 2,2'-Bipyridin, gelöst in 49,1 g Ethanol	
tert-Butylhydroxytoluol, BHT (aus Phenolic Antioxidant Kit)	Supelco
BHT-Stammlösung: 25 mg BHT, gelöst in 10 ml Methanol	
Chloroform, LiChrosolv	Merck
Cholesterin	Merck
Cholesterylpalmitat, Sigma-grade (~99%)	Sigma
Diethylether, p.a.	Merck
Eisen-III-chlorid (Hexahydrat), $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, p.a.	Merck
Eisen-III-chlorid-Oxidationslösung für TQ-Synthese nach Schudel: 2,0 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, gelöst in 7,5 ml bidest. H_2O und 7,5 ml Methanol	
Eisen-III-chlorid-Oxidations-Lösung für TQ-Synthese nach Nair: 1,6 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, gelöst in 24 ml bidest. H_2O und 1 ml 25 %iger HCl	
Essigsäure, 100%, CH_3COOH , p.a.	Merck
Essigsäure-Lösung, ca. 0,1 N, für THQ-Synthese nach Liebler: 0,6 ml Essigsäure werden mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.	
Ethanol, LiChrosolv	Merck
Helium 4.6	Linde
n-Hexan, p.a.	Merck
Isooctan, LiChrosolv	Merck
Isopropanol, LiChrosolv	Merck
Lithiumperchlorat, LiClO_4 , ACS Reagenz	Acros Organics
Methanol, LiChrosolv	Merck
Methanol mit 0,25 mg/ml BHT (Denaturierungslösung): 2 ml BHT-Stammlösung werden mit Methanol auf 20 ml aufgefüllt.	

Chemikalien (alphabetisch)	Hersteller
Methanol mit 0,025 mg/ml BHT (Verdünnungslösung): 0,5 ml BHT-Stammlösung werden mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt.	
Molybdat-Phosphorsäure, p.a.	Merck
Molybdat-Phosphorsäure-Sprühreagenz: aus 2,5 g Molybdat-Phosphorsäure, 7 ml Perchlorsäure (70%), 50 ml bidest. H ₂ O und 25 ml Ethanol	
Natriumacetat, wasserfrei, CH ₃ COONa, p.a.	Merck
Natriumborhydrid, NaBH ₄ , p.a.	Fluka
Natriumsulfat, wasserfrei, Na ₂ SO ₄ , p.a.	Merck
Oleum Olivarum (Olivenöl), DAB 7, extra fein	Herbeta
Perchlorsäure, 70%, p.a.	Merck
Petrolether, Siedebereich 40-60°C, SupraSolv	Merck
L- α -Phosphatidylcholin, Sigma-grade (~99%)	Sigma
Salpetersäure, konz., p.a.	Merck
Salzsäure, 25 %, HCl, p.a.	Merck
Stickstoff 4.6	Linde
Sylon BTZ (BSA + TMCS + TSIM, 3:2:3), \geq 95% (HPLC)	Supelco
Tert-Butylhydrochinon, TBHQ (aus Phenolic Antioxidant Kit)	Supelco
Tocopherol-Set (α -, β -, γ -, δ -Tocopherol)	Calbiochem
DL- α -Tocopherol	Sigma
D- α -Tocopherolchinon, 90-95%	Acros Organics
N-Trimethylsilylimidazol (TSIM)	Macherey-Nagel
Tripalmitin, Sigma-grade (~99%)	Sigma
Wasserstoff 5.0	Linde
Zinkchlorid, wasserfrei, ZnCl ₂ , p.a.	Merck
Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Extrelut, Füllmaterial zur Herstellung von Großextraktionssäulen	Merck
Extrelut-3-Fertigsäulen	Merck
Extrelut-1-Fertigsäulen	Merck
Ederol-Filterflocken, Nr. 111	Binzer Papierfabrik

Kieselgel 60 F254, Korngröße 0,063-0,200 mm	Merck
Sephadex LH-20	Pharmacia
DC-Platten (analytisch, 0,25mm) Kieselgel 60 F254, 10/20x20 cm	Merck
DC-Platten (präparativ, 2mm Schicht) Kieselgel 60 F254 20x20 cm	Merck

4.2 Probenmaterial

4.2.1 Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys 1998

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte auf Serumproben des vom Robert Koch-Institut (RKI) durchgeführten Bundes-Gesundheitssurveys 1998 (BGS 98) zurückgegriffen werden. In diesem Survey wurden 7124 Personen einer repräsentativen Stichprobe der 18- bis 79-jährigen deutschen Wohnbevölkerung befragt und untersucht. Die „Feldarbeitsphase“, d.h. die Befragungen und medizinischen Untersuchungen in 120 Untersuchungspunkten verteilt über ganz Deutschland, begann im Oktober 1997 und wurde im März 1999 abgeschlossen. Von 6757 Personen (94,8% der Gesamtstichprobe) wurden vollständige Blut-/Serumanalysen durchgeführt [11,217].

Die Blutentnahme wurde aus der Armvene beim nüchternen Probanden (Nahrungskarenz mindestens 3 Stunden) mit Hilfe von Vakutainern vorgenommen. Nach vollständiger Spontangerinnung (mindestens 30 min stehen lassen ohne direkte Wärmeeinwirkung oder Sonneneinstrahlung) erfolgt die Serumgewinnung durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 10 min. Das Serum wird in 0,5-1 ml Portionen eingefroren und bis zur Untersuchung bei -35 bis -40°C gelagert.

Für die Tocopherolbestimmungen wurde eine Unterstichprobe von 1007 Probanden gezogen. Diese umfasst sämtliche Personen (317), die angegeben hatten, innerhalb der letzten sieben Tage vor der Untersuchung Vitamin-E-haltige Präparate angewendet zu haben („Nehmer“), sowie eine Kontrollgruppe von 690 Personen, die in diesem Zeitraum keinerlei Medikamente eingenommen hatten („Nichtnehmer“). Da nicht von allen in der Stichprobe gezogenen Probanden ausreichend Serum zur Verfügung stand, wurden insgesamt 933 Personen untersucht, 302 Nehmer und 631 Nichtnehmer.

Für die α -TQ-Bestimmungen wurde eine Zufallsstichprobe (ca. 10%) aus der Stichprobe für die Tocopheroluntersuchungen gezogen. Es wurden 32 Nehmer und 65 Nichtnehmer untersucht.

4.2.2 Serumproben freiwilliger Versuchspersonen

Um eine Abschätzung des Einflusses der langen Lagerung der Surveyproben bei -35°C auf den Tocopherolchinon-Gehalt der Serumproben vornehmen zu können, wurden zum Vergleich auch einige frische Serumproben von freiwilligen Versuchspersonen ($n = 14$) untersucht. Diese Proben wurden wie unter 4.2.1 beschrieben gewonnen und entweder sofort oder nach einer Lagerperiode von wenigen Tagen bei -35°C untersucht. Im Gegensatz zu den Surveyproben liegen zu diesen Proben wesentlich weniger Informationen vor. Bekannt sind jedoch in allen Fällen Alter und Geschlecht. Keine der Versuchspersonen hatte in den letzten sieben Tagen vor

der Blutentnahme Vitamin-E-Präparate eingenommen. Ebenso wies keine der Personen akute Krankheitssymptome auf. Zur sonstigen Medikamenteneinnahme sowie zu chronischen Erkrankungen liegen jedoch bei diesen Probanden keine Angaben vor.

4.2.3 Humanpoolseren

Zur Erarbeitung der Analysenmethode zur Bestimmung der Tocopheroxidationsprodukte im Serum sowie zur Überprüfung der analytischen Qualitätsparameter der Tocopherol- und Tocopherolchinon-Bestimmungen wurde in der Regel Humanpoolserum eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Gemisch einer Vielzahl von anonymisierten Serumproben aus dem laufenden Analysenbetrieb des Labors, d.h. über Alter, Geschlecht, Ernährung und Gesundheitszustand der Probanden lagen keine Angaben vor. Die Gewinnung der Basisseren für das Poolserum erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben. Das Poolserum wurde in Einzelportionen zu 0,5-1 ml in Eppendorfgefäße abgefüllt und bei -35°C gelagert.

4.3 Methoden

Im Folgenden wird eine Beschreibung der verwendeten Methoden in ihrer jeweiligen Endversion gegeben. Ausführliche Erläuterungen zur Methodenentwicklung (sofern diese notwendig war) finden sich im Abschnitt 5. Bezüglich der theoretischen Grundlagen der eingesetzten chromatographischen Verfahren sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen (z.B. [192,83]).

4.3.1 Tocopherolbestimmung in Humanserumproben mittels NP-HPLC

Prinzip:

Die Tocopherole werden aus dem Serum nach Denaturierung der Serumproteine mit Methanol über eine Lipidextraktion isoliert. Der erhaltene Lipidextrakt wird anschließend durch Säulenchromatographie an einer selbstgepackten Mini-Kieselgelsäule gereinigt, wobei stärker polare Lipide auf der Säule zurückgehalten werden. Der erhaltene Serumextrakt wird mittels NP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion vermessen. Die Quantifizierung von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol erfolgt über die Methode der externen Kalibration.

Probenvorbereitung:

100 μl Serum werden auf eine selbstgepackte Extrelut-Säule (Pasteurpipette mit Extrelut, Füllhöhe ca. 5 cm) gegeben und nach 5 min durch Zugabe von 200 μl Methanol denaturiert. Die Serumlipide werden anschließend mit 5 ml Hexan eluiert. Der Extrakt wird im Vortex-Evaporator bei 40°C und Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 100 μl Hexan aufgenommen und auf eine selbstgepackte kleine Kieselgelsäule (Pasteurpipette mit Kieselgel 60 F254, Füllhöhe ca. 5 cm) überführt. Das Gefäß wird mit 100 μl Hexan nachgespült und diese Lösung ebenfalls auf die Kieselgelsäule gegeben. Nach 4 min werden die Tocopherole mit 4 ml einer Mischung aus Hexan und Diethylether (20+4, v/v) eluiert. Das Eluat wird im Vortex-Evaporator zur Trockne eingeengt, anschließend in 100 μl HPLC-Eluent gelöst und in ein Mikroial zur HPLC-Messung überführt.

Messung:	HPLC/ Fluoreszenz-System (Hewlett Packard)								
HPLC-Anlage:	HP 1090 Series II Liquid Chromatograph								
Injektor:	Sixport-Ventil mit 20 µl Probenschleife								
Detektor:	HP 1046A Programmable Fluorescence Detector $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$								
Probenaufgabe:	integrierter Autosampler								
Daten-Auswertung:	PC mit HP Chemstation Software for LC, Version A.07.01 (682)								
Trennsäule:	LiChrosorb Si 60 (250 x 4,6 mm, 7µm Partikel) (Merck)								
Eluent:	Isooctan-Isopropanol (99,5 : 0,5, v/v), Flussrate 1,25 ml/min								
Injektionsvolumen :	20 µl								
Kalibration:	externe, Kalibrationsbereich:								
	<table> <tr> <td>α-Tocopherol</td> <td>100 – 800 ng/20µl (Injektionsvolumen) 5 – 40 mg/l (Serum)</td> </tr> <tr> <td>β-Tocopherol</td> <td>4 – 12 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,2 – 0,6 mg/l (Serum)</td> </tr> <tr> <td>γ-Tocopherol</td> <td>10 – 50 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,5 – 2,5 mg/l (Serum)</td> </tr> <tr> <td>δ-Tocopherol</td> <td>4 – 10 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,2 – 0,5 mg/l (Serum)</td> </tr> </table>	α -Tocopherol	100 – 800 ng/20µl (Injektionsvolumen) 5 – 40 mg/l (Serum)	β -Tocopherol	4 – 12 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,2 – 0,6 mg/l (Serum)	γ -Tocopherol	10 – 50 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,5 – 2,5 mg/l (Serum)	δ -Tocopherol	4 – 10 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,2 – 0,5 mg/l (Serum)
α -Tocopherol	100 – 800 ng/20µl (Injektionsvolumen) 5 – 40 mg/l (Serum)								
β -Tocopherol	4 – 12 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,2 – 0,6 mg/l (Serum)								
γ -Tocopherol	10 – 50 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,5 – 2,5 mg/l (Serum)								
δ -Tocopherol	4 – 10 ng/20µl (Injektionsvolumen) 0,2 – 0,5 mg/l (Serum)								

Retentionszeiten:

Substanz	Retentionszeit
α -Tocopherol	5,1 min
β -Tocopherol	7,6 min
γ -Tocopherol	8,2 min
δ -Tocopherol	12,5 min

Tabelle 2: Retentionszeiten für die Tocopherole in der NP-HPLC

4.3.2 Synthese der Tocopherolchinon/-hydrochinon-Referenzsubstanzen**4.3.2.1 TQ-Synthese mit Eisen-III-chlorid (nach Schudel)****Prinzip:**

Die Tocopherole werden in Diethylether gelöst und mit wässrig-methanolischer Eisen-III-chlorid-Lösung zu den Tocopherolchinonen oxidiert [189].

Durchführung:

Eine geeignete Menge des entsprechenden Tocopherols (z.B. 0,5 g) wird in ein braunes Schliffreagenzglas eingewogen und in 5 ml Diethylether gelöst. Nach Zugabe von 1,25 ml Eisen-III-chlorid-Oxidationslösung wird die Mischung zunächst 5 min kräftig von Hand, dann 30 min im Vortex-Rüttler geschüttelt. Nach Abtrennung der Oxidationslösung wird die Etherphase noch weitere 3 x mit je 1,25 ml frischer Oxidationslösung nach dem gleichen Verfahren behandelt.

Anschließend wird die Etherphase 4-5 x mit je 1 ml destilliertem Wasser gewaschen und dann durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Zur Entfernung letzter Wasserspuren kann die Lösung schließlich noch über eine Extrelut-1-Säule gegeben werden, wobei mit ca. 10 ml Diethylether nachgespült wird, um eine vollständige Elution des Reaktionsproduktes von der Säule zu gewährleisten. Die so erhaltene Lösung wird im Vortex-Evaporator vorsichtig zur Trockne eingeengt. Letzte Lösungsmittelspuren werden im Stickstoffstrom entfernt. Man erhält das Reaktionsprodukt als gelben bis rötlichbraunen öligen Rückstand.

4.3.2.2 TQ-Synthese mit Eisen-III-chlorid und 2,2'-Bipyridin (nach Nair)

Prinzip:

Die in Ethanol gelösten Tocopherole werden mit salzsaurer Eisen-III-chlorid-Oxidationslösung in Gegenwart von 2,2'-Bipyridin zu den Tocopherolchinonen oxidiert. Das 2,2'-Bipyridin dient als Komplexbildner für die entstehenden Eisen-II-Ionen und verschiebt somit das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Tocopherolchinone. Diese werden anschließend aus der Reaktionslösung mit Hexan extrahiert und aus dem mit Wasser neutral gewaschenen Extrakt isoliert [151].

Durchführung:

Eine geeignete Menge des entsprechenden Tocopherols (z.B. 50 mg) wird in 50 ml Ethanol gelöst, mit 25 ml Eisen-III-chlorid-Oxidationslösung versetzt. Nach 5 min werden zusätzlich 50 ml Bipyridin-Lösung zugegeben und der Reaktionsansatz im Wasserbad 20 min auf 50°C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur und Zugabe von 100 ml destilliertem Wasser wird 3 x mit je 25 ml Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanextrakte werden 4 x mit je 25 ml dest. Wasser gewaschen und die organische Phase anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die so erhaltene Lösung wird im Rotationsverdampfer vorsichtig zur Trockne eingeengt. Letzte Lösungsmittelspuren werden im Stickstoffstrom entfernt. Man erhält das Reaktionsprodukt als gelben bis rötlichbraunen öligen Rückstand.

4.3.2.3 α -TQ-Synthese mit konzentrierter Salpetersäure (nach Rao)

Prinzip:

Das α -Tocopherol wird mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure oxidiert. Das Produkt wird mit Wasser neutral gewaschen, in Hexan aufgenommen, getrocknet und isoliert [175].

Durchführung:

Eine geeignete Menge des entsprechenden Tocopherols (z.B. 50 mg) wird mit 5-10 Tropfen konzentrierter Salpetersäure versetzt und 2-3 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit destilliertem Wasser so lange gewaschen, bis das Waschwasser einen pH-Wert > 5 aufweist. Das Reaktionsprodukt wird in Hexan gelöst und die Lösung mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vortex-Evaporator wird das Reaktionsprodukt als gelber ölicher Rückstand erhalten.

4.3.2.4 Präparative Dünnschichtchromatographie zur Reinigung der TQ-Syntheseprodukte

Prinzip:

Die nach den Abschnitten 4.3.2.1, 4.3.2.2 oder 4.3.2.3 gewonnenen Reaktionsprodukte der Tocopherolchinone werden auf einer präparativen DC-Platte dünnschichtchromatographisch getrennt. Die unter UV-Licht detektierte und markierte Produktbande wird vorsichtig abgeschabt und mit Diethylether extrahiert.

Durchführung:

Das jeweilige bei der TQ-Synthese gewonnene Roh-Reaktionsprodukt wird in einer geeigneten Hexanmenge gelöst und strichförmig auf eine präparative DC-Platte (Kieselgel 60 F254, 20 x 20 cm, 2 mm Schichtdicke) aufgetragen. Die DC erfolgt mit Petrolether/ Diethylether (1/1, v/v) bei Kammersättigung. Nach Trocknen der entwickelten DC-Platte unter dem Abzug kann in der UV-Kammer (254 nm) die deutlich sichtbare Substanzzone des Hauptproduktes markiert werden. Zum Schutz der photosensiblen Tocopherolchinone vor der UV-Strahlung ist es vorteilhaft, die Platte mit einem sauberen Blatt Papier so abzudecken, dass nur die seitlichen Ränder der aufgetragenen Zone unbedeckt bleiben. Die markierte Substanzzone, die bei ausreichender Produktmenge auch bei Normalbeleuchtung als gelbe Bande erkennbar ist, wird anschließend vorsichtig herausgeschabt und mit Diethylether extrahiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer und Abblasen letzter Lösungsmittelspuren mittels Stickstoff kann das erhaltene Produkt auf der Analysenwaage ausgewogen werden.

4.3.2.5 Tocopherolhydrochinon-Synthese mit Natriumborhydrid (nach Liebler)

Prinzip:

Die Tocopherolchinone werden in ethanolischer Lösung mit Natriumborhydrid zu den Tocopherolhydrochinonen reduziert. Überschüssiges Natriumborhydrid wird mit verdünnter Essigsäure umgesetzt. Die Produkte werden aus der Reaktionslösung mit Hexan extrahiert [129].

Durchführung:

Eine geeignete Menge des entsprechenden Tocopherolchinons (z.B. 100 µg) wird in 5 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 100 mg NaBH₄ wird kräftig geschüttelt und die Mischung kurz ins Ultraschallbad gestellt. Nach 5 min werden zunächst 2 ml 0,1N CH₃COOH, etwas später dann 3 ml destilliertes Wasser zugegeben. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird das Reaktionsgemisch 3 x mit je 1 ml Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanextrakte im Stickstoffstrom vorsichtig zur Trockne eingeengt und das synthetisierte Hydrochinon in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen.

4.3.3 Analytische Dünnschichtchromatographie

Prinzip:

Die Analyten werden auf der Dünnschichtplatte nach adsorptionschromatographischen Prinzipien getrennt. Die Detektion der Substanzflecken erfolgt entweder unter UV-Licht oder durch Besprühen der Platte mit Molybdato-Phosphorsäure-Reagenz.

Durchführung:

Die vorzugsweise in Hexan gelöste Probe wird punktförmig auf eine Kieselgel F254 DC-Platte (Schichtdicke 0,25 mm) aufgetragen und mit Petrolether (40-60°C)/ Diethylether (1:1, v/v) bei Kammerfüllung entwickelt. Die Detektion der Substanzen erfolgt unter UV-Licht (254 nm). Alternativ bzw. zusätzlich kann eine Detektion durch Besprühen mit Molybdato-Phosphorsäure-Reagenz und nachfolgendem Erhitzen (10 min, 120°C) erfolgen.

4.3.4 Lipophile Gelpermeationschromatographie (GPC) an Sephadex LH-20

Prinzip:

Die Analyten werden auf der Sephadex-LH-20-Säule mit Chloroform als Eluent sowohl gemäß den klassischen Prinzipien der Größenausschluss-Chromatographie (Trennung nach Molekülgröße) als auch nach adsorptionschromatographischen Prinzipien getrennt (vgl. Abschnitt 5.3.1.1). Die primäre Detektion erfolgt mittels des angeschlossenen UV-Detektors. Die gesammelten Fraktionen eines chromatographischen Laufes können anschließend zusätzlich mittels analytischer DC nach Abschnitt 4.3.3 untersucht werden. Damit können auch Analyten detektiert werden, die mittels des UV-Detektors nicht oder nur sehr unempfindlich erfasst werden.

Durchführung:

Die in Chloroform gelöste Probe wird über ein Latek-Injektionsventil mit 0,5 ml Probenschleife auf die Säule aufgegeben. Das Elutionsprofil wird mit dem Schreiber des LKB-Uvicord UV-Detektors aufgezeichnet. Die Fraktionen werden je nach Bedarf in entsprechenden Messzylindern gesammelt.

Trennsystem:

Trennsäule:	Lösungsmittelresistentes Chromatographierohr (Typ 25/45, Pharmacia, Uppsala, Schweden), ausgerüstet mit zwei Durchflussadaptern, Zu- und Ableitungen bestehend aus Teflonschläuchen mit 1 mm Innendurchmesser
Füllmaterial:	Sephadex LH-20
Gelbettvolumen:	130 ml
Probenaufgabe:	Latek-Einlassventil mit 0,5 ml Probenschleife
Detektor:	LKB Uvicord 4700 (LKB, Bromma, Schweden), $\lambda = 254 \text{ nm}$
Eluent:	Chloroform, ~ 1 ml/min

Elutionsvolumina:

Substanz	Molmasse [g/mol]	Elutionsvolumen [ml]
Triolein	885,5	45 - 60
Cholesterinpalmitat	625,1	50 – 65
α -Tocopherolchinon	446,7	61 – 76
β - und γ -Tocopherolchinon	432,7	61 – 76
δ -Tocopherolchinon	418,7	61 - 76
α -Tocopherol	430,7	73 – 95
Cholesterin	386,7	85 - 110
β - und γ -Tocopherol	416,7	120 – 155
δ -Tocopherol	402,7	185 - 230

Tabelle 3: GPC-Elutionsvolumina von Referenzsubstanzen

4.3.5 Tocopherolchinon/ -hydrochinon Bestimmung mittels GC/FID**Prinzip:**

Die Analyten werden an einer unpolaren Methylsiliconphase (HP-1) kapillargaschromatographisch getrennt und mittels Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert. Während die Tocopherolchinone sowohl direkt als auch in Form der TMS-Derivate vermessen werden können, ist zur Bestimmung der Tocopherolhydrochinone eine Derivatisierung mit TSM nach Punkt 4.3.7.1 erforderlich. Die Zuordnung der Substanzpeaks erfolgt über die Retentionszeiten durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen. Die Kalibrierung für quantitative Bestimmungen wird über die Methode der externen Kalibrierung vorgenommen.

Messung:	GC/FID-System (Hewlett Packard)
Gaschromatograph:	HP 5890
Injektor:	Split-Splitless
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Probenaufgabe:	Autosampler 7673A
Daten-Auswertung:	PC mit HP Chemstation Software for GC, Version A.08
Trennsäule:	HP-1 (5 m x 0,53 mm, 2,65 μ m Filmdicke), AGILENT
Trägergas:	Helium, 10 ml/min
Injektortemperatur:	250°C
Detektortemperatur:	275°C
Temperaturprogramm:	70°C, 1 min mit 40°C/ min auf 200°C mit 3°C/ min auf 220°C mit 6°C/ min auf 250°C 250°C, 2 min

Injektionsvolumen: 1 μ l, splitless
 Kalibration: extern (nur für α - und β -TQ bzw. TQ-TMS),
 Kalibrationsbereich 2 - 100 ng/ μ l (Injektionsvolumen)

Anmerkung:

Mit diesem System wurden im Wesentlichen Messungen von Syntheseprodukten und Referenzsubstanzen vorgenommen. Diese erfolgten entweder direkt (TQ) in Isooctan als Lösungsmittel oder nach Derivatisierung mit TSIM oder Sylon BTZ (TQ, THQ). Quantitative Bestimmungen erfolgten nur versuchsweise für α - und β -TQ bzw. TQ-TMS.

Retentionszeiten:

	TQ		THQ
	underivatisiert	TMS-Derivat	TMS-Derivat
α	9,9 min	10,0 min	13,0 min
β	8,7 min	8,8 min	11,7 min
γ	9,3 min ¹	9,4 min	11,7 min
δ	8,2 min ¹	8,3 min	10,6 min

Tabelle 4: Retentionszeiten der Tocopherolchinone und -hydrochinone bzw. ihrer TMS-Derivate bei Verwendung des GC/FID-Systems

4.3.6 Tocopherolchinon/ -hydrochinon-Bestimmung mittels GC/MS

Prinzip:

Die Analyten werden an einer relativ unpolaren 5%-Phenyl-Methylsilicon-Phase kapillargaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert. Die Ionisierung der Analyten im massenspektrometrischen Detektor erfolgt mittels Elektronenstoßionisierung, die Massentrennung erfolgt in einer Ionenfalle (Ion Trap). Das Ion-Trap-System ermöglicht neben der Messung im einfachen GC/MS-Modus auch MSⁿ-Messungen.

Messung: GC/MS-System (ThermoFinnigan)
 Gaschromatograph: Finnigan GCQ Gaschromatograph
 Injektor: Split-Splitless
 Detektor: Finnigan GCQ MS-Detektor (Ion Trap)
 Probenaufgabe: Autosampler A 200 S
 Daten-Auswertung: PC mit Xcalibur-Software, Version 1.2
 Trennsäule: RTX-5MS (30 m x 0,25 mm 0,25 μ m Filmdicke) Restek
 Trägergas: Helium, 30 cm/s
 Injektortemperatur: 270°C
 Ionenquelle: 170°C

¹ Retentionszeit des größten Peaks, Zuordnung nicht eindeutig, da mehrere Peaks detektiert werden (vgl. Abschnitt 5.2.2), aber plausibel bei Vergleich mit den Retentionszeiten der TMS-Derivate

Transfer-Line:	285°C
Temperaturprogramm:	220°C, 1 min mit 5°C/min auf 290°C 290°C, 10 min
MS-Modus:	Elektronenstoßionisierung, 70 eV
MS-MS-Modus:	q = 0,450 Precursor Ion m/z 293 Produkt-Ionen m/z 146 - 300

Anmerkung:

Mit diesem System wurden im Wesentlichen Messungen von Syntheseprodukten und Referenzsubstanzen vorgenommen. Diese erfolgten entweder direkt in Isooctan oder Acetonitril als Lösungsmittel (TQ) oder nach Derivatisierung mit TSIM oder Sylon BTZ (TQ, THQ). Weiterhin wurde das System zur versuchsweisen Direktmessung der Tocopherolchinone in silylierten Serumextrakten eingesetzt. Da sich hierfür die Empfindlichkeit der Messung als unzureichend erwies, wurde statt dessen zur Absicherung der Identität des α -TQ-HPLC-Peaks in Serumproben eine off-line-Kopplung der HPLC-Trennung mit der GC/MS bzw. GC/MS-MS vorgenommen. Diese Messungen erfolgten nach Einbau einer neuen RTX-5MS-Säule und mit leicht verändertem Temperaturprogramm (Maximaltemperatur 285°C), so dass sich etwas höhere Retentionszeiten ergaben (vgl. Abschnitt 5.4.2).

Retentionszeiten:

	TQ		THQ
	underivatisiert	TMS-Derivat	TMS-Derivat
α	17,4 min	17,1 min	20,9 min
β	15,7 min	15,5 min	18,1 min
γ	16,6 min	16,2 min	18,4 min
δ	15,0 min	14,7 min	16,8 min

Tabelle 5: Retentionszeiten der Tocopherolchinone und -hydrochinone bzw. ihrer TMS-Derivate bei Verwendung des GC/MS-Systems

4.3.7 Derivatisierungsmethoden**Prinzip:**

Die Analyten werden mit einem reaktiven Silylierungsreagenz (TSIM oder Sylon BTZ) zu den Trimethylsilylderivaten umgesetzt. Diese Umsetzung dient der Verbesserung der Flüchtigkeit und der chromatographischen Eigenschaften der Substanzen.

4.3.7.1 Derivatisierung mit TSIM

Zur Derivatisierung der Tocopherolchinone/-hydrochinone wird der lösungsmittelfreie Rückstand der Referenzlösung bzw. des nach Abschnitt 4.3.9.2 gewonnenen Serumextraktes mit 50-100 µl TSIM versetzt und im Dunkeln bei geschlossenem Vial 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird die Lösung mit Isooctan oder Acetonitril¹ auf das gewünschte Messvolumen aufgefüllt (meist auf 500 bzw. 1000 µl)

4.3.7.2 Derivatisierung mit Sylon BTZ

Zur Derivatisierung der Tocopherolchinone/-hydrochinone wird der lösungsmittelfreie Rückstand der Referenzlösung bzw. des nach Abschnitt 4.3.9.2 gewonnenen Serumextraktes in 50 µl Pyridin gelöst, mit 50 µl Sylon BTZ versetzt und im Dunkeln bei geschlossenem Vial 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird die Lösung mit Isooctan oder Acetonitril¹ auf das gewünschte Messvolumen aufgefüllt (meist auf 500 bzw. 1000 µl)

4.3.8 Tocopherolchinon/ -hydrochinon-Bestimmung mittels HPLC

Prinzip:

Die Analyten werden an einer C18-Umkehrphase mit Methanol als Eluent flüssigchromatographisch getrennt und mittels UV-, Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion gemessen. Für die Bestimmung der Tocopherolchinone mit Hilfe der Fluoreszenz- bzw. elektrochemischen Detektion war die Entwicklung einer Methode zur Nachsäulenderivatisierung erforderlich (vgl. Abschnitt 5.2.3.2), da diese Substanzen weder eine nennenswerte native Fluoreszenz zeigen, noch im oxidativen Modus der elektrochemischen Detektion messbar sind. Zur Nachsäulenderivatisierung wurden entweder eine Zink-Reduktionssäule oder ein Photoreaktor eingesetzt.

Messung:

System 1: HPLC/UV-System (Knauer)

HPLC-Pumpe:	Knauer HPLC-Pumpe 64
Injektor:	Sixport-Ventil mit 20 µl Probenschleife
Detektor:	Spektralphotometer mit Digitalanzeige Nr. 731.8700000
Probenaufgabe:	Autosampler Basic Marathon
Daten-Auswertung:	PC mit Knauer EuroChrom 2000 Software, Version 2.05
Trennsäule:	LiChrosorb-100 RP18 (250 x 4,6 mm, 10 µm Partikel) mit integrierter Vorsäule, Knauer
Eluent:	Methanol, Flussrate 1 ml/min
Detektion:	UV, Detektionswellenlänge 260 oder 267 nm (TQ) 287 nm (THQ)
Kalibration:	extern, Kalibrationsbereich (Tocopherolchinone): 5 - 250 ng/20µl

¹ reduziert Probleme mit verstopften Injektionsspritzen

Anmerkung:

Dieses System wurde nur zu Beginn der Arbeiten eingesetzt. Spätere Messungen wurden ausschließlich mit dem Shimadzu-System (s.u.) vorgenommen, da dieses eine deutlich höhere Messempfindlichkeit ermöglichte. Auf Angabe der Retentionszeiten wird daher verzichtet.

System 2: HPLC/UV/Fluoreszenz-System (Shimadzu) mit Nachsäulenderivatisierung

HPLC-Pumpe:	LC-10Avp
Controller:	SCL-10Avp
Ventil:	FCV-10AL
Degasser:	DGU-14A
Säulenofen:	CTO-10ACvp
Injektor:	Sixport-Ventil mit 50 µl Probenschleife
Detektor A:	Fluoreszenz-Detektor RF-10AXL
Detektor B:	UV-Detektor SPD-10Avp
Probenaufgabe:	Autosampler SIL-10A
Nachsäulenderivatisierung:	Knauer Photoreaktor Nr. A 1026 mit 6 m Reaktorschlauch, ID = 0,3 mm <i>oder</i> 20 x 4,6 mm Reduktionssäule, gefüllt mit Zink-Granulat (Interchim, Art.Nr. CH980661-ZN)
Daten-Auswertung:	PC mit Shimadzu Class-VP Software, Version 5.03
Trennsäule:	LiChrosorb-100 RP18 (250 x 4,6 mm, 10 µm Partikel) mit integrierter Vorsäule, Knauer
Eluent:	Methanol, Flussrate 1 ml/min (bei UV-Detektion oder Fluoreszenzdetektion und Nachsäulenderivatisierung mit Photoreaktor) <i>bzw.</i> Methanol mit 0,01 mol/l ZnCl ₂ , 0,005 mol/l CH ₃ COOH und 0,005 mol/l CH ₃ COONa (bei Fluoreszenzdetektion und Nachsäulenderivatisierung mit Zink-Reduktionssäule)
Detektion:	UV-Detektion bei 260 nm Fluoreszenzdetektion, $\lambda_{Ex} = 294 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 331 \text{ nm}$

Anmerkung:

Mit diesem System wurde die überwiegende Zahl der Messungen ausgeführt, so auch die Bestimmung der Tocopherolchinongehalte in den Serumproben, die unter Verwendung des Photoreaktors zur Nachsäulenderivatisierung erfolgte.

Retentionszeiten:

	Mit Photoreaktor		Mit Zinksäule	
	TQ	THQ	TQ	THQ
α	8,9 min	5,5 min	8,7 min	5,3 min
β	7,7 min	5,4 min	7,5 min	5,2 min
γ	7,8 min	5,3 min	7,6 min	5,1 min
δ	6,9 min	5,1 min	6,7 min	4,9 min

Tabelle 6: Retentionszeiten der Tocopherolchinone und –hydrochinone bei Verwendung des HPLC/UV/Fluoreszenz-Systems mit Nachsäulenderivatisierung

System 3: HPLC/ED-System (Knauer) mit Nachsäulenderivatisierung

HPLC-Pumpe:	Knauer HPLC-Pumpe 64
Injektor:	Sixport-Ventil mit 20 μ l Probenschleife
Detektor:	Metrohm 656 Elektrochemischer Detektor und 641 VA-Detektor
Probenaufgabe:	manuell
Daten-Auswertung:	PC mit Knauer EuroChrom 2000 Software, Version 2.05
Nachsäulenderivatisierung:	Knauer Photoreaktor Nr. A 1026 mit 6 m Reaktorschlauch, ID = 0,3 mm <i>oder</i> 20 x 4,6 mm Reduktionssäule, gefüllt mit Zink-Granulat (Interchim, Art.Nr. CH980661-ZN)
Trennsäule:	Supelcosil LC18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m Partikel), Supelco
Eluent:	Methanol mit 5 g/l LiClO ₄ und 1 g/l CH ₃ COOH, Flussrate 1 ml/min (bei Nachsäulenderivatisierung mit Photoreaktor) <i>bzw.</i> Methanol mit 0,01 mol/l ZnCl ₂ , 0,005 mol/l CH ₃ COOH und 0,005 mol/l CH ₃ COONa, Flussrate 1 ml/min (bei Nachsäulenderivatisierung mit Zink-Reduktionssäule)

Anmerkung:

Dieses System wurde nur probeweise für Messungen mittels elektrochemischer Detektion und Nachsäulenderivatisierung eingesetzt. Auf Angabe der Retentionszeiten wird daher verzichtet.

4.3.9 Probenvorbereitung zur Tocopherolchinonbestimmung im Serum**Prinzip:**

Die Tocopherolchinone werden aus dem Serum nach Denaturierung der Serumproteine mit Methanol über eine Lipidextraktion isoliert. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden getestet (s.u.). Der erhaltene Lipidextrakt wird anschließend durch Säulenchromatographie an einer selbstgepackten Mini-Kieselgelsäule gereinigt. Störende unpolare Lipide (z.B. Triglyceride, Cholesterylester) sowie die Tocopherole werden dabei in der ersten Fraktion eluiert, während die Tocopherolchinone in einem zweiten Elutionsschritt von der Säule eluiert werden. Das Eluat

der Kieselgelsäule wird zur Trockne eingeengt und in Methanol mittels RP-HPLC vermessen. Die Quantifizierung erfolgt über die Methode der externen Kalibration.

4.3.9.1 Extrelut-Methode

0,5 ml Serum werden auf eine Extrelut-3-Säule gegeben. Nach 5 min wird das Serum mit 2 ml Methanol denaturiert, dem 0,25 mg/ml BHT zugesetzt sind. Nach weiteren 5 min erfolgt die Elution der Serumlipide mit 15 ml Hexan. Der gewonnene Hexanextrakt wird am Rotationsverdampfer vorsichtig bis fast zur Trockne eingeengt, letzte Lösungsmittelreste werden mit Hilfe eines Stickstoffstromes entfernt. Der in 2 ml Hexan aufgenommene Rückstand wird anschließend über eine selbstgepackte Mini-Kieselgelsäule (Pasteurpipette mit Kieselgel 60 F254, Füllhöhe ca. 5 cm, überschichtet mit ca. 0,5 cm Na₂SO₄ (wasserfrei)) gegeben. Die Säule wird mit 4 ml (3,5 ml)¹ einer Hexan/Diethylether-Mischung (20+3, v/v) gewaschen und die Tocopherolchinone schließlich mit 4 ml Hexan/Diethylether (3+2, v/v) eluiert. Das Eluat wird mit Hilfe des Vortex-Evaporators bei 40°C und Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeengt, in 200 µl Methanol (mit 0,025 mg/ml BHT) aufgenommen und in ein Schraubvial für die HPLC-Bestimmung überführt. Dieser Extrakt wird entweder sofort vermessen oder bis zur Messung bei -35°C gelagert.

4.3.9.2 Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode

0,5 ml Serum werden in ein mit Alufolie umwickeltes (Lichtschutz) Schliff-Reagenzglas gegeben und mit 1 ml Methanol (mit 0,25 mg/ml BHT) denaturiert. Die Mischung wird kurz mittels Vortex-Rüttler homogenisiert und nach 5 min Standzeit mit 3 ml Hexan versetzt. Zur Extraktion der Serumlipide wird anschließend 0,5 min mittels Vortex-Rüttler kräftig geschüttelt, nach 5 min Standzeit wird dies wiederholt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wird 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert und die überstehende Hexanphase vorsichtig mittels Pasteurpipette in ein mit Alufolie umwickeltes Spitzglas mit Glasstopfen überführt. Die wässrig-methanolische Serumphase wird anschließend mit weiteren 2 ml Hexan nach dem gleichen Verfahren nochmals extrahiert. Die vereinigten Hexanextrakte werden direkt über eine selbstgepackte Mini-Kieselgelsäule gegeben. Die Elution der Analyten von der Säule sowie die weitere Behandlung des Eluats erfolgt wie unter Punkt 4.3.9.1 beschrieben.

4.3.10 Bestimmung von α -Tocopherolchinon in Humanserumproben

Zur Bestimmung des α -Tocopherolchinon-Gehaltes in den ausgewählten Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 sowie den frischen Vergleichsproben erfolgte die Probenvorbereitung mittels der Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode nach Abschnitt 4.3.9.2 und die Messung der Gehalte mit dem Shimadzu HPLC/Fluoreszenz-System mit Nachsäulenderivatisierung (Photoreaktor) nach Abschnitt 4.3.8, System 2.

¹ 4 ml Elutionsvolumen bei der ersten Kieselgelcharge; nach Anbruch einer neuen Packung des Kieselgel-Füllmaterials war eine Reduktion des Eluentenvolumens auf 3,5 ml erforderlich, da 4 ml Elutionsvolumen bereits zur teilweisen Elution des α -TQ führten.

4.3.11 Statistische Methoden zur Datenauswertung

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch einige statistische Methoden zur Datenauswertung herangezogen wurden, wird im Folgenden eine kurze Erläuterung zu den verwendeten Parametern, grafischen Darstellungen und statistischen Tests gegeben. Grundlegende statistische Kenntnisse werden jedoch vorausgesetzt, ggf. sei auf entsprechende Statistik-Lehrbücher verwiesen (z.B. [31]) Die statistischen Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mit Hilfe der Statistik-Software SPSS für Windows, Version 11.5.1.

Bei der Betrachtung der Messergebnisse für die Tocopherol- und α -TQ-Gehalte der Serumproben wurden verschiedene Parameter ermittelt, mit deren Hilfe sich die Verteilung der Messwerte in Kurzform beschreiben lässt. Dazu gehören der Mittelwert (arithmetisches Mittel), der Median, die Standardabweichung sowie die gemessenen Minimal- und Maximalwerte.

Zur grafischen Veranschaulichung der Verteilung der Messwerte wurde die Form des Boxplots (auch als Box-Whisker-Plot bezeichnet) gewählt. In Abbildung 8 ist dafür ein Beispiel gegeben; gezeigt wird die Verteilung der α -TQ-Gehalte in den Surveyproben (vgl. Abschnitt 6.2).

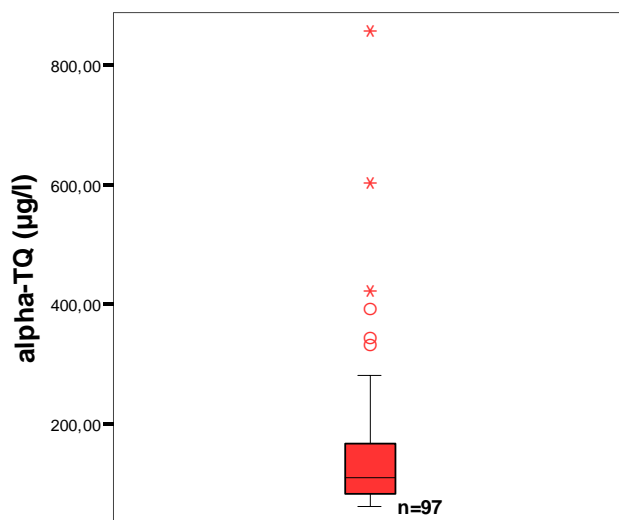


Abbildung 8: Beispiel für einen Box-Plot; α -TQ-Gehalte in den Serumproben des BGS 98

Die untere Grenze des farbigen Kastens zeigt dabei das 25. Perzentil (1. Quartil) an. Es trennt die 25% der kleinsten Werte von den übrigen ab. Die obere Grenze des Kastens zeigt entsprechend das 75. Perzentil (3. Quartil) an, so dass innerhalb des Kastens 50% aller Fälle liegen. Die Höhe des Kastens entspricht dem sogenannten Interquartilbereich und gibt einen Hinweis auf die Streuung der Werte dieser Gruppe. Die schwarze Linie innerhalb des Kastens zeigt den Median, also den mittleren Beobachtungswert der entsprechend ihrer Größe in einer Rangreihe angeordneten Messwerte. Von der unteren und oberen Kantenkante sind senkrechte Linien gezogen, die mit einem Querbalken enden. Mit diesen Querbalken werden die größten und kleinsten Werte (ausgenommen Extremwerte und Ausreißer) markiert. Ausreißer sind Werte, die 1,5 bis 3 Kastenlängen vom oberen bzw. unteren Kastenrand entfernt sind. Sie werden mit einem Kreis (o) gekennzeichnet. Werte, die mehr als 3 Kastenlängen vom oberen bzw. unteren

Rand des Kastens entfernt liegen, werden als Extremwerte bezeichnet und mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Eine Betrachtung der Lage des Medians innerhalb des Kastens im Boxplots gibt bereits einen ersten Eindruck über die Symmetrie der Verteilung. Einen genaueren Eindruck erhält man bei Darstellung der Daten in Form eines Histogramms (Abbildung 9). Hier ist gut zu erkennen, dass es sich bei der Verteilung der α -TQ-Werte um eine linkssteile, rechsschiefe Verteilung handelt.

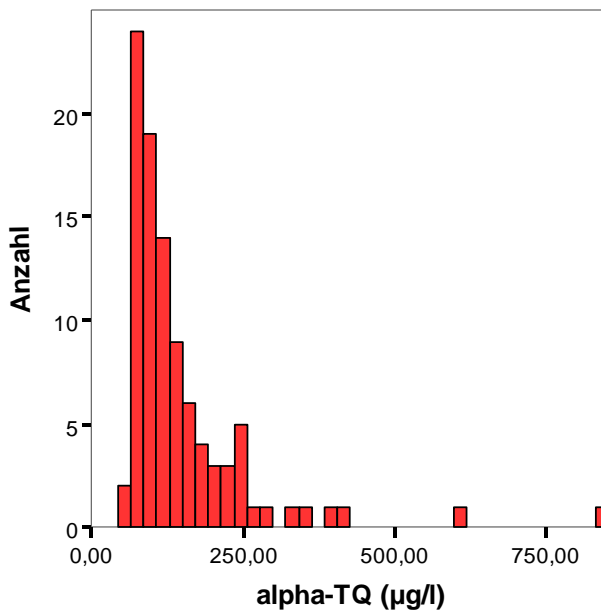


Abbildung 9: Verteilung der α -TQ-Messwerte der Surveyproben, Histogramm für die in Klassen aufgeteilten Messwerte

Bei den anderen Meßwerten bzw. den daraus berechneten Werten (α -, β -, γ - und δ -Tocopherol, α -TQ/ α -Tocopherol-Quotient, α -Tocopherol/Cholesterin-Quotient) ist die Schiefe in der Regel weniger deutlich ausgeprägt. Trotzdem zeigt der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest, dass für keine der Variablen eine Normalverteilung angenommen werden kann.

Daher wurden zur Analyse von Unterschieden der Variablen zwischen verschiedenen Gruppen, wie beispielsweise zwischen den Tocopherol-Nehmern und Nichtnehmern, sogenannte nicht-parametrische Tests eingesetzt, die keine Normalverteilung der Daten voraussetzen. Zur Untersuchung metrischer Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Dieser Test ist eine Alternative zum parametrischen t-Test für den Vergleich von zwei Mittelwerten von Verteilungen, wenn die Voraussetzungen für den t-Test (hier: Normalverteilung) nicht erfüllt sind. Der Mann-Whitney-U-Test prüft auf Unterschiede hinsichtlich der zentralen Tendenz der Verteilungen, wobei statt der Messwerte der Variablen die Rangplätze zugrundegelegt werden. Ermittelt wird eine Testvariable U, anhand derer von der SPSS-Software die zugehörige „Asymptotische Signifikanz (2-seitig)“ berechnet wird, die in den Tabellen in Abschnitt 6 als p bezeichnet wird. Wenn p kleiner ist als das für den Test angenommene 5%-Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$), wird die H_0 -Hypothese („Die Variable hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche

Verteilung.“) abgelehnt. Dementsprechend wird die H_1 -Hypothese („Die zentrale Tendenz der Verteilung unterscheidet sich in den beiden Grundgesamtheiten.“) angenommen und von einem signifikanten Unterschied gesprochen, wenn der errechnete Wert $p \leq 0,05$ ist. Wenn $p \leq 0,001$ ist, kann von einem hochsignifikanten Unterschied gesprochen werden.

Zur Untersuchung alternativer Daten, also von Variablen, die nur zwei Ausprägungen aufweisen (z.B. ja/ nein), können die Daten in einer Vierfeldertafel (vgl. Tabelle 7) dargestellt werden. Angegeben ist dabei jeweils die beobachtete Anzahl n der Fälle der jeweiligen Stichproben, die in die Kategorie 1 oder 2 des untersuchten Merkmals fallen, sowie die Zeilensummen Z und die Spaltensummen S . Auf Basis dieser Daten wird anschließend der χ^2 -Vierfeldertest durchgeführt. Dieser Test prüft, ob der Unterschied zwischen den beobachteten Häufigkeiten zufällig ist (H_0) oder ob die Differenzen durch unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten der Ausprägung zurückzuführen sind (H_1). Die Ablehnung der H_0 -Hypothese erfolgt ebenfalls bei $p \leq 0,05$.

	Stichprobe 1	Stichprobe 2	Σ
Kategorie 1	n_{11}	n_{12}	Z_1
Kategorie 2	n_{21}	n_{22}	Z_2
Σ	S_1	S_2	N

Tabelle 7: Schematische Darstellung einer Vierfeldertafel

Für den Einsatz des χ^2 -Vierfeldertests sollte ein Gesamtstichprobenumfang N von mindestens 60 vorliegen und die erwarteten Häufigkeiten in jeder Zelle sollten mindestens 5 betragen. Das

Minimum der erwarteten Häufigkeiten wird nach $N\bar{p}_{\min} = \frac{S_{\min} \cdot Z_{\min}}{N}$ berechnet.

Wenn eine dieser Voraussetzungen nicht erfüllt ist, kann auf den exakten Test nach Fisher zurückgegriffen werden. Dieser Test berechnet exakte Werte für die Wahrscheinlichkeit, die beobachteten Resultate zu erhalten, wenn die Variablen unabhängig voneinander sind und die Randverteilung als fest angenommen wird. Auch hier wird die H_0 -Hypothese eines zufälligen Unterschieds abgelehnt, wenn die berechnete „exakte Signifikanz (1-seitig)“ $\leq 0,05$ ist.

Zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen zwei metrischen Variablen wurde die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (Spearman's rho) gewählt. Dieser ist ein Maß für die Stärke des Zusammenhanges zwischen den beiden Variablen. Er bewegt sich in den Grenzen von +1 bis - 1, wobei sich über den Betrag des Koeffizienten die Stärke und über das Vorzeichen die Richtung des Zusammenhanges abschätzen lassen. Der Zusammenhang ist umso stärker, je größer der Betrag des Rangkorrelationskoeffizienten ist. Bei positivem Vorzeichen besteht eine direkte Korrelation zwischen den beiden Variablen X und Y , d.h. bei wachsendem X steigt auch Y . Dagegen besteht bei negativem Vorzeichen eine inverse Korrelation zwischen den Variablen, wachsende Werte der einen Variablen sind also mit sinkenden Werten der anderen Variablen verbunden. Die Beurteilung der statistischen Signifikanz des Zusammenhanges erfolgt über die berechnete Asymptotische Signifikanz p . Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wird bei $p \leq 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse und Diskussion – Teil 1:

Methodenentwicklung zur Bestimmung von Tocopheroloxida- produkten im Humanserum

5.1 Synthese der Referenzsubstanzen

Zum Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Arbeiten waren die für die Methodenentwicklung notwendigen Referenzsubstanzen der Tocopherolchinone und Tocopherolhydrochinone im Chemikalienfachhandel nicht käuflich zu erwerben. Es war daher erforderlich, diese Substanzen zunächst selbst zu synthetisieren.

5.1.1 Tocopherolchinone

Die in der Literatur beschriebenen Synthesewege zur Darstellung der Tocopherolchinone basieren in der Regel auf der Oxidation der Tocopherole mit Eisen-III-chlorid, wie z.B. die von Schudel et al. [189] und Mackenzie et al. [132] beschriebenen Vorgehensweisen. Häufig wird zusätzlich 2,2'-Bipyridin als Komplexbildner zugesetzt [151,27,45]. Weiterhin werden einige alternative Synthesewege beschrieben, wie z.B. die Verwendung von AuCl_3 [218], AgNO_3 [34] oder $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4$ [87] statt des FeCl_3 als Oxidationsmittel. Von Rao et al. [175] wird von der erfolgreichen Synthese des α -Tocopherolchinons durch Oxidation von α -Tocopherol mit konzentrierter Salpetersäure berichtet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Methoden der Oxidation mit FeCl_3 sowie die Oxidation mit Salpetersäure nach Rao [175] getestet (vgl. Abschnitt 4.3.2). Letztere führte zur Entstehung eines umfangreichen Produktspektrums und erwies sich daher als weitgehend unbrauchbar. Dagegen wurde bei der Oxidation von α -Tocopherol mit FeCl_3 ohne Zusatz von 2,2'-Bipyridin, in Anlehnung an die Methode nach Schudel et al. [189], das α -Tocopherolchinon ohne nennenswerte Nebenprodukte gebildet. Bei Verwendung dieser Methode zur Oxidation von β -, γ - und δ -Tocopherol war, neben der Bildung der entsprechenden Tocopherolchinone als Hauptprodukt der Reaktion, die Entstehung einer Reihe von Nebenprodukten zu beobachten. Hier konnte mit der Synthesemethode nach Nair [151] unter Zusatz von 2,2'-Bipyridin ein besseres Ergebnis erzielt werden, wenngleich auch hier das erhaltene Reaktionsprodukt nicht frei von Nebenprodukten war. Durch Reinigung der Reaktionsprodukte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 F254 – Platten (2mm Schichtdicke) mit Petrol-ether (40-60°C)/ Diethylether (1+1, v/v) als Eluent konnten jedoch alle vier Tocopherolchinone in hoher (α - und β -TQ) bis ausreichender (γ - und δ -TQ) Reinheit isoliert werden. Ebenfalls getestet wurde die Reinigung der Reaktionsprodukte mittels GPC an Sephadex LH-20. Die hierbei erzielten Resultate waren aber im Vergleich zur präparativen DC tendenziell schlechter.

5.1.2 Tocopherolhydrochinone

Die Tocopherolhydrochinone wurden in Anlehnung an die Methode nach Liebler et al. [129] aus den zuvor synthetisierten Tocopherolchinonen durch Reduktion mittels Natriumborhydrid in ethanolischer Lösung hergestellt (vgl. Abschnitt 4.3.2.5). Diese Umsetzung verläuft für alle vier Tocopherolchinone weitgehend vollständig. Es ist jedoch eine rasche Rückreaktion der äußerst oxidationsempfindlichen Tocopherolhydrochinone zu den entsprechenden Chinonen zu beobachten. Die Stabilität der Hydrochinone nimmt dabei vom δ -THQ über β/γ -THQ zum α -THQ ab.

Auch ein Zusatz von Antioxidanzien wie BHT oder TBHQ konnte die Rückreaktion nicht dauerhaft verhindern. Daher wurde auf eine Isolierung und Lagerung der Tocopherolhydrochinone als Reinsubstanzen verzichtet und diese wurden statt dessen bei Bedarf stets frisch synthetisiert.

5.2 Analytische Charakterisierung und Reinheitsprüfung der Referenzsubstanzen

5.2.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Zur Überprüfung von Identität und Reinheit der mittels präparativer DC vorgereinigten Referenzsubstanzen wurden diese mittels GC/MS vermessen. Eingesetzt wurde hierfür ein Finnigan GCQ-(Ion Trap)-System mit einer 30m Restek RTX-5MS Säule (vgl. Abschnitt 4.3.6).

Während die Tocopherolhydrochinone (THQ) nur nach Derivatisierung (als Trimethylsilyl-derivate, TMS-Derivate) detektiert werden konnten, waren die Tocopherolchinone (TQ) sowohl derivatisiert als auch underivatisiert messbar. Als Derivatisierungsreagenz wurde Trimethylsilylimidazol (TSIM) eingesetzt. Selbst unter milden Reaktionsbedingungen (20min bei Raumtemperatur) wurde hiermit eine vollständige Umsetzung der Tocopherolchinone bzw. -hydrochinone zu den mono- bzw. tri-TMS-Derivaten erreicht. Abbildung 10 zeigt die GC/MS-Trennung der underivatisierten TQ-Referenzsubstanzen sowie der THQ-TMS-Derivate.

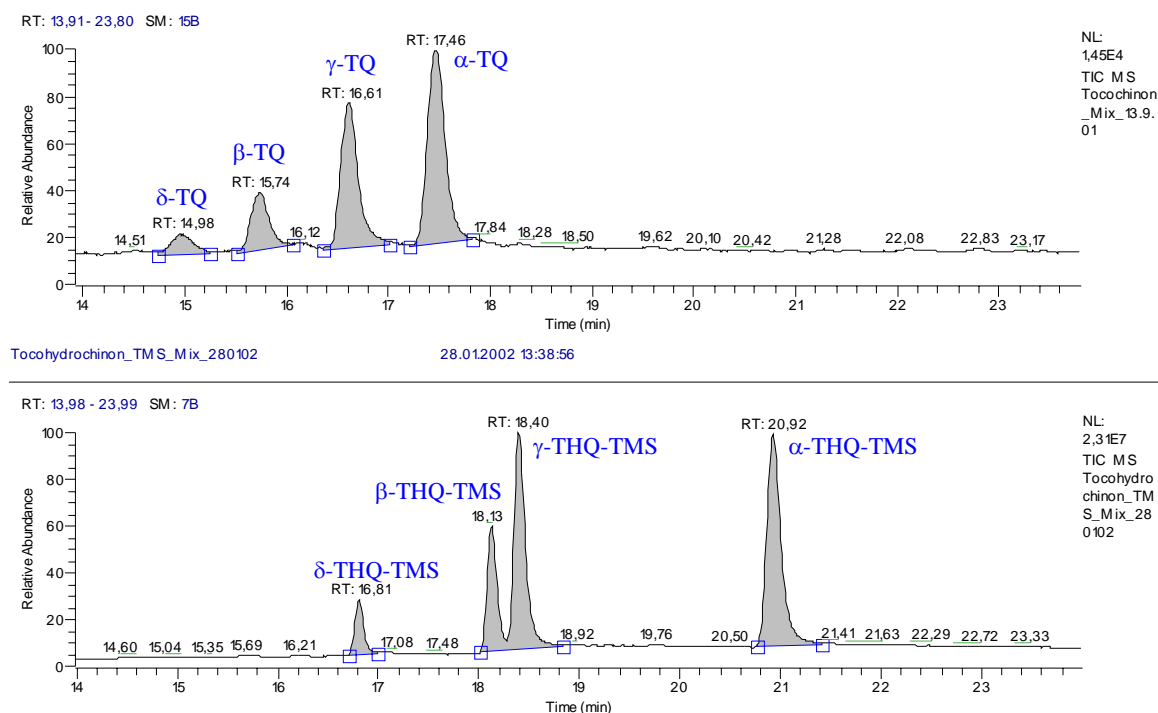


Abbildung 10: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der GC/MS-Bestimmung der freien Tocopherolchinone (oben) und der Tocopherolhydrochinon-TMS-Derivate (unten)

Ebenso wie die freien Tocopherolchinone werden auch die TMS-Derivate von α -, β -, γ - und δ -TQ basisliniengetreunt, wobei die Retentionszeiten im Vergleich zu den underivatisierten Verbindungen um 0,2-0,4 min nach vorn verschoben sind.

Interessant ist, dass bei der Vermessung der derivatisierten Tocopherolchinone neben dem TQ-TMS-Peak stets auch der entsprechende THQ-TMS-Peak detektiert wird. Letzterer ist klein (< 10% des TQ-Peaks) im Falle des α -THQ; seine Größe nimmt jedoch über β -, γ - bis zum δ -THQ zu, wobei beim δ -TQ-TMS-Standard der Hydrochinon-TMS-Peak bereits der größere der beiden Peaks ist. Von diesem Problem berichten auch Mottier et al. [146] und Liebler et al. [129] für α -TQ bei Derivatisierung mit BSTFA/TMCS (10:1, v/v). Zur Messung von β -, γ - und δ -TQ-TMS mittels GC/MS oder sonstiger GC-Methoden finden sich in der Literatur bisher dagegen keinerlei Angaben. Für das Vorhandensein der THQ-TMS-Peaks in den silylierten TQ-Standards sind im Wesentlichen zwei Erklärungen denkbar:

- 1) Die synthetisierten Tocopherolchinon-Referenzsubstanzen enthalten mehr oder weniger große Mengen des entsprechenden Hydrochinons. Bei Vermessung der underivatisierten Substanzen ist dies jedoch nicht sichtbar, da die underivatisierten Tocopherolhydrochinone mit der eingesetzten Messmethode nicht detektierbar sind (s.o.).
- 2) Die Hydrochinone werden erst im Zuge der Derivatisierungsreaktion gebildet, wobei sie durch rasche Reaktion zu den (tri-)TMS-Derivaten stabilisiert werden.

Spätere Messungen mittels HPLC (vgl. Abschnitt 4.3.8) zeigten, dass der zweiten Erklärung der Vorzug zu geben ist, da hier keine nennenswerten Mengen an Hydrochinonen detektiert werden, obwohl diese mit Hilfe der Fluoreszenz-Detektion sehr empfindlich nachgewiesen werden können. Vermutlich wirkt das Derivatisierungsreagenz selbst in diesem Falle als Reduktionsmittel. Ebenfalls für Hypothese 2) spricht die Beobachtung, dass auch eine Nachoxidation der Tocopherolchinon-Standards mit Eisen-(III)-chlorid unmittelbar vor der Derivatisierung und Messung nicht zu einer Verkleinerung der THQ-TMS-Peaks führt.

Im Gegensatz dazu kommen Mottier et al. [146] und Liebler et al. [129] zu der Schlussfolgerung, dass die beobachteten THQ-TMS-Peaks auf eine partielle Reduktion der Tocopherolchinone zu den Hydrochinonen während der Probenaufarbeitung bzw. Lagerung der Referenzsubstanzen zurückzuführen sind. Liebler et al. geben an, dem Problem durch eine Behandlung des α -TQ-Standards mit dem Oxidationsmittel FeCl_3 unmittelbar vor der Derivatisierung und Messung begegnen zu können. Entsprechende im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Versuche brachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Mottier et al. beschreiben dagegen eine Umgehung des Problems durch Verwendung von Sylon BTZ (einer Mischung aus BSA, TMCS und TSIM, 3:2:3) als alternatives Silylierungsreagenz, das zu einer vollständigen Umwandlung des α -TQ-Standards zum α -THQ-(tri)-TMS-Derivat führen soll. Dabei stellen sie die Hypothese auf, dass hierbei das TSIM als Reduktionsmittel wirkt. Versuche, diese Silylierungsmethode im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu reproduzieren, schlugen jedoch fehl. Es wurde sogar *weniger* Hydrochinon-TMS-Derivat gebildet als bei der alleinigen Verwendung von TSIM als Silylierungsreagenz. Ebenfalls erwähnenswert ist, dass Mottier neben der GC/MS-Bestimmung auch eine HPLC-MS-Bestimmung des underivatisierten α -TQ vornahm und mit dieser Methode *kein* α -THQ nachweisen konnte. Erklärt wird dieser Befund damit, dass keine Reduktion von α -TQ während der Probenvorbereitung erfolgte. Die Probenvorbereitungsmethode ist jedoch mit Ausnahme der Derivatisierung dieselbe wie bei der GC/MS-Bestimmung. Daher ist anzunehmen, dass die Detektion des α -THQ-TMS-Peaks in der GC/MS

eine Folge der Derivatisierungsprozedur ist. Dafür spricht ebenso die Detektion unterschiedlicher Mengen an α -THQ-TMS bei Verwendung verschiedener Silylierungsreagenzien.

Die GC-MS-Bestimmung der synthetisierten Referenzsubstanzen lieferte auch die gewünschte Bestätigung der Identität der Substanzen. Die Abbildungen 11-13 zeigen die Massenspektren von α -TQ, α -TQ-TMS und α -THQ-TMS. Diese stehen im Einklang mit Literaturangaben [175,129,146] und liefern plausible Fraktionierungsmuster, die die Identität der Substanzen hinreichend bestätigen.

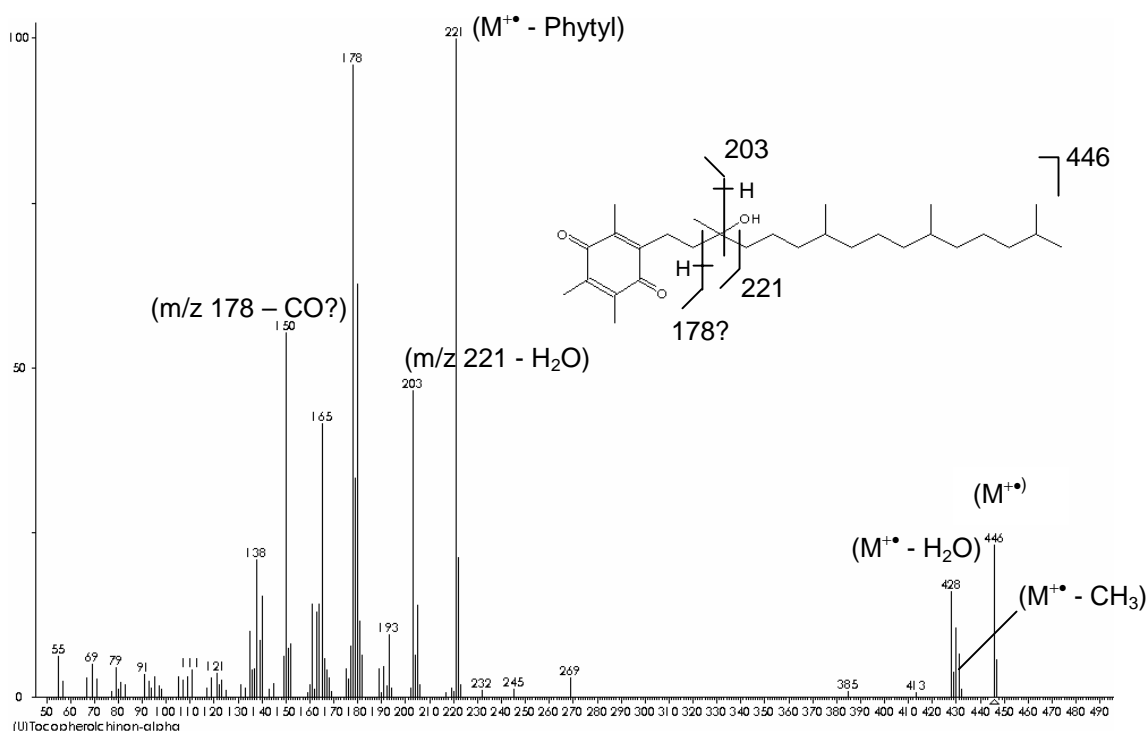


Abbildung 11: Massenspektrum des synthetisierten α -Tocopherolchinons mit Erläuterungen zu einigen wichtigen Fragment-Ionen

Identität und Reinheit des synthetisierten α -Tocopherolchinons konnten zusätzlich durch Vergleich des chromatographischen Verhaltens und der Massenspektren mit einer mittlerweile von der Firma ACROS Biochemicals kommerziell vertriebenen Referenzsubstanz bestätigt werden.

Die synthetisierten β -, γ - und δ -TQ- bzw. THQ-Referenzsubstanzen zeigen Massenspektren, die denen des α -TQ/THQ unter Berücksichtigung der entsprechenden Massendifferenzen weitgehend entsprechen (siehe Anhang A) und auch das chromatographische Verhalten steht im Einklang mit den Erwartungen (Retention α -TQ > γ -TQ > β -TQ > δ -TQ, vgl. Abbildung 10, analog den entsprechenden Tocopherolen).

Bei den underivatisierten Tocopherolchinonen werden für alle vier Substanzen das Molekül-Ion sowie mit etwas geringerer Intensität das $(M^{+\bullet} - \text{H}_2\text{O})$ -Ion detektiert (vgl. Anhang A sowie Abbildung 11). Ebenso findet sich jeweils ein kleines $(M^{+\bullet} - \text{CH}_3)$ -Ion. Durch Spaltung der Bindung in α -Stellung zur tertiären OH-Gruppe der Seitenkette unter Verlust des größten Alkylradikals (ehemalige Phytyl-Seitenkette des Tocopherols) entsteht das wichtige Fragment-Ion

m/z 221 beim α -TQ (bzw. m/z 207 bei β - und γ -TQ, m/z 193 beim δ -TQ), aus dem durch Wasserabspaltung die Ionen bei m/z 203 (α -TQ) bzw. m/z 189 (β - und γ -TQ) oder m/z 175 (δ -TQ) hervorgehen. Diese Wasserabspaltung gewinnt vom α -TQ über das β -TQ bis zum γ - und δ -TQ zunehmend an Bedeutung.

Deutlich einheitlicher bezüglich der Intensitäten der jeweiligen Fragment-Ionen zeigen sich die TMS-Derivate der Tocopherolchinone (Anhang A sowie Abbildung 12).

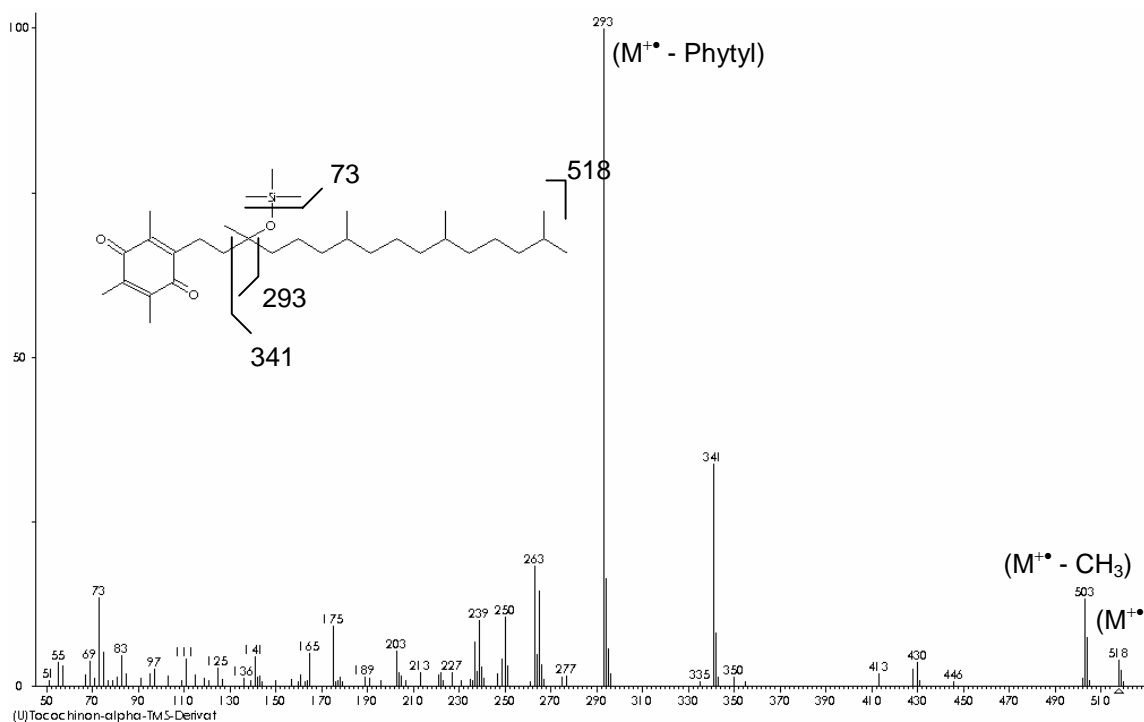


Abbildung 12: Massenspektrum des TMS-Derivates des synthetisierten α -Tocopherolchinons mit Erläuterungen zu einigen wichtigen Fragment-Ionen

Hier werden neben dem kleinen Molekül-Ion im Wesentlichen die Produkte der α -Spaltung der Bindungen in Nachbarschaft zur O-TMS-Gruppe der Seitenkette gebildet. Im Einklang mit der Regel der bevorzugten Abspaltung des größten Alkylradikals zeigt das Ion, das durch Abspaltung des Phytlyl-Radikals entsteht (z.B. bei α -TQ-TMS m/z 293), die höchste Intensität, gefolgt von m/z 341 und $(M^{+\bullet} - CH_3)$ mit deutlich geringerer Intensität. Da bei m/z 341 der Molekülteil mit dem chinoiden Ring verlorengegangen ist, in dessen Methylsubstitution sich die Tocopherolchinone unterscheiden, findet sich ein Fragment dieser Masse in den Massenspektren aller vier TQ-TMS-Derivate.

Bei den Tocopherolhydrochinon-TMS-Derivaten zeigt sich ebenfalls ein relativ einheitliches Fragmentierungsmuster für alle vier Verbindungen (Anhang A sowie Abbildung 13), wobei das Molekül-Ion sowie das daraus nach Verlust einer $Si(CH_3)_3OH$ -Gruppierung resultierende Ion dominieren. Weiterhin findet sich das vermutlich durch Benzylspaltung in Nachbarschaft zum aromatischen Ring entstehende Fragment-Ion (bei α -THQ-TMS m/z 309), dessen Intensität von α -THQ-TMS \rightarrow δ -THQ-TMS abnimmt, sowie ein kleiner $(M^{+\bullet} - CH_3)$ - Peak. Die aus der

α -Spaltung in der Seitenkette hervorgehenden Ionen (bei α -THQ-TMS m/z 439 und 341, analog m/z 293 und 341 bei α -TQ-TMS) weisen dagegen nur sehr geringe Intensitäten auf.

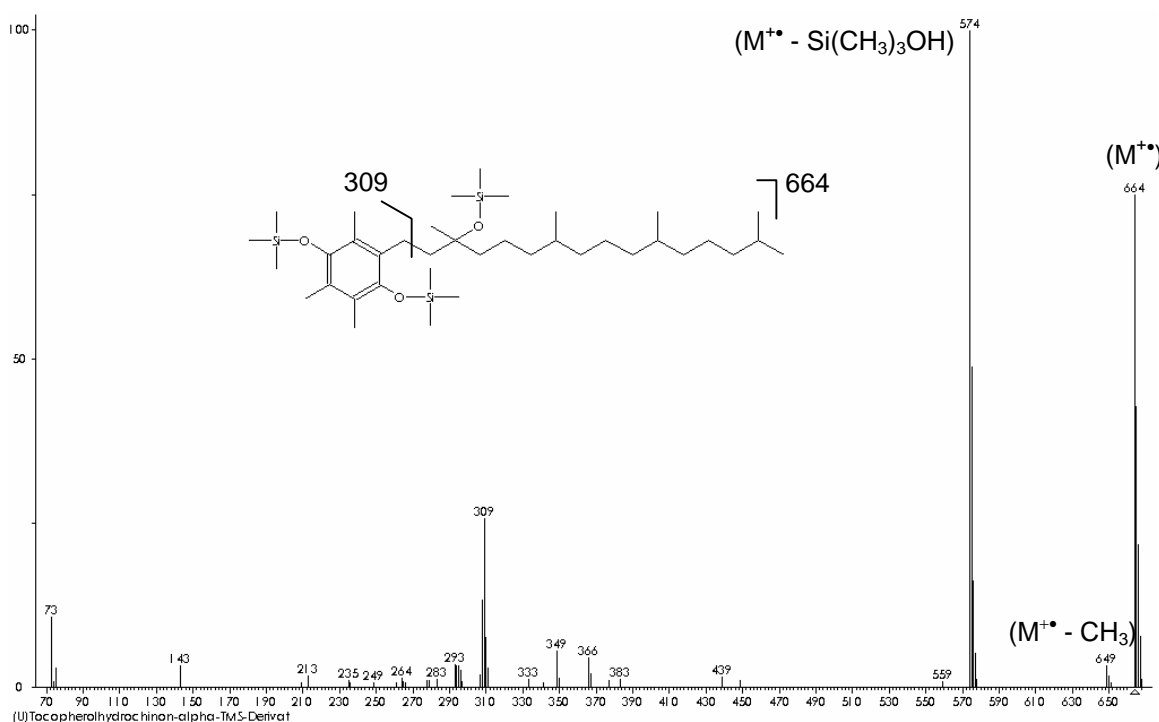


Abbildung 13: Massenspektrum des TMS-Derivates des synthetisierten α -Tocopherolhydrochinons mit Erläuterungen zu einigen wichtigen Fragment-Ionen

Auch wenn aufgrund der fehlenden Ausstattung des Labors mit weiteren Instrumenten zur Strukturaufklärung wie der IR- oder NMR-Spektroskopie auf eine weitere Absicherung der Identität der synthetisierten Substanzen verzichtet werden musste, lässt die Betrachtung der Massenspektren der TQ, TQ-TMS und THQ-TMS Verbindungen mit großer Sicherheit auf eine erfolgreiche Synthese der Tocopherolchinone und -hydrochinone schließen.

Im Hinblick auf quantitative Messungen zur Gehaltsbestimmung der Tocopherolchinone in Serumproben erwies sich die GC/MS mit dem eingesetzten Finnigan-GCQ-Gerät dagegen als weniger Erfolg versprechend. So waren einerseits die erreichten Nachweisgrenzen im unteren ng/ μ l-Bereich für eine Bestimmung der Analyten in den Serumextrakten nicht ausreichend, andererseits unterlag die Empfindlichkeit der GC/MS-Messung im Zeitverlauf erheblichen Schwankungen. Vor allem bei Messung der TMS-Derivate war eine sehr häufige Reinigung des Ion-Volumens erforderlich, andernfalls war ein rascher Abfall der Signalintensitäten zu beobachten. Zuverlässige quantitative Messungen konnten aufgrund der schwankenden Signalintensitäten nur bei Verwendung der Bracket-Kalibrationsmethode erfolgen.

Auch eine mit α -TQ-TMS versuchsweise durchgeführte Ionisierung mittels chemischer Ionisierung (Reaktandgas Methan), sowohl im positiven als auch im negativen Modus, führte nicht zu einer verbesserten Sensitivität.

Eine Steigerung der Empfindlichkeit konnte dagegen bei Verwendung der GC/MS-MS-Technik erzielt werden (vgl. 5.4.2, Abbildung 18). Diese Vorgehensweise wurde jedoch erst relativ spät im Verlaufe der Arbeiten getestet und konnte aus Zeitgründen nicht weiter vertieft werden.

5.2.2 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC/FID)

Neben der GC/MS-Bestimmung wurde auch der Einsatz der GC/FID zur Bestimmung der Tocopherolchinone und -hydrochinone getestet. Verwendet wurde dafür ein HP 5890-System mit einer 5 m x 0,53 mm HP-1-Säule mit 2,65 μm Filmdicke (vgl. 4.3.5.).

Aufgrund der kurzen Säule ist die Trennleistung des Systems etwas schlechter als die des oben beschriebenen GC/MS-Systems. So wird keine vollständige Trennung von β -/ γ -TQ, β -/ γ -TQ-TMS bzw. β -/ γ -THQ-TMS erzielt. Die Empfindlichkeit der Messung ist dagegen etwas besser als beim GCQ-System (Bestimmungsgrenze für α -TQ ca. 1 ng/ μl , abgeschätzt über Signal-Rausch-Verhältnis ≈ 10), jedoch ebenfalls noch nicht ausreichend für die Detektion der Oxidationsprodukte in den Serumproben.

Für die γ - und δ -TQ-Referenzsubstanzen wurden ohne Derivatisierung neben dem vermutlichen TQ-Hauptpeak jeweils mehrere Peaks detektiert, auch wiederholte Reinigungsschritte mittels verschiedener DC-Systeme, GPC an Sephadex LH-20 bzw. Säulenchromatographie an Kieselgel oder Aluminiumoxid schafften keine Abhilfe. Da bei den späteren Messungen mittels HPLC nur geringfügige Begleitpeaks detektiert wurden und auch bei den Messungen mittels GC/MS deutlich weniger Nebenprodukte zu beobachten waren, handelt es sich hierbei vermutlich nicht (nur) um mangelnde Reinheit der Referenzsubstanzen, sondern um einen Zersetzungsprozess im Injektor. Dafür spricht auch die Tatsache, dass sich nach Derivatisierung mit TSIM auch bei γ - und δ -TQ das schon von der GC/MS-Messung bekannte chromatographische Bild von TQ-TMS-Peak und THQ-TMS-Peak ohne nennenswerte Begleitpeaks ergibt.

5.2.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

5.2.3.1 HPLC/UV

Aufgrund der ungenügenden Sensitivität der GC-Systeme sowie der bei der Derivatisierung der Tocopherolchinone auftretenden Probleme einer Aufspaltung in einen TQ- und THQ-TMS-Peak war es erforderlich, nach einer alternativen Bestimmungsmethode zu suchen, mit der sich diese Probleme umgehen lassen. Hierfür bot sich insbesondere die RP-HPLC an, da in der Literatur bereits einige erfolgreiche Anwendungen dieser Technik, in der Regel zur Bestimmung von α -TQ, beschrieben worden sind.

Für die Messungen wurde zunächst ein Knauer-HPLC-System mit UV-Detektor, später ein Shimadzu-System mit UV- und Fluoreszenzdetektor eingesetzt. In beiden Systemen wurde eine 250 x 4,6 mm LiChrosorb-100 RP 18 Säule (Knauer) sowie Methanol als Eluent verwendet (vgl. Abschnitt 4.3.8).

Unter diesen Bedingungen wird eine vollständige Trennung von α -, β / γ - und δ -TQ in etwa 10 min erreicht. Das Problem der Koelution der β - und γ -Isomere in der RP-HPLC ist auch von den entsprechenden Tocopherolen bekannt, deren Elution bei dem hier verwendeten System unmittelbar im Anschluss an die der Tocopherolchinone erfolgt. Die vier Tocopherolhydrochinone werden unter den verwendeten Bedingungen nicht voneinander getrennt und eluieren

als gemeinsamer leicht inhomogener Peak bei etwa 5 min, somit deutlich vor den Tocopherolchinonen. Eine wesentliche Verbesserung der Trennung der kritischen Substanzpaare konnte auch bei Verringerung der Elutionsstärke des Eluenten durch Wasserzusatz nicht erreicht werden. Ein Wasseranteil von 5% (v/v) hatte bereits eine Verdoppelung der Retentionszeiten zur Folge, ohne zu einer wesentlich verbesserten Trennung zu führen.

Da die Tocopherolchinone eine recht starke UV-Absorption bei etwa 260-270 nm zeigen, ist ein relativ empfindlicher Nachweis mittels UV-Detektion möglich. Das Shimadzu HPLC/UV-System erwies sich dabei als wesentlich leistungsfähiger als das zuerst verwendete Knauer HPLC/UV-System; die Empfindlichkeit der Messung steigerte sich hiermit nahezu um den Faktor 10.

Während eine direkte Fluoreszenzdetektion der Tocopherolchinone nicht möglich ist, lassen die Tocopherolhydrochinone sich sehr gut mittels Fluoreszenz-Detektion nachweisen. Ein direkter Nachweis der Hydrochinone in den Serumproben erschien jedoch gemäß der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sowie in Anbetracht des begrenzten Zeitrahmens aus mehreren Gründen nicht sinnvoll:

1. Die Tocopherolhydrochinone sind äußerst oxidationsempfindlich. Dies hat zur Folge, dass während der Probenvorbereitungs-Prozedur, sofern nicht sehr aufwändige Präventionsmaßnahmen getroffen werden, eine mehr oder weniger vollständige Oxidation der eventuell vorhandenen Hydrochinone zu den entsprechenden Chinonen erfolgt. Von diesem Phänomen berichten auch mehrere Literaturquellen [27,84,13,129,123].
2. Es liegen bisher keinerlei Erkenntnisse vor, wie sich die Lagerung der Serumproben auf das TQ/THQ-Mengenverhältnis auswirkt. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die verwendete Lagertemperatur von -35°C nicht ausreichend niedrig ist, um eine partielle Oxidation der Hydrochinone im Laufe der Lagerung zu verhindern.
3. Die hohe Oxidationsempfindlichkeit der Tocopherolhydrochinone macht weiterhin die Gewinnung und Lagerung der Verbindungen als Referenzsubstanzen für quantitative Bestimmungen sehr schwierig. Die für die verschiedenen Messungen und Versuche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Hydrochinon-Standards wurden stets unmittelbar vor Verwendung frisch aus den entsprechenden Chinonen synthetisiert, da eine äußerst rasche Rückreaktion zu den Chinonen erfolgt.
4. Das chromatographische Verhalten der Tocopherolhydrochinone in der RP-HPLC ist recht ungünstig. Erstens werden die vier Substanzen unter den verwendeten Bedingungen nicht getrennt, zweitens eluiert der Hydrochinon-Peak im vorderen Bereich des Chromatogramms, wo die Detektion sowohl durch Matrixkomponenten des Serums als auch durch Verunreinigungen aus den Lösungsmitteln gestört wird.

Es erschien daher sinnvoller, die Oxidation eventuell vorhandener Tocopherolhydrochinone im Zuge der Probenvorbereitung in Kauf zu nehmen, somit auf die getrennte Bestimmung der Chinone und Hydrochinone in den Serumproben zu verzichten und beide Substanzgruppen als Summenparameter in Form der jeweiligen Tocopherolchinone zu bestimmen.

5.2.3.2 HPLC/Fluoreszenz bzw. HPLC/ED mit Nachsäulenderivatisierung

Mit dem Ziel der Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit und Spezifität der Bestimmung wurden neben der UV-Detektion weitere Nachweisverfahren getestet. Als alternative Detektoren standen ein Fluoreszenz- sowie ein amperometrischer elektrochemischer Detektor zur Verfügung. Beide Detektoren sind jedoch zum direkten Nachweis der Tocopherolchinone ungeeignet, da diese Verbindungen weder eine native Fluoreszenz zeigen, noch eine elektrochemische Bestimmung im oxidativen Modus ermöglichen. Prinzipiell wäre eine Bestimmung der Tocopherolchinone im reduktiven Modus des elektrochemischen Detektors möglich; es wurde jedoch darauf verzichtet, da die verwendete Knauer-HPLC-Anlage dafür wenig geeignet ist. So besitzt sie weder einen online-Degasser noch stand ein Inertgas-Anschluss zum Entfernen störenden gelösten Sauerstoffs in der mobilen Phase zur Verfügung. Um trotzdem eine Verwendung des verfügbaren Fluoreszenz- bzw. elektrochemischen Detektors zu ermöglichen, wurden zwei verschiedene Verfahren zur Nachsäulenderivatisierung auf ihre Einsatzmöglichkeiten für die vorliegenden Substanzen getestet.

1. **Photoreaktor:**

Für die Untersuchungen stand ein Photoreaktor der Firma Knauer zur Verfügung, der zwischen Ausgang der Trennsäule und Eingang des Detektors installiert wurde. Dabei wird das Eluat der Trennsäule in einem UV-transparenten, um eine Niederdruck-UV-Lampe geflochtenen, Teflonschlauch (6 m x 0,3 mm ID) mit UV-Licht (Hauptwellenlänge 254 nm) bestrahlt. Durch die Bestrahlung werden bei photosensiblen Analyten Photoreaktionen initiiert, die zu einer deutlich verbesserten Detektierbarkeit der Analyten führen können. So ist beispielsweise die Bildung von Fluorophoren oder elektrochemisch detektierbaren Verbindungen durch Reaktionen wie Photooxidation oder Photoreduktion, photochemisch induzierte Umlagerungen oder auch Photolyse möglich [115,131].

Die Tocopherolchinone erwiesen sich als geeignete Zielsubstanzen für diese Applikation. In Folge der Bestrahlung erfolgt eine Umwandlung in fluoreszierende bzw. oxidierbare Verbindungen, die sowohl eine Detektion mittels Fluoreszenz-Detektor als auch mittels elektrochemischem Detektor ermöglichen. Abbildung 14 zeigt den Vergleich eines Chromatogramms der TQ-Referenzsubstanzen mit Fluoreszenz-Detektion und UV-Detektion bei ein- bzw. ausgeschaltetem Photoreaktor. Mit der Zunahme des Fluoreszenzsignals bei eingeschaltetem Photoreaktor ist ein gleichzeitiges, fast vollständiges Verschwinden des UV-Signals bei 260 nm verbunden, was auf eine weitgehend vollständige Umsetzung der Tocopherolchinone schließen lässt.

Das oder die gebildete(n) Produkt(e) der Photoreaktion zeigen dabei Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionswellenlängenmaxima, wie sie auch für die Tocopherolhydrochinone, Tocopherole bzw. Tocopheroldimere typisch sind. Welcher Art die stattfindende Reaktion ist, kann daher nicht genau beantwortet werden. Die Detektierbarkeit der Produkte im oxidativen Modus des elektrochemischen Detektors spricht jedoch für einen reduktiven Prozess. Eine Re-Chromatographie der α -TQ-Produktfraktion eines HPLC-Laufes mit eingeschaltetem Photoreaktor zeigte jedoch, dass es sich offensichtlich nicht ausschließlich um eine simple Photoreduktion zum Tocopherolhydrochinon handelt. Zwar erscheint u.a. ein kleiner Peak bei der Retentionszeit des α -THQ, gleichzeitig werden jedoch weitere Peaks detektiert, deren Retentionszeiten im Bereich zwischen dem α -THQ und α -TQ-Peak liegen. Ein α -TQ-Peak ist dagegen nicht mehr nachweisbar.

Während bei Anwendung des Photoreaktors in Kombination mit der Fluoreszenz-Detektion eine ähnliche Empfindlichkeit wie bei der UV-Detektion erreicht wird, ist die mit der elektrochemischen Detektion erzielte Empfindlichkeit etwas geringer als die der UV-Detektion. Beide Detektionssysteme bieten jedoch gegenüber der UV-Detektion ohne Nachsäulenderivatisierung den Vorteil einer deutlich gesteigerten Selektivität. So sind bei der Injektion von Serumextrakten wesentlich weniger störende Matrixeinflüsse zu verzeichnen, während bei der UV-Detektion, insbesondere im Retentionsbereich von β - und γ -TQ, Matrixkomponenten die Bestimmung erheblich stören.

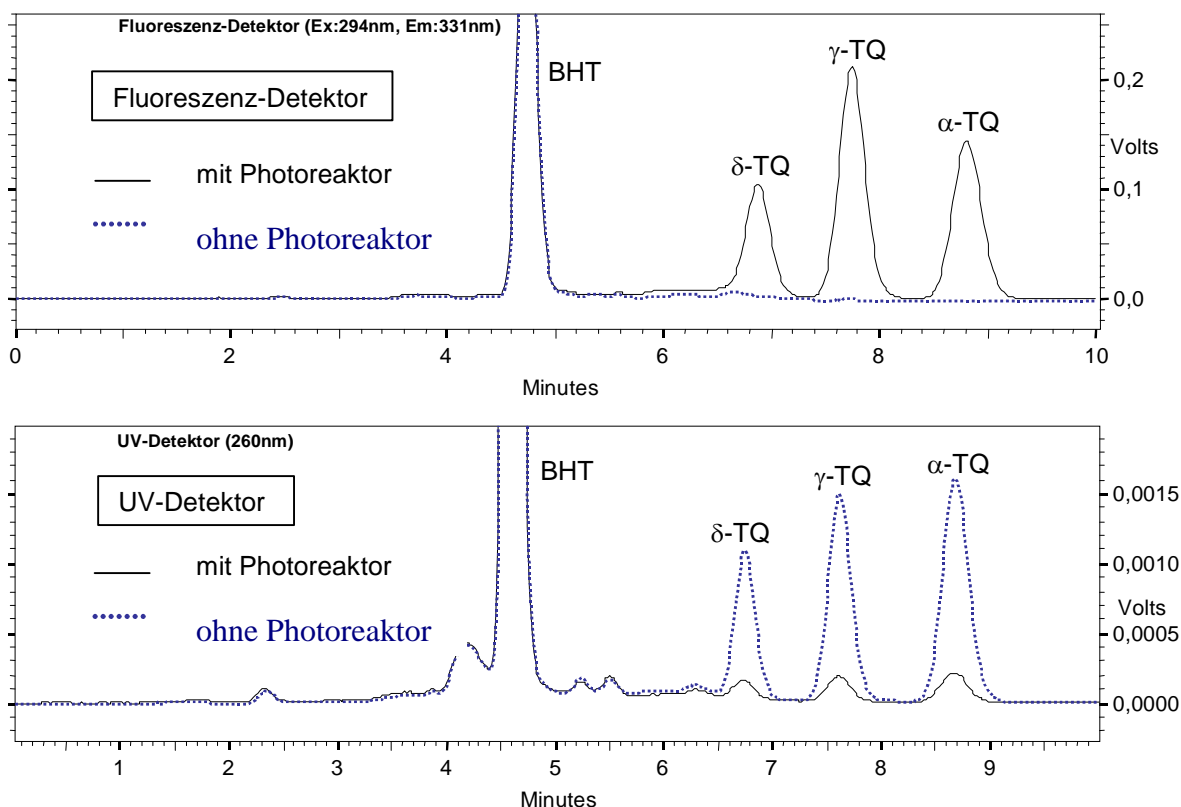


Abbildung 14: Vergleich der Chromatogramme einer TQ-Referenzmischung (α -, γ -, δ -TQ, 15 ng/ 50 μ l) mit Fluoreszenz- und UV-Detektion bei eingeschaltetem bzw. ausgeschaltetem Photoreaktor

2. Zink-Reduktionssäule:

Bei diesem Verfahren wird das Eluat der Trennsäule über eine kleine, mit Zink-Granulat gefüllte Säule (20 x 4,6 mm) geleitet. Zur Erhöhung der Lebensdauer der Zink-Säule und Verbesserung der Reaktionsbedingungen wird der Eluent (Methanol) mit 10 mM Zinkchlorid versetzt und mit Acetatpuffer (5 mM CH_3COOH + 5 mM CH_3COONa) gepuffert (vgl. Abschnitt 4.3.8). Eine ähnliche experimentelle Anordnung mit elektrochemischer Detektion wurde bereits von Leray [123] und Yamauchi [249] zur Detektion von α -Tocopherolchinon/-hydrochinon und den Epoxy- α -Tocopherolchinonen beschrieben.

Die Zink-Reduktionssäule führt vermutlich zu einer Reduktion der Tocopherolchinone zu den entsprechenden Tocopherolhydrochinonen, die nun erfolgreich mittels Fluoreszenz-Detektion bzw. elektrochemischer Detektion im oxidativen Modus nachgewiesen werden können.

Auch hier erwies sich die Fluoreszenzdetektion in Bezug auf die erreichte Empfindlichkeit der

elektrochemischen Detektion überlegen. Gegenüber der einfachen UV-Detektion konnte mit der Kombination Zink-Reduktionssäule/ Fluoreszenzdetektion ebenfalls ein leichter Sensitivitätsgewinn (Faktor 2,5) erreicht werden. Bei der Vermessung von Serumextrakten erweist sich weiterhin der deutliche Selektivitätsgewinn als wertvoll, da erheblich weniger Matrixinterferenzen zu beobachten sind als bei der UV-Detektion.

Aufgrund des gleichzeitigen Sensitivitäts- und Selektivitätsgewinns erschien die Nachsäulenderivatisierung mit der Zink-Reduktionssäule in Verbindung mit der Fluoreszenz-Detektion zunächst als die vielversprechendste Methode. Im weiteren Verlauf der Arbeiten zeigte sich jedoch, dass die Reduktionsleistung der Zinksäule rasch nachlässt, wobei besonders das α -TQ zunehmend unvollständig reduziert wird. Da hiermit eine stetige Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit verbunden ist und ein häufiger Wechsel der Zinksäulen hohe Kosten verursachen würde, wurde für die weiteren Arbeiten der Verwendung des Photoreaktors zur Nachsäulenderivatisierung der Vorzug gegeben. Zwar bietet diese Methode gegenüber der UV-Detektion keinen wesentlichen Sensitivitätsgewinn, dafür aber einen erheblichen Gewinn an Selektivität.

Ebenso wurde für die Serummessungen die Verwendung des Fluoreszenzdetektors vorgezogen, da hiermit im Vergleich zum elektrochemischen Detektor sowohl eine bessere Sensitivität als auch eine erheblich bessere Reproduzierbarkeit der Messungen erzielt wurde.

5.3 Entwicklung einer geeigneten Probenvorbereitungsmethode

Ein wesentliches Problem bei der Bestimmung von Tocopheroxidationsprodukten im Serum liegt darin, dass diese nur in sehr geringen Mengen innerhalb einer sehr komplexen Matrix vorliegen. Daher ist der Einsatz einer leistungsfähigen Probenvorbereitungsmethode erforderlich, die eine Anreicherung der Analyten bei gleichzeitiger möglichst vollständiger Matrixabtrennung ermöglicht. Diese Probenvorbereitungsmethode muss außerdem gewährleisten, dass die Oxidationsprodukte nicht als Artefakte der Probenvorbereitung aus den in der Probe ebenfalls vorhandenen Tocopherolen entstehen.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Isolierung von α -, selten auch γ -Tocopherolchinon, aus physiologischen Matrices beinhalten entweder eine Lipidextraktion nach vorheriger Fällung der Serumproteine mit einem Alkohol oder die Bestimmung aus dem Unverseifbaren. Besonders die einfache Lipidextraktion resultiert in sehr komplexen Extrakten mit hoher Matrixbelastung in Form von unpolaren Lipiden. Diese sind vor allem bei Verwendung der RP-HPLC als Messmethode problematisch, da die unpolaren Lipide auf der RP-18-Säule stark retardiert werden und somit zu einer raschen Verschlechterung der Trennung und verkürzter Lebensdauer der Säule führen. Eine solche Vorgehensweise ist zwar auch bei der Tocopherolanalytik weit verbreitet, jedoch ist es hier eher zu tolerieren, da aufgrund der wesentlich höheren Konzentrationen der Tocopherole in den Serumproben und der hohen Messempfindlichkeit bei elektrochemischer oder Fluoreszenz-Detektion erheblich geringere Mengen an Lipidextrakt injiziert werden müssen. Die Verseifungsmethode ist ebenfalls mit erheblichen Nachteilen belastet, da aufgrund der wenig schonenden Arbeitsbedingungen (Zusatz von Lauge, Erhitzen)

die Gefahr der Bildung von α -TQ als Artefakt der Probenvorbereitung sehr hoch ist. Der schließlich durch Extraktion des Unverseifbaren aus der Verseifungslösung erhaltene Extrakt ist zwar frei von Triglyceriden, jedoch noch immer sehr komplex.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kombination der einfachen Lipidextraktion mit einem anschließenden chromatographischen Reinigungsschritt zur weitgehenden Abtrennung der Lipid-Matrix eingesetzt. Dabei wurde neben der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode auch die Lipidextraktion mittels einer Extrelut-Säule getestet. Zur Isolierung der Oxidationsprodukte aus dem Lipidextrakt wurden mit der lipophilen Gelchromatographie an Sephadex LH-20 sowie der Kieselgel-Säulenchromatographie ebenfalls zwei verschiedene Verfahren auf ihre Eignung untersucht.

Da es wegen der hohen Matrixbelastung vermieden werden sollte, ungereinigte Lipidextrakte direkt zu vermessen, wurde zunächst der zweite Schritt der Probenvorbereitung, d.h. die chromatographische Aufarbeitung des Extraktes, getestet und optimiert. Somit war bei der folgenden Optimierung der Lipidextraktion sichergestellt, dass eventuell auftretende Probleme nicht von der nachfolgenden Reinigungsprozedur verursacht werden.

5.3.1 Test und Optimierung der chromatographischen Reinigung des Lipidextraktes

5.3.1.1 Lipophile Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20

Der zur Extraktreinigung mittels GPC an Sephadex LH-20 eingesetzte Versuchsaufbau ist unter Punkt 4.3.4 beschrieben. Er entspricht im Wesentlichen dem von Melchert und Rubach [136] bereits 1974 beschriebenen System zur Trennung von α -Tocopherol, seinen Oxidationsprodukten (α -TQ und Dimere) sowie den zur Tocopherol-Oxidation verwendeten Linolsäuremethylester-Hydroperoxiden.

Bei Sephadex LH-20 handelt es sich um ein quervernetztes Dextrangel, dessen Lipophilie durch Hydroxypropyl-Gruppen erhöht wurde, die über Ether-Brücken mit den Glucoseeinheiten der Dextransketten verbunden sind. Daher ist Sephadex LH-20 nicht nur in Wasser, sondern auch in polaren organischen Lösungsmitteln quellfähig und ermöglicht somit auch die Trennung lipophiler Substanzen, die in wässrigen Eluenten nicht löslich sind. Eine weitere Besonderheit des Sephadex-LH-20-Gels ist seine Fähigkeit, neben der reinen Trennung nach Molekulargewicht auch nach adsorptionschromatographischen Prinzipien zu trennen. Diese Fähigkeit ist allerdings abhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Während bei Verwendung kurzkettiger Alkohole als Elutionsmittel eine verstärkte Retention von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch π -Elektronen-Wechselwirkungen auftritt [42], ermöglicht die Verwendung hydroxylfreier Lösungsmittel wie Chloroform die adsorptionschromatographische Trennung von Substanzen mit Hydroxyl- oder Carboxylgruppen [95]. Letzteres ist vermutlich durch Wechselwirkungen der Gelmatrix mit den Analyten in Form von Wasserstoffbrückenbindungen zu erklären [208].

Abbildung 15 zeigt das Elutionsdiagramm der Trennung einer Referenzmischung lipophiler Substanzen mit dem unter Punkt 4.3.4 beschriebenen System.

Unter den eingesetzten Versuchsbedingungen wird eine vollständige Trennung von α -, β - γ - und δ -Tocopherol erreicht. Die relativ starke Retention der Tocopherole ist auf Wechselwirkungen der phenolischen OH-Gruppe mit dem Sephadex-LH-20 Gel zurückzuführen. Noch ausgeprägter ist dieser Effekt bei den Tocopherolhydrochinonen, wo bei Verwendung von Chloroform als Eluent die zweite phenolische OH-Gruppe im Molekül zu einer nahezu irreversiblen Retardierung dieser Substanzen auf der LH-20 Säule führt. Im Gegensatz dazu führt der Verlust der phenolischen OH-Gruppe bei den Tocopherolchinonen zu geringeren Elutionsvolumina im Vergleich mit den Tocopherolen sowie zur Koelution von α -, β -, γ - und δ -TQ.

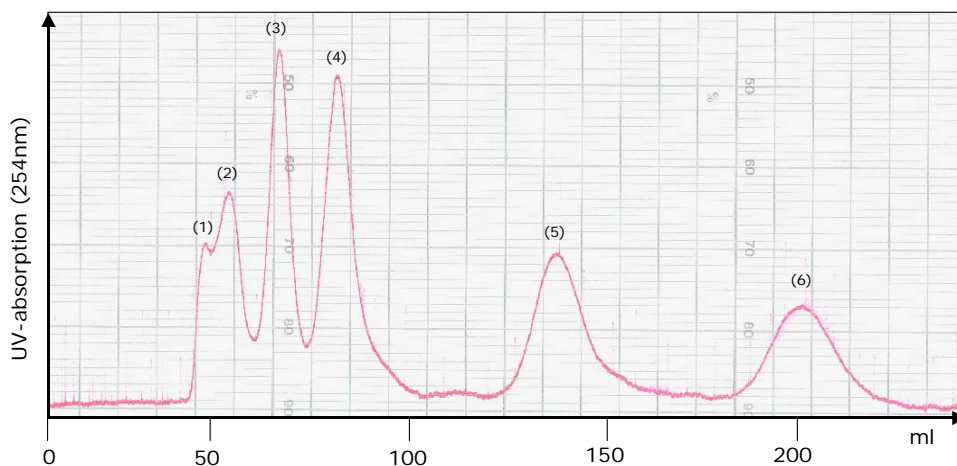


Abbildung 15: Sephadex LH-20 Elutionsdiagramm einer Referenzmischung aus 6,5 mg Triolein (1), 5,7 mg Cholesterylpalmitat (2), 80 μ g α -Tocopherolchinon (3), 400 μ g α -Tocopherol (4), 1 mg β -Tocopherol (5), 1 mg δ -Tocopherol (6) und 2,8 mg Cholesterin (kein Peak)

Mengenmäßig bedeutsame Lipidkomponenten des Humanserums, wie die Triglyceride und Cholesterylester, eluieren aufgrund ihrer höheren Molekularmasse relativ zeitig von der LH-20 Säule und werden so weitgehend von den Tocopherolchinonen und Tocopherolen getrennt. Cholesterin wird dagegen relativ stark retardiert und eluiert erst kurz nach dem α -Tocopherol. Tabelle 3 (S. 39) zeigt eine Übersicht über die Elutionsvolumina der getesteten Substanzen.

Versuche mit Serum-Lipidextrakten zeigten, dass die GPC an Sephadex LH-20 sich auch zur Isolierung der Tocopherolchinone aus den Serum-Lipidextrakten eignet. Etwas störend ist jedoch die partielle Überlappung des Tocopherolchinon-Peaks mit dem Cholesterylester- und dem α -Tocopherol-Peak sowie der hohe manuelle Arbeitsaufwand der Methode, da kein automatischer Fraktionensammler zur Verfügung stand. Außerdem wäre zur routinemäßigen Umsetzung der Methode die Übertragung auf eine kleinere Säule erforderlich, um den bisher erheblichen Lösungsmittel- und Zeitaufwand zu reduzieren. Zusätzlich ist fraglich, ob unter diesen Bedingungen noch eine zufriedenstellende Trennung erreicht werden kann. Daher wurde bei der weiteren Methodenentwicklung der Kieselgel-Säulenchromatographie zur Reinigung des Extraktes der Vorzug gegeben, mit der in ersten Vorversuchen ebenfalls vielversprechende Resultate erzielt wurden.

5.3.1.2 Kieselgel-Säulenchromatographie

Bei der Kieselgelfraktionierung des Lipidextraktes konnte auf der bereits existierenden Labormethode zur Tocopherolbestimmung aufgebaut werden. Bei dieser erfolgt eine Reinigung des mittels einer kleinen Extrelut-Säule gewonnenen Serum-Lipidextraktes über eine Mini-Kieselgelsäule. Die Tocopherole werden dabei mit 4 ml Hexan/Diethylether (20+4, v/v) von der Kieselgelsäule eluiert (vgl. Abschnitt 4.3.1).

Es zeigte sich, dass bei Aufgabe einer Lösung der Tocopherolchinon-Referenzsubstanzen in Hexan auf die Kieselgelsäule unter den Bedingungen der Tocopherol-Elution keine Elution der Tocopherolchinone erfolgt. Somit war es möglich, in einem zweiten Elutionsschritt die Tocopherolchinone getrennt von den Tocopherolen zu eluieren. Dies ist äußerst vorteilhaft, da in der Tocopherolfraction des Serum-Lipidextraktes auch störende stark lipophile Matrixkomponenten wie die Triglyceride und Cholesterylester eluieren, welche bei der geplanten Bestimmung mittels RP-HPLC erheblich stören würden. Um eine vollständige Elution der Tocopherolchinone in einem kleinen Lösungsmittelvolumen zu ermöglichen, wurde in weiteren Versuchen der Diethyletheranteil des Eluenten für die Tocopherolchinon-Fraktion schrittweise erhöht. Gute Ergebnisse wurden bei Verwendung von Hexan/Diethylether (3+2, v/v) erzielt. Mit 4 ml dieses Elutionsgemisches im zweiten Elutionsschritt werden alle Tocopherolchinone vollständig eluiert.

Durchgeführte Wiederfindungsexperimente für die Tocopherolchinone mit dotierten Serum-Lipidextrakten ergaben jedoch, dass durch den Einfluss der Serumlipide die Retention der Tocopherolchinone verringert wird und ein Teil des α -TQ bereits in der Tocopherol-Fraktion eluiert. Diesem Problem konnte mit einer Verringerung des Diethyletheranteils im ersten Elutionsschritt begegnet werden. Bei Verwendung von 4 ml Hexan/Diethylether (20+3, v/v) werden die Tocopherole noch immer weitgehend vollständig eluiert und Verluste an α -TQ werden vermieden.

Bei Aufgabe eines dotierten Serum-Lipidextraktes in 5 ml Hexan auf die Säule, nachfolgender Elution der Tocopherole und störender stark lipophiler Serumkomponenten mit 4 ml Hexan/Diethylether (20+3, v/v) und anschließender Elution der Tocopherolchinone mit 4 ml Hexan/Diethylether (3+2, v/v) wurden für alle Tocopherolchinone Wiederfindungsraten von annähernd 100% erreicht.

Substanz	α -TQ	γ -TQ	δ -TQ
Wiederfindung [%]	99,6	100,2	97,9
Anzahl der Bestimmungen	3	3	3

Tabelle 8: Mittlere Wiederfindungsraten bei der Kieselgelfraktionierung von dotiertem Serumextrakt

5.3.2 Test und Optimierung der Lipidextraktion

5.3.2.1 Extrelut-Methode

Zur Lipidextraktion wurde die Verwendung einer Extrelut-Säule sowie alternativ die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hexan getestet. In beiden Fällen erfolgt vor der Extraktion eine Denaturierung der Proteine mit Methanol. Zur Vermeidung der Bildung von Tocopherolchinonen als Artefakt der Probenvorbereitung wird dem Methanol zur Stabilisierung der Tocopherole tert-Butylhydroxytoluol (BHT) zugesetzt (0,25 mg/ml).

Bei Extrelut[®] NT (Merck) handelt es sich um eine poröse Kieselgur-Matrix, deren chemisch inerte Oberfläche ein hohes Wasserbindevermögen aufweist. Bei der Extraktion wässriger Proben wird das Wasser als dünner Film an die Extrelut-Matrix gebunden. Mit geeigneten, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln kann anschließend die Extraktion lipophiler Substanzen erfolgen, wobei die wässrige Phase auf der Extrelut-Matrix verbleibt. Gegenüber der einfachen Flüssig-Flüssig-Extraktion hat diese Verfahrensweise den Vorteil der einfacheren Ausführbarkeit und der Vermeidung einer eventuellen Emulsionsbildung.

Die Lipidextraktion an einer selbstgepackten kleinen Extrelut-Säule wird bereits bei der zur Tocopherolbestimmung eingesetzten Labormethode verwendet (vgl. Abschnitt 4.3.1). Zur Bestimmung der Tocopherolchinone war es wegen der geplanten Verwendung von bis zu 500 µl Serum (statt 100 µl bei der Tocopherolbestimmung) erforderlich, eine deutlich größere Säule einzusetzen und auch die Menge an Elutionsmittel (Hexan) entsprechend zu erhöhen. Es wurde eine kommerziell erhältliche Extrelut-3-Fertigsäule gewählt und zur Elution entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mindestens 15 ml Elutionsmittel eingesetzt.

Erste Versuche unter Verwendung von TQ-Referenzsubstanzen und 0,5 ml Wasser als Modellmatrix zeigten, dass bei Verwendung von 1 ml Methanol zur „Denaturierung“ (entsprechend dem bei der Tocopherolbestimmung verwendeten 1:2 Verhältnis von Serum : Methanol) und Elution mit mindestens 25 ml Hexan eine weitgehend vollständige Wiederfindung von α - und β - γ -TQ (80-100%) erreicht wird, während δ -TQ nur zu weniger als 40% wiedergefunden wird. Eine Erhöhung des Methanolanteils auf 2 ml führte zu einer besseren Elution der Tocopherolchinone von der Extrelut-Säule, so dass die Hexanmenge ohne Verschlechterung der Wiederfindung auf 15 ml reduziert werden konnte. δ -TQ wurde jedoch auch hier nur zu etwa 50-60% wiedergefunden, woran auch eine Erhöhung der Hexanmenge nichts änderte, zumal es ab einem Hexanvolumen von mehr als 17 ml zu einem Durchbruch der Wasserphase kam.

Auch die Verwendung von 15-25 ml Hexan+Isopropanol (3+2, v/v) bzw. Chloroform+Methanol (2+1, v/v) als Eluent (nach [177]), jeweils ohne vorherige Denaturierung mit Methanol, oder von 2 ml Methanol + 15-25 ml Hexan + Diethylether (3+1 oder 2+1, v/v) führten nicht zu einer Verbesserung der Wiederfindung von δ -TQ. Generell erwies sich die Verwendung der Kombination 2 ml Methanol + 15 ml Hexan als günstigste Variante, da es einerseits bei Verwendung des

Hexan+Isopropanol-Eluenten zur Bildung eines weißen Rückstandes¹ beim Einengen des Extraktes kam, andererseits bei Verwendung der Hexan+Diethylether-Eluenten ein vorzeitiges Durchbrechen der Wasserphase erfolgte und beim Chloroform+Methanol-Eluenten schlechtere Wiederfindungsraten erzielt wurden.

Bei Einsatz der Extrelut-Methode mit 2 ml Methanol + 15 ml Hexan für die Lipidextraktion aus 0,5 ml Poolserum (dotiert mit je 40 ng α -, γ - und δ -TQ) wurde für α -TQ eine Wiederfindung von etwa 70-80%, für γ -TQ von etwa 60-70% und für δ -TQ von weniger als 20% ermittelt.

5.3.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode

Um abzuklären, ob es sich bei der generell schlechten Wiederfindung von δ -TQ um einen durch das Extrelut-Material verursachten Effekt handelt, wurde eine einfache Flüssig-Flüssig-Extraktion als Alternative getestet. Hierzu wurden 0,5 ml Serum bzw. 0,5 ml Wasser (für die Wiederfindungsversuche jeweils dotiert mit TQ-Referenzsubstanzen) in einem Schliff-Reagenzglas mit 1 ml Methanol (mit 0,25 mg/ml BHT) denaturiert und mit Hexan extrahiert (vgl. Abschnitt 4.3.9.2). Bei Verwendung von TQ-Referenzsubstanzen und Wasser als Modellmatrix wurden bei Extraktion mit 1 x 3 ml und 1 x 2 ml Hexan mit dieser Methode, auch bei Kombination mit der anschließenden Kieselgelfraktionierung gemäß Abschnitt 5.3.1.2, für alle Tocopherolchinone Wiederfindungsraten von annähernd 100% erzielt (Tabelle 9). Als wichtig erwies sich jedoch ein möglichst weitgehender Schutz der Probenlösungen vor Licht, wobei gute Resultate durch ein Umwickeln sämtlicher Probengefäße (d.h. der Schliff-Reagenzgläser zur Lipidextraktion und zum Auffangen des Eluates der Kieselgelsäule sowie der Vials für die HPLC) mit Alufolie erzielt wurden.

Substanz	α -TQ	γ -TQ	δ -TQ
Wiederfindung [%]	102,2	97,3	97,0
Anzahl der Bestimmungen	6	6	6

Tabelle 9: Wiederfindungsraten der Tocopherolchinone bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Wasser und anschließender Kieselgelfraktionierung

Bei Anwendung der Kombination der Flüssig-Flüssig-Extraktion und Kieselgelfraktionierung für Wiederfindungsversuche mit dotierten Poolserumextrakten traten jedoch ähnlich wie bei der Extrelut-Extraktion Probleme mit der Wiederfindung von β -, γ - sowie besonders δ -TQ auf. Während γ -TQ immerhin zu etwa 60-70% wiedergefunden wurde, lag die Wiederfindung beim β -TQ nur noch bei etwa 23% und beim δ -TQ bei weniger als 20%. Die Wiederfindung für α -TQ erwies sich dagegen mit $99 \pm 5\%$ als ausgezeichnet (vgl. Abschnitt 5.4.6).

Im Hinblick auf die Verbesserung der Wiederfindungsraten wurde auch bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion der Effekt verschiedener Modifikationen des Extraktionsverfahrens getestet:

¹ Quelle vermutlich das Extrelut-Material

- Verwendung verschiedener Methanolvolumen (0,5 ml / 1,0 ml / 1,5 ml / 2,0 ml) zur Proteinfällung
- Verwendung von Isopropanol (1 ml - 2 ml) statt des Methanols zur Proteinfällung
- Zusatz von gesättigter Natriumchloridlösung (0,5 ml) zur Extraktionsmischung („Aussalzen“)

Keine der getesteten Alternativen ergab jedoch Hinweise auf ein Potenzial zur Verbesserung der Extraktionseffizienz für β -, γ - und δ -TQ.

Bei einer Nachextraktion der zuvor mit 1 x 3 ml und 1 x 2 ml Hexan extrahierten Serum-Methanol-Phase von dotierten Poolserumproben mit weiteren 2 ml Hexan wurden ebenfalls keine nennenswerten Konzentrationen an Tocopherolchinonen nachgewiesen, so dass von einer weitgehend vollständigen Extraktion der extrahierbaren Anteile ausgegangen werden kann.

Auch unter Berücksichtigung der guten Wiederfindung der Tocopherolchinone aus Wasser statt Serum deutet somit alles darauf hin, dass es sich bei den schlechten Wiederfindungsraten weniger um ein Extraktionsproblem handelt, sondern dass die Serummatrix für die Probleme verantwortlich ist. Vermutlich kommt es zu einer Reaktion der am Chromanringsystem nicht vollständig methylierten β -, γ - und δ -Tocopherolchinone mit Bestandteilen der Serummatrix wie z.B. den Proteinen oder Glutathion, wodurch diese Tocopherolchinone zumindest partiell der Bestimmung entzogen werden. Das vollständig methylierte α -TQ ist dagegen nicht in der Lage, solche Produkte zu bilden.

Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kam auch die Arbeitsgruppe von Cornwell [218,34-36] bei ihren Untersuchungen zur Zytotoxizität von Tocopherolchinonen (vgl. Abschnitt 2.3.3), wobei durch die erfolgreiche Synthese von γ -TQ- bzw. δ -TQ-Glutathion-Addukten sowie den Nachweis von γ -TQ-Protein-Addukten gezeigt wurde, dass die nur partiell methylierten Tocopherolchinone als Elektrophile mit α,β -ungesättigter Carbonylstruktur in der Lage sind, Michael-Addukte mit Substanzen zu bilden, die eine nucleophile Thiol-Gruppe besitzen.

Aufgrund des begrenzten Zeitrahmens für die vorliegende Arbeit musste jedoch darauf verzichtet werden, diesem Problem näher auf den Grund zu gehen. Es wurde daher beschlossen, sich bei der Tocopherolchinonbestimmung in den Serumproben auf das α -TQ zu konzentrieren, bei dem es sich als Oxidationsprodukt des physiologisch wichtigsten Tocopherols um die interessanteste Verbindung der Gruppe handelt. Auch in Anbetracht der geringen Konzentrationen der entsprechenden β -, γ - und δ -Tocopherole im Serum im Vergleich zum dominanten α -Tocopherol ist davon auszugehen, dass die entsprechenden β -, γ - und δ -Tocopherolchinone in deutlich geringerer Menge vorliegen und somit wahrscheinlich die Bestimmungsgrenze des Messverfahrens für ihre Quantifizierung ohnehin nicht ausreichend wäre.

Wegen der deutlichen Reduktion des Materialaufwandes (Lösungsmittel, Extrelut-Säulen) bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion im Vergleich zur Extrelut-Methode sowie der besseren Vermeidbarkeit der Lichtexposition der photosensiblen Tocopherolchinone während der Probenvorbereitung wurde für die Aufarbeitung der im weiteren Verlauf untersuchten Serumproben die

Flüssig-Flüssig-Extraktion gewählt.

Abbildung 16 zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines unter Verwendung der Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode in Kombination mit der Kieselgel-Säulenchromatographie erhaltenen Extraktes eines Survey-Serums. Die Messung erfolgte dabei mittels der RP-HPLC-Methode mit Fluoreszenz-Detektion und Nachsäulenderivatisierung über den Photoreaktor. Zu erkennen sind hier neben dem α -TQ-Peak insbesondere der große BHT-Peak sowie Spuren von α - und γ -Tocopherol.

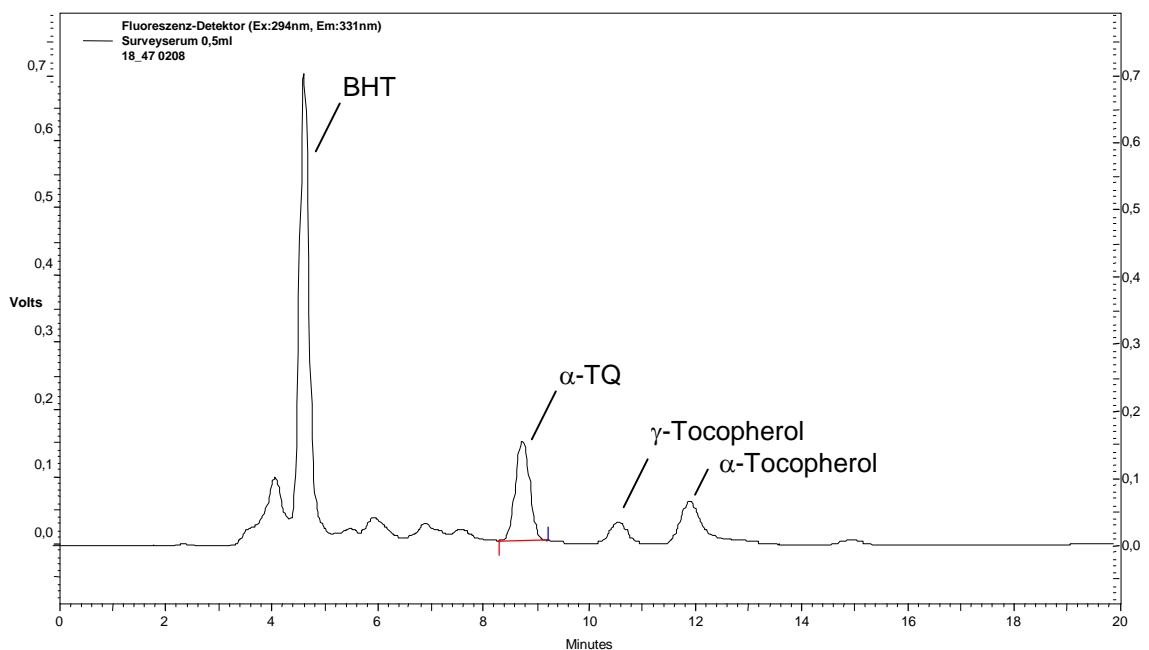


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm eines Survey-Serumextraktes, Probenvorbereitung und Messung nach Abschnitt 4.3.10

5.4 Qualitätsparameter der entwickelten Methode zur Tocopherolchinonbestimmung im Serum

Die entwickelte Probenvorbereitungsmethode, bestehend aus Lipidextraktion mit Flüssig-Flüssig-Extraktion und anschließender Fraktionierung des Extraktes an einer Mini-Kieselgelsäule, in Kombination mit der HPLC/Fluoreszenz-Messmethode mit Nachsäulenderivatisierung über einen Photoreaktor, sollte im Folgenden zur α -Tocopherolchinon-Bestimmung in einer Reihe von Serumproben eingesetzt werden. Eine Beschreibung der Methode ist in Abschnitt 4.3.10 gegeben. Um die Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit der Methode zu dokumentieren, war die Bestimmung einer Reihe von Qualitätsparametern erforderlich. In den folgenden Abschnitten wird die Ermittlung dieser Qualitätsparameter im Wesentlichen für das α -Tocopherolchinon diskutiert. Der Vollständigkeit halber werden jedoch, soweit sie ermittelt wurden, auch die entsprechenden Daten für die anderen Tocopherolchinone aufgeführt.

5.4.1 Linearität der Kalibrationsgeraden

Die Quantifizierung der α -TQ-Gehalte in den Serumproben erfolgte über die Methode der externen Kalibrierung. Für alle Tocopherolchinone wurden lineare Kalibrationsgeraden in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,5-50 ng/ 50 μ l (Injektionsvolumen) erhalten. Abbildung 17 zeigt beispielhaft eine Kalibrationsgerade für α -TQ. Für β -, γ - und δ -TQ ergeben sich Kalibrationsgeraden mit vergleichbarer Linearität und Güte (Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,999$).

Für die Probenmessungen war in der Regel eine Kalibration im Bereich von 0,5-30 ng/ 50 μ l ausreichend.

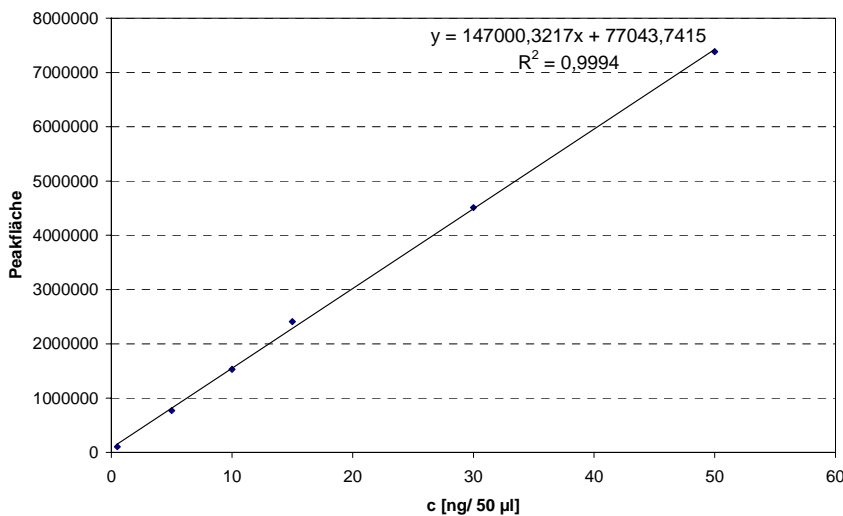


Abbildung 17: Kalibrationsgerade für α -TQ

Die anhand der Kalibrationsgeraden berechnete relative Verfahrens-Standardabweichung V_{x0} beträgt für die α -TQ-Bestimmung im Mittel etwa 2,0% (Berechnungsformeln s.u.).

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b} \quad V_{x0} = \frac{s_{x0}}{x} \cdot 100 \%$$

s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung

s_y : Reststandardabweichung (Streuung der Messwerte um die Kalibrationsgerade)

b : Anstieg der Kalibrationsgeraden

V_{x0} : relative Verfahrensstandardabweichung

x : Mittelwert der Kalibrationskonzentrationen

Aufgrund sinkender Signalintensitäten des Fluoreszenzdetektors im Tagesverlauf ist bei Messung größerer Probenserien eine regelmäßige Rekalibration erforderlich, da der Verlust an Signalintensität innerhalb eines Tages bis zu 15% betragen kann. Zur Berücksichtigung dieses Effektes hat sich die Messung eines Kalibrationsstandards (10 ng/ 50 μ l) nach jeweils drei Serumextrakten (ein Serumextrakt-Lauf = 20 min) bewährt. Mit Hilfe dieser Messungen kann für

die von den Standardmessungen eingeschlossenen Probenmessungen jeweils ein Korrekturfaktor für die Signalintensität im Vergleich zum Zeitpunkt der Kalibration ermittelt werden.

5.4.2 Spezifität

Ein wichtiger Parameter zur Qualitätsbeurteilung einer Analysenmethode ist ihre Spezifität, also ihre Fähigkeit, eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [114]. Bei der hier betrachteten HPLC-Methode zur Bestimmung von α -Tocopherolchinon in Serumproben bestimmen im Wesentlichen drei Parameter die Spezifität der Methode. So leistet einerseits die Probenvorbereitungsprozedur durch Abtrennung eines Großteils der Matrixkomponenten einen Beitrag, andererseits trägt die chromatographische Trennung zur Erhöhung der Spezifität bei. Schließlich hat auch die Detektionsmethode einen entscheidenden Einfluss, da ein spezifischer bzw. selektiver Detektor ebenfalls zur Steigerung der Spezifität beiträgt. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang „zweidimensionale“ Detektoren, wie der massenspektrometrische Detektor oder der Diodenarraydetektor, die neben der Information über Retentionszeit und Peakfläche/-höhe für die Substanz weitere substanzspezifische Informationen, wie das Massenspektrum bzw. das UV-Spektrum, liefern. Verhältnismäßig selektive Detektoren, wie der elektrochemische Detektor oder der Fluoreszenzdetektor, sind ebenfalls hilfreich, sofern die interessierenden Analyten deren Detektionskriterien erfüllen. Universelle Detektoren, wie der UV-Detektor oder der Brechungsindexdetektor, sind zwar für eine Vielzahl von Analyten einsetzbar, liefern jedoch recht wenig Informationen über die Identität des Analyten.

Bei der betrachteten HPLC-Fluoreszenzmethode mit Nachsäulenderivatisierung mittels Photoreaktor werden die fluoreszenz-inaktiven Tocopherolchinone in Verbindungen überführt, die sich mittels Fluoreszenzdetektion nachweisen lassen. Dies ist mit einer Steigerung der Spezifität der Methode im Vergleich zur UV-Detektion verbunden. Trotzdem ist die Detektion eines Peaks durch den Fluoreszenzdetektor bei der entsprechenden Retentionszeit der α -Tocopherolchinon-Referenzsubstanz und den entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen noch kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von α -Tocopherolchinon in der Probe. Es besteht die Möglichkeit, dass Substanzen mit ähnlichem chromatographischen und –Fluoreszenz-Verhalten mit dem Analyten koeluiieren und sein Vorhandensein vortäuschen.

Um diese Möglichkeit weitgehend auszuschließen, wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

- 1) HPLC-Vergleichsmessungen für den α -TQ-Gehalt von Poolserumextrakten mit verschiedenen Detektionssystemen:

Hier wurden bei Vergleichsmessungen für den selben Serumextrakt eines Poolserums mittels HPLC/UV und HPLC/Fluoreszenz (Photoreaktor) praktisch identische Werte für den α -TQ-Gehalt ermittelt (6,99 vs. 6,97 ng/ 50 μ l, Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen). Ein Vergleich des α -TQ-Gehaltes eines anderen Poolserumextraktes mittels HPLC/Fluoreszenz

(Photoreaktor) und HPLC/ED (Photoreaktor) ergab ebenfalls sehr gut übereinstimmende Werte für den α -TQ-Gehalt der Probe (4,56 vs. 4,48 ng/20 μ l). Diese Ergebnisse stellen ein aussagekräftiges Indiz für die Identität des α -TQ-Peaks in den Poolserumproben dar, da die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine andere Substanz sich bei Anwendung so verschiedener Detektionsprinzipien jeweils genauso wie das α -TQ verhält, sehr gering ist.

- 2) Serumextrakt-Reste verschiedener Surveyseren wurden vereinigt und mittels HPLC/UV (bei ausgeschaltetem Photoreaktor und Fluoreszenzdetektor) fraktioniert. Dabei wurde die dem α -TQ-Peak entsprechende Eluatfraktion von mehreren Injektionen gesammelt. Nach vorsichtigem Abdampfen des Lösungsmittels im Vortex-Evaporator wurde der Rückstand mit TSIM derivatisiert und mittels GC/MS bzw. GC/MS-MS vermessen (Methodenparameter siehe Abschnitt 4.3.6).

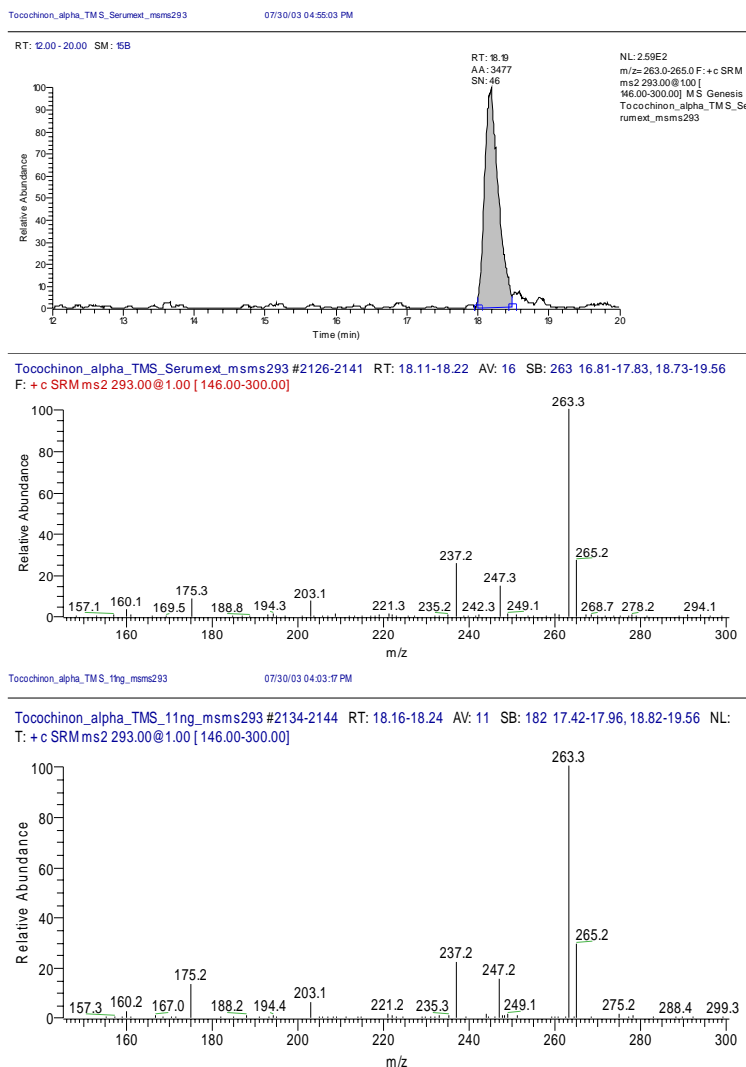


Abbildung 18: Summierte Ionenspur m/z 263-265 der GC/MS-MS Messung der gesammelten α -TQ-HPLC-Fraktion von Serumextrakten nach Silylierung mit TSIM (oben); Tochterionenscan des Ions m/z 293 aus dem Peak des silylierten Serumextraktes (Mitte) sowie dem Peak des α -TQ-TMS-Standards (unten)

Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnte in den Serumextrakten mit hoher Sicherheit das Vorhandensein von α -TQ nachgewiesen werden, wobei sich die GC/MS-MS-Messung der GC/MS-Messung im Hinblick auf die Nachweisempfindlichkeit und Selektivität als deutlich überlegen erwies. Abbildung 18 zeigt die gute Übereinstimmung des MS-MS-Spektrums (Tochterionen-Scan des α -TQ-TMS Basispeaks m/z 293) des Peaks aus der silylierten α -TQ-HPLC-Fraktion der Serumextrakte mit dem MS-MS-Spektrum der α -TQ-TMS Referenzsubstanz.

Leider wurden zum Zeitpunkt der o.g. Untersuchungen nur halbquantitative Messungen vorgenommen. So konnte lediglich eine Abschätzung der α -TQ-Konzentration in der gesammelten Serumextrakt-HPLC-Fraktion über den Vergleich mit einem parallel vermessenen α -TQ-Standard erfolgen, dessen Konzentration so gewählt war, dass er der mittels HPLC/UV ermittelten α -TQ-Konzentration in der gesammelten Serumextrakt-HPLC-Fraktion entsprach (11 ng/ μ l). Dabei wurde festgestellt, dass die Größenordnung der gemessenen Peakflächen des α -TQ aus dem Serum und der Referenzsubstanz übereinstimmte, wobei jedoch die Werte für den Serumextrakt etwas geringer ausfielen. Eine genauere Überprüfung dieses Sachverhaltes durch ähnliche Untersuchungen dieser Art war geplant, musste jedoch unterbleiben, da zunächst das GC/MS-Gerät für längere Zeit nicht betriebsbereit war und später keine Zeit mehr für weitere Untersuchungen erübrigt werden konnte.

- 3) Blindwertuntersuchungen für die Messmethode (inklusive der Probenvorbereitung) mit destilliertem Wasser als Modellmatrix für das Serum (da kein α -TQ-freies Serum vorhanden war) lieferten Hinweise auf das Vorkommen einer Störsubstanz, die bei allen Detektionsmethoden ein kleines HPLC-Signal bei der Retentionszeit des α -TQ-Peaks zeigte. Dabei scheint es sich um eine ubiquitär vorkommende Substanz zu handeln, da sämtliche Verfahrensschritte der Probenvorbereitung zu diesem Signal beizutragen scheinen. Eventuell handelt es sich hierbei um den Weichmacher Ethylhexylphthalat; ein kleiner Peak dieser Substanz wurde jedenfalls bei den unter Punkt 2) beschriebenen GC/MS-Messungen in der Serumextrakt-HPLC-Fraktion detektiert. Ein vorheriges Spülen sämtlicher Glasgefäße für die Probenvorbereitung mit Hexan oder Petrolether trägt dazu bei, das Blindwertproblem zu minimieren. Es ist jedoch nicht gelungen, den Blindwert völlig zu unterdrücken. Bei Parallelbestimmungen innerhalb eines Aufarbeitungsganges ist der Blindwert gut reproduzierbar, zeigt jedoch leichte Schwankungen von Tag zu Tag. Die Größenordnung des Signals entspricht in der Regel einer α -TQ-Konzentration von etwa 0,4-0,8 ng/50 μ l. Um den Einfluss dieses Blindwertes annähernd berücksichtigen zu können, wurde bei der Aufarbeitung von Serumproben pro Charge jeweils ein Blindwert mitbestimmt, wobei hierfür statt 0,5 ml Serum 0,5 ml (zuvor mit Hexan extrahiertes) destilliertes Wasser eingesetzt wurden. Der ermittelte Blindwert wurde dann von den gemessenen Serumkonzentrationen der jeweiligen Probencharge abgezogen.

5.4.3 Prüfung auf Artefaktbildung

Ein wichtiger Aspekt bei der Analytik von Tocopheroxidationsprodukten in Serumproben ist die Vermeidung einer Oxidation der in der Probe vorliegenden Tocopherole im Laufe der Probenvorbereitung. Dies gilt besonders im Hinblick darauf, dass die zu erwartenden physiologischen Konzentrationen der Tocopherolchinone/ -hydrochinone wesentlich geringer sind als die der entsprechenden Tocopherole. Somit kann bereits die Oxidation sehr geringer Anteile der vorhandenen Tocopherole, welche bei der Tocopherolmessung vielleicht unbemerkt bleiben, eine erhebliche Fehlerquelle bei der Tocopherolchinonanalytik darstellen.

Die Prüfung auf Artefaktbildung während der Probenvorbereitung wird dadurch erschwert, dass keine nachweislich Tocopherolchinon-freien Serumproben als Testmatrix verfügbar sind. Somit ist eine Beantwortung der Frage nach der Artefaktbildung nur über Umwege bzw. durch Verwendung einer entsprechenden Tocopherolchinon-freien Modellmatrix möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür drei Herangehensweisen getestet:

- 1) Test der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Aufarbeitung von Serumproben. Diese Untersuchung kann eine Artefaktbildung nicht direkt nachweisen oder ausschließen, gibt aber erste Hinweise auf deren Vorliegen, sofern eine schlechte Reproduzierbarkeit erzielt wird, die nicht durch sonstige methodische Probleme erklärt werden kann.
- 2) Test der Stabilität von α -Tocopherol während der Probenvorbereitung bei Verwendung der Modellmatrix Wasser. Hiermit wird zwar eine Abschätzung der Stabilität des α -Tocopherols im Laufe der Probenvorbereitung möglich, jedoch erlaubt dies keine eindeutige Aussage über die Verhältnisse bei der Serumaufarbeitung, da der Einfluss der Serummatrix unberücksichtigt bleibt.
- 3) Test der Stabilität von γ -Tocopherol als Modellsubstanz für α -Tocopherol in der Serummatrix. Hier erweist es sich als vorteilhaft, dass die native γ -Tocopherol-Konzentration in den Serumproben wesentlich kleiner als die α -Tocopherol-Konzentration ist und dass im Serum in der Regel kein γ -TQ nachweisbar ist. So bietet sich ein Test an, ob bei Zusatz größerer γ -Tocopherol-Mengen zum Serum vor der Probenaufarbeitung im Probenextrakt γ -TQ als Artefakt der Probenvorbereitung nachgewiesen werden kann. Unter der Voraussetzung, dass α - und γ -Tocopherol sowie die entsprechenden Tocopherolchinone sich jeweils ähnlich verhalten, könnte man aus dem beobachteten Verhalten des γ -Tocopherols Rückschlüsse auf das Verhalten des α -Tocopherols ziehen. Diese Voraussetzung ist jedoch nicht sonderlich gut erfüllt. Einerseits haben vorhergehende Untersuchungen bereits gezeigt, dass für das γ -Tocopherolchinon im Serum schlechtere Wiederfindungsraten erzielt werden, und andererseits ist bekannt, dass γ -Tocopherol eine etwas höhere Oxidationsstabilität aufweist als α -Tocopherol.

Ergebnisse

- 1) Versuche zur Serumaufarbeitung im Frühstadium der Methodenentwicklung, noch ohne Zusatz von Antioxidanzien, ergaben deutliche Hinweise auf die Bildung von α -TQ als Artefakt der Probenvorbereitung. Es wurde eine ausgesprochen schlechte Reproduzierbarkeit der Bestimmung, mit relativen Standardabweichungen zwischen 40-60% bei Dreifachbestimmungen, beobachtet. Ein Zusatz von 0,25 mg/ml BHT (in Anlehnung an die von Vatassery und Smith [230] verwendeten Konzentrationen) zu dem zur Denaturierung eingesetzten Methanol bewirkte eine deutliche Reduktion der Standardabweichungen der Messergebnisse sowie auch der gemessenen Konzentrationen an α -TQ in den Serumproben.
- 2) Bei Durchführung der Probenvorbereitungsprozedur gemäß Abschnitt 4.3.9.2 mit α -Tocopherol-dotiertem dest. Wasser ist keine α -TQ-Bildung zu beobachten. Als Dotiermenge wurden hierfür ca. 6 μ g α -Tocopherol in 0,5 ml Wasser eingesetzt, entsprechend der Serumkonzentration von etwa 12 mg/l eines typischen Poolserums.
- 3) Bei Durchführung der Probenvorbereitung mit einem γ -Tocopherol-dotierten Poolserum ist keine Bildung von γ -TQ nachzuweisen. Als Dotiermenge wurden hier etwa 12 μ g γ -Tocopherol in 0,5 ml Wasser eingesetzt, entsprechend einer Serumkonzentration von 24 mg/l. Diese Konzentration wurde bewusst etwa doppelt so hoch gewählt wie die α -Tocopherol-Konzentration im vorherigen Experiment, um den Einfluss der schlechteren Wiederfindungsrate beim γ -TQ auszugleichen (ca. 62%, vgl. Abschnitt 5.4.6) und auch den Nachweis eventuell entstehender geringer Mengen zu ermöglichen. Da keine γ -TQ-Bildung erfolgte, ist anzunehmen, dass das γ -Tocopherol unter den Bedingungen der verwendeten Probenvorbereitungsmethode stabil ist. Allerdings lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass eventuell in geringen Mengen entstehendes γ -TQ der Bestimmung durch eine Bindung an Serumproteine oder Glutathion entzogen wird (vgl. Abschnitt 5.3.2). Möglicherweise ist der Anteil gebundenen γ -TQs im Bereich der geringen Konzentrationen einer Artefaktbildung wesentlich höher als bei den für die Wiederfindungsversuche verwendeten Dotierkonzentrationen.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass eine Bildung von α -TQ im Laufe der verwendeten Probenvorbereitungsprozedur unwahrscheinlich ist. Da jedoch kein direkter Test auf α -Tocopherol-Oxidation während der Aufarbeitung eines Serum-Extraktes erfolgen konnte, lässt sich anhand der vorhandenen Daten die Bildung von Artefakten während der Probenvorbereitung nicht völlig ausschließen. Um einen solchen Nachweis zu führen, wären andere Detektionsverfahren besser geeignet. So könnte beispielsweise bei Messung mittels einer sensitiven GC/MS- oder HPLC/MS-Methode ein überzeugender Nachweis bei Zusatz deuterierter Tocopherole als Modellsubstanzen zum Serum und der Suche nach den entsprechenden deuterierten Oxidationsprodukten im Extrakt gelingen. Hierfür fehlten jedoch in der vorliegenden Arbeit die instrumentellen Voraussetzungen.

5.4.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

In der Spurenanalytik ist stets kritisch zu prüfen, ob die gemessenen Werte sich statistisch signifikant von Null unterscheiden. Als Hilfsgrößen werden hierfür die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens ermittelt. Diese Parameter werden folgendermaßen definiert [58]:

- Die Nachweisgrenze (XN) eines Analysenverfahrens ist jene kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit (z.B. P = 95%) bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko von 5% *qualitativ* nachgewiesen werden kann.
- Die Bestimmungsgrenze (XB) eines Analysenverfahrens ist jene kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit (z.B. P = 95%) bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko von $\leq 5\%$ *quantitativ* bestimmt werden kann.

Eine verbreitete Methode zur Abschätzung dieser Parameter in der HPLC- oder GC-Analytik ist die Ermittlung des Verhältnisses der Höhe des Substanzpeaks zum Grundrauschen des Basislinie des Detektors (Signal-Rausch-Verhältnis, *engl.* signal-to-noise ratio, S/N). Nach allgemein üblicher Praxis wird hierbei ein $S/N \geq 3$ des Substanzpeaks als Schwellenwert für die Nachweisgrenze akzeptiert, während ab einem $S/N \geq 10$ der Schwellenwert für die quantitative Bestimmung (= Bestimmungsgrenze) erreicht wird.

Da es sich bei dieser Methode jedoch nur um eine grobe Abschätzung handelt und die in der vorliegenden Arbeit verwendete HPLC-Software keine Möglichkeit zur zuverlässigen Kalkulation des Signal-Rausch-Verhältnisses bot, wurde statt dessen zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens die statistische Berechnung unter Verwendung von Kalibrationskenndaten eingesetzt.

Es wurde die von Funk [58] publizierte Vorgehensweise für das „Eichkurvenverfahren“ gewählt. Hierzu wurde von einer im Labor gebräuchlichen Kalibrationsgeraden für das betrachtete Analysenverfahren die Standardabweichung s_0 beim Konzentrationswert $x = 0$ als Hilfsgröße herangezogen. Die Kalibrationskonzentrationen wurden dann in der folgenden Reihenfolge gewählt:

$$\begin{aligned}x_1 &= 1 \cdot s_0 \\x_2 &= 2 \cdot s_0 \\&\vdots \\x_{10} &= 10 \cdot s_0\end{aligned}$$

Vereinfachend erfolgte die Ermittlung von s_0 nur für das α -TQ. Die Konzentrationen für γ - und δ -TQ wurden analog der α -TQ-Konzentration gewählt, da die Verdünnungen aus einem Standardgemisch mit gleichem Gehalt an α -, γ - und δ -TQ vorgenommen wurden. Aus den erhaltenen Kalibrationsgeraden erfolgte anschließend die Berechnung von XN und XB unter Verwendung der in Anhang B erläuterten und zusammengefassten Berechnungsgleichungen. Auf eine gesonderte Bestimmung von XN und XB für β -TQ wurde verzichtet, da dieses mit dem γ -TQ koeluiert und vergleichbare Responsewerte liefert. Die errechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von α -, (β)/ γ - und δ -TQ sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Substanz	α -TQ	(β)/ γ -TQ	δ -TQ
Nachweisgrenze (XN)	0,32 ng/ 50 μ l	0,19 ng/ 50 μ l	0,22 ng/ 50 μ l
Bestimmungsgrenze (XB)	0,47 ng/ 50 μ l	0,28 ng/ 50 μ l	0,33 ng/ 50 μ l

Tabelle 10: Mit dem „Eichkurvenverfahren“ ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Tocopherolchinonbestimmung¹

Einschränkend muss angemerkt werden, dass diese Werte sich im Wesentlichen zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit des Messverfahrens eignen, da die Bestimmung lediglich unter Verwendung von Standardlösungen in Methanol vorgenommen wurde. Der Einfluss der Serummatrix und der Probenvorbereitung bleibt daher unberücksichtigt. Die tatsächliche Bestimmungsgrenze in den Serumproben liegt aufgrund von Matrixeinflüssen mit Sicherheit etwas höher. Da jedoch alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Serumextrakte α -TQ-Gehalte von mindestens 3,6 ng/ 50 μ l - also deutlich oberhalb der ermittelten Bestimmungsgrenze - aufwiesen, ist dies kein Problem.

5.4.5 Reproduzierbarkeit

5.4.5.1 Retentionszeiten

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die mittleren Retentionszeiten von α -TQ und die entsprechenden Standardabweichungen im Laufe eines Tages bzw. innerhalb von zwei Wochen sowie eines 9- Monate-Zeitraumes.

Wie aus den in der Tabelle angegebenen Daten ersichtlich, zeigen die mit dem Shimadzu-HPLC-System ermittelten Retentionszeiten für α -Tocopherolchinon (und analog für die anderen Tocopherolchinone) eine hohe Stabilität.

Zeitraum	1 Tag (n = 13)	14 Tage (n = 61)	9 Monate (n >> 100)
Mittelwert Retentionszeit [min]	8,899	8,889	8,897
Standardabweichung [min]	0,011	0,036	0,103
Standardabweichung [%]	0,12	0,40	1,15

Tabelle 11: Retentionszeiten für α -TQ in Standardlösungen innerhalb verschiedener Zeiträume

Allerdings ist nach häufiger Injektion von Serumextrakten ein langsames Ansteigen der Retentionszeiten zu beobachten, dem durch gelegentliches Spülen des Systems über Nacht mit einem Methanol/Isopropanol-Gemisch (1+1 v/v) bei geringer Flussrate (0,2 ml/min) begegnet werden kann.

¹ Berechnung siehe Anhang B

5.4.5.2 Serum-Messwerte

Die Messwerte für Serumproben zeigten ebenfalls eine gute Reproduzierbarkeit für eine spurenanalytische Methode. Tabelle 12 zeigt einen Vergleich der relativen Standardabweichungen für die α -TQ Messung in Poolserumextrakten.

Zeitraum	1 Tag	1 Tag	4 Monate
Art der Messung	Mehrmalige Messung desselben Poolserumextraktes	Mehrfachbestimmungen für Poolserumproben	Messwerte für das zur Qualitätskontrolle verwendete Poolserum
Anzahl der Bestimmungen	5	3 – 5	32
Relative Standardabweichung	2,3%	2 – 6%	11%

Tabelle 12: Reproduzierbarkeit der α -TQ-Bestimmung in Serumproben

5.4.6 Wiederfindungsraten

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden dotierte Poolserumextrakte aufgearbeitet. Dabei wurde entweder mit einer Referenzmischung aus α -, β - und δ -TQ oder α -, γ - und δ -TQ dotiert. Die Wiederfindungsversuche erfolgten mit verschiedenen Poolserumproben, wobei überwiegend mit einer Dotierkonzentration von je 20 ng α -, β/γ -, δ -TQ pro 500 μ l Serum gearbeitet wurde. Alternativ erfolgten jedoch auch Bestimmungen der Wiederfindungsrate mit Dotierkonzentrationen von 10 ng α -, γ -, δ -TQ oder 40 ng α -, γ -, δ -TQ pro 500 μ l Serum, die vergleichbare Resultate erbrachten. Die Ergebnisse der Wiederfindungsexperimente sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Substanz	α -TQ	β -TQ	γ -TQ	δ -TQ
Wiederfindung (%)	99 \pm 5	23 \pm 2	62 \pm 8	< 20
Anzahl der Bestimmungen	13	6	7	13

Tabelle 13: Wiederfindungsraten für die Tocopherolchinone in dotierten Poolserumproben

Die Hintergründe für die unbefriedigenden Wiederfindungsraten für β -, γ - und δ -TQ wurden bereits im Abschnitt 5.3.2 erläutert.

Versuche zur Wiederfindung von α -THQ aus entsprechend dotierten Serumproben zeigten, dass dieses praktisch vollständig (> 90%) als α -TQ wiedergefunden wird. Dementsprechend wird in den Serumproben ein Summenparameter aus α -TQ und α -THQ nachgewiesen. Allerdings ist anzunehmen, dass in den Surveyseren aufgrund der langen Lagerung ohnehin der überwiegende Anteil in Form von α -TQ vorliegt (vgl. Abschnitt 5.2.3.1).

5.5 Lagerstabilität der Serumproben

Ein Problem bei der Untersuchung der Serumproben des Bundes-Gesundheitssurveys auf ihren α -TQ-Gehalt war deren bereits sehr lange Lagerung (4-5 Jahre) in der Tiefkühlzelle bei - 35 bis - 40°C. Da es sich bei den Tocopherolen um bekanntermaßen oxidationsempfindliche Analyten handelt, ist bei der Analytik von Tocopheroloxidationsprodukten die Lagerstabilität der Proben ein entscheidender Einflussfaktor. Zwar ist bekannt, dass die Tocopherole unter diesen Bedingungen eine gute Lagerstabilität aufweisen, jedoch ist aufgrund der geringen physiologischen Konzentrationen an α -TQ im Serum (Größenordnung ca. 1/100 der α -Tocopherolkonzentration) schon die Oxidation eines sehr geringen Anteils des vorliegenden α -Tocopherols zum entsprechenden Tocopherolchinon im Laufe der Lagerung eine erhebliche Fehlerquelle. Leider konnte aufgrund des begrenzten Zeitrahmens der vorliegenden Arbeit sowie der Notwendigkeit, zunächst eine zuverlässige Bestimmungsmethode zu entwickeln, keine Überprüfung der Lagerstabilität der Proben über einen Zeitraum von mehreren Jahren erfolgen. Um aber zumindest eine Abschätzung vornehmen zu können, wurden neben den Surveyproben auch einige frische Serumproben freiwilliger Versuchspersonen untersucht und mit einer Auswahl dieser Proben Lagerversuche über einen Zeitraum von 6-7 Monaten unternommen.

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, zeigt sich beim α -TQ-Gehalt der untersuchten Proben kein eindeutiger Trend einer Abnahme oder Zunahme der Werte über den betrachteten Zeitraum. Die relative Standardabweichung der Messungen für die einzelnen Proben bewegt sich mit maximal 10,4% für wiederholte Messungen innerhalb eines 6-7-Monats-Zeitraumes in einem sehr gutem Bereich für eine spurenanalytische Methode.

Zeitpunkt der Messung	α -TQ [ng/ml]				
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5
Mai 2003 ¹					31,8
Juni 2003 ¹	41,8	48,2	36,3	33,4	34,6
Juli 2003 ¹			36,1	35,0	29,7
September 2003 ¹			36,0	36,0	37,8
November 2003 ¹	44,3	45,9	32,9	31,3	32,6
Mittelwert ²	43,0	47,4	35,4	33,9	33,2
Standardabweichung ² (%)	5,0	3,2	9,2	8,4	10,4

Tabelle 14: Einfluss der Lagerung bei – 35°C auf den α -TQ-Gehalt frischer Serumproben

¹ angegebene Werte jeweils Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen

² Berechnung des Gesamtmittelwertes und der Standardabweichung auf Basis aller Einzelwerte

6 Ergebnisse und Diskussion – Teil 2: Auswertung der Messergebnisse

6.1 Tocopherole im Humanserum

6.1.1 Probenauswahl und Bestimmungsmethode

Zur Tocopherolbestimmung im Humanserum konnte auf eine etablierte und qualitätskontrollierte Labormethode zurückgegriffen werden, die schon seit Jahren erfolgreich zur Bestimmung von α -, β - γ - und δ -Tocopherol in Serumproben der verschiedenen am RKI durchgeführten Surveys im Rahmen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes eingesetzt wurde [137,138]. Eine Beschreibung dieser Methode ist in Abschnitt 4.3.1 gegeben. Die Durchführung der Analysen erfolgte überwiegend durch eine erfahrene Labormitarbeiterin. Dementsprechend liegt der Schwerpunkt im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezüglich der Tocopherole im Wesentlichen bei der Auswertung des gewonnenen Datenmaterials.

Als Probenmaterial dienten Serumproben des ersten gesamtdeutschen Gesundheitssurveys (Bundes-Gesundheitssurvey 1998, kurz: BGS 98). In diesem Survey wurde eine repräsentative Stichprobe der bundesdeutschen Wohnbevölkerung im Alter von 18 bis 79 Jahren zu gesundheitsrelevanten Themen befragt und einer standardisierten ärztlichen Untersuchung unterzogen. Zur Stichprobe gehörten auch in Deutschland lebende Ausländer. Ausführliche Angaben zum BGS 98 finden sich auf den Internetseiten des RKI [82]. Insgesamt wurden im Rahmen des Surveys 7124 Personen untersucht. Von 6974 Personen (97,9%) liegt ein ausgefüllter Fragebogen vor, 7099 Personen (99,6%) haben am ärztlichen Interview teilgenommen und von 6757 Personen (94,8%) konnten vollständige Blut-/ Serumanalysen durchgeführt werden. [11,217]

Für die Tocopherolbestimmungen wurde eine Unterstichprobe von 1007 Probanden gezogen. Diese umfasst alle Personen (317), die in einem gemeinsam mit dem untersuchenden Arzt ausgefüllten detaillierten Arzneimittel-Fragebogen angegeben hatten, in den letzten sieben Tagen vor der Untersuchung Vitamin-E-haltige Präparate eingenommen zu haben („Nehmer“). Als Kontrollgruppe wurden 690 Personen untersucht, die in den letzten sieben Tagen vor der Untersuchung keinerlei Medikamente eingenommen hatten („Nichtnehmer“). Da nicht von allen in der Stichprobe ausgewählten Probanden ausreichend Serum zur Verfügung stand, wurden insgesamt 933 Personen untersucht, 302 Nehmer und 631 Nichtnehmer.

Tabelle 15 zeigt, dass bei den Anwendern von Vitamin-E-haltigen Präparaten sowohl der prozentuale Frauenanteil als auch der Altersdurchschnitt höher als bei der Gesamtstichprobe des Surveys. Dies steht im Einklang mit dem allgemein festgestellten Trend eines stärkeren Arzneimittelgebrauchs bei den Frauen sowie einer altersabhängigen Steigerung der Anwendungsprävalenz [106]. Bei der Auswahl der Kontrollgruppe der Nichtnehmer wurde versucht, diesem Trend Rechnung zu tragen und in der nach 10-Jahres-Altersgruppen und Geschlecht unterteilten Gesamtstichprobe des Surveys pro Altersklasse und Geschlechtsgruppe jeweils etwa doppelt so viele Nichtnehmer auszuwählen wie Nehmer. Dies war jedoch mit zunehmendem

Alter der Probanden nicht mehr uneingeschränkt möglich, da bei den höheren Altersgruppen nur noch wenige Personen vorhanden sind, die keine Medikamente einnehmen [106].

Stichprobe	Personen gesamt	Frauen [%]	Männer [%]	Alter (Mittelwert)	
BGS 98	7124	51,6	48,4	45,7	
Gesamt-Stichprobe Tocopherole	933	56,4	43,6	50,9	
	Nehmer	302	60,3	39,7	54,1
	Nichtnehmer	631	54,5	45,5	49,3

Tabelle 15: Vergleich von Personenzahl, Geschlechtsverteilung und Altersdurchschnitt im BGS 98 und in der Unterstichprobe für die Tocopherolbestimmung

6.1.2 Einnahmeverhalten

Nach Auswertung des Arzneimittel-Fragebogens des BGS 98 ergibt sich bezüglich des Einnahmeverhaltens von Vitamin-E-haltigen Präparaten folgendes Bild:

317 Personen, das entspricht etwa 4,5% der Teilnehmer am ärztlichen Interview, hatten in den letzten sieben Tagen vor der Untersuchung entsprechende Präparate eingenommen. Von 199 dieser Probanden konnten genauere Angaben zum Präparat gemacht werden. Danach handelte es sich zu etwa 42% um niedrig dosierte Produkte mit weniger als 100 IE¹ Vitamin E pro Dosiereinheit (Kapsel, Tablette, etc.), während insgesamt etwa 58% dieser Personen Präparate mit höheren Dosierungen zwischen 100 und 1000 IE Vitamin E pro Dosiereinheit einnahmen.

Bei mindestens 57% der anhand der Medikamenteneinnahme in den letzten sieben Tagen als Vitamin-E-Nehmer klassifizierten Personen handelt es sich um längerfristige und regelmäßige Anwender von Vitamin-E-Präparaten, d.h., sie hatten im allgemeinen Teil des Fragebogens als Antwort auf die Frage nach der Einnahmehäufigkeit von Vitamin-E-Präparaten innerhalb der letzten 12 Monate angegeben, täglich oder zumindest mehrmals wöchentlich solche Präparate eingenommen zu haben. Weiterhin gaben etwa 30% der als Vitamin-E-Nehmer klassifizierten Personen an, innerhalb der letzten 12 Monate täglich oder mehrmals wöchentlich „andere Vitaminpräparate“ eingenommen zu haben, wobei es sich zu einem nicht unbeträchtlichen Anteil um Vitamin-E-haltige Multivitaminpräparate oder sonstige Kombipräparate handeln dürfte.

Bei den anhand der Medikamenteneinnahme der letzten sieben Tage als Nichtnehmer klassifizierten Personen ist dagegen auch bei Betrachtung des 12-Monats-Zeitraumes eine ausgesprochen geringe Prävalenz der Einnahme von Vitamin E bzw. anderen Vitaminpräparaten zu beobachten. So gaben lediglich 6 Personen (0,9%) bzw. 18 Personen (2,9%) an, täglich oder mehrmals wöchentlich Vitamin-E-Präparate bzw. „andere Vitaminpräparate“ einzunehmen.

¹1 IE = 1 mg all-rac- α -Tocopherolacetat = 0,671 mg RRR- α -Tocopherol

6.1.3 Messwerte in den Serumproben und Einfluss der Einnahme von Vitamin-E-Präparaten

Tabelle 16 zeigt eine Zusammenfassung der für die Gruppen der Nehmer und Nichtnehmer ermittelten Tocopherolgehalte im Serum.

		Nehmer	Nichtnehmer	Mann-Whitney-U-Test
α-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte	302	631	
	Mittelwert \pm s	23,95 \pm 8,43	18,20 \pm 4,92	p < 0,001
	Median	22,54	17,50	
	Minimalwert	8,68	7,24	
	Maximalwert	50,05	36,80	
β-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte	302	631	
	Mittelwert \pm s	0,12 \pm 0,06	0,21 \pm 0,08	p < 0,001
	Median	0,11	0,20	
	Minimalwert	0,01	0,07	
	Maximalwert	0,36	0,66	
γ-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte	302	631	
	Mittelwert \pm s	0,46 \pm 0,29	0,99 \pm 0,48	p < 0,001
	Median	0,38	0,89	
	Minimalwert	0,07	0,18	
	Maximalwert	1,75	3,52	
δ-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte ¹	224	530	
	Mittelwert \pm s	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,03	p = 0,407
	Median	0,07	0,07	
	Minimalwert	0,04	0,04	
	Maximalwert	0,17	0,33	

Tabelle 16: Tocopherolgehalte in den Serumproben der Nehmer und Nichtnehmer

Die Analyse der Daten zeigt hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) bezüglich der α -, β - und γ -Tocopherol-Konzentrationen zwischen beiden Gruppen. So liegen die α -Tocopherol-Gehalte im Serum der Nehmer im Mittel etwa 30% höher als bei den Nichtnehmern, während die β - und γ -Tocopherol-Gehalte im Serum der Nehmer im Mittel nur etwa halb so hohe Werte wie bei den Nichtnehmern erreichen. In Abbildung 19 sind diese Unterschiede für α - und γ -Tocopherol in Form von Boxplots veranschaulicht.

¹ Anzahl ist geringer als bei α -, β - und γ -Tocopherol, da einige Proben Gehalte unterhalb der Nachweisgrenze des Messverfahrens aufwiesen.

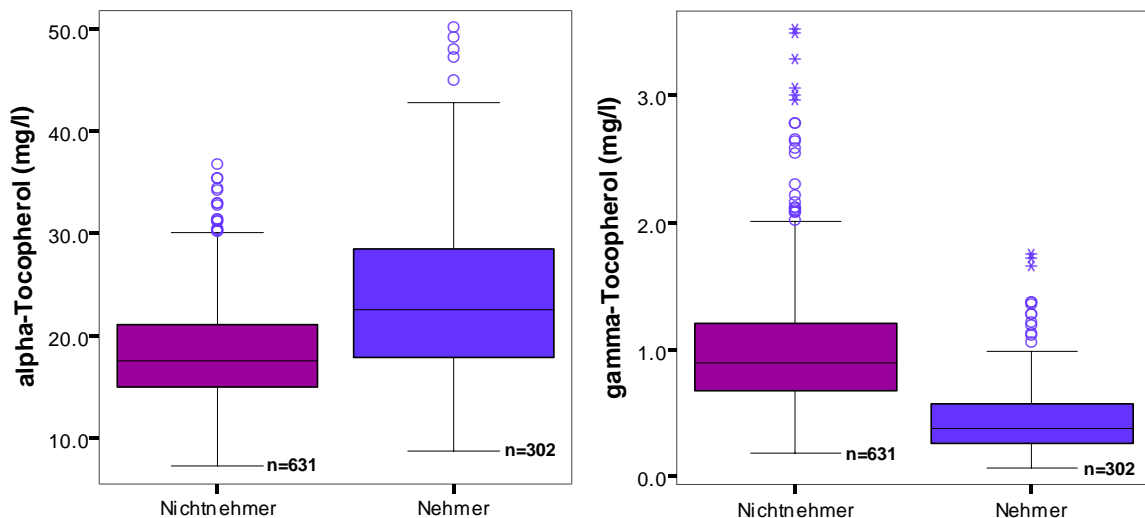


Abbildung 19: Vergleich der α - und γ -Tocopherol-Gehalte in den Serumproben der Nehmer und Nichtnehmer

Beide Effekte wurden in ähnlicher Ausprägung bereits bei den früheren Surveys in den Jahren 1984–1995 beobachtet [137]. Der höhere α -Tocopherol-Gehalt im Serum der Nehmer ist dabei durch die Tatsache zu erklären, dass die eingenommenen Vitamin-E-Präparate in der Regel ausschließlich α -Tocopherol enthalten. Dementsprechend ist die Einnahme dieser Präparate mit einem Anstieg des α -Tocopherol-Serumspiegels verbunden. Bei der gleichzeitigen Reduktion der Gehalte an β - und γ -Tocopherol im Serum der Nehmer handelt es sich um eine bereits länger bekannte Nebenwirkung der α -Tocopherol-Supplementation [72,8]. Besonders über eventuell negative Auswirkungen der mit der α -Tocopherol-Supplementation assoziierten Erniedrigung der physiologischen γ -Tocopherol-Gehalte wurde in den letzten Jahren vermehrt diskutiert [160,29,92] (vgl. auch Abschnitt 2.1.3.1). Vermutlich wird dieser Effekt durch die Aktivität des hepatischen α -Tocopherol-Transfer-Proteins verursacht (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Eine Auswertung der Zusammenhänge zwischen den α - und γ -Tocopherol-Gehalten in den Seren der untersuchten Stichprobe ergibt interessante gegenläufige Tendenzen bei den Nehmern und Nichtnehmern. So besteht bei der Gruppe der Tocopherol-Anwender eine schwache, aber hochsignifikante ($p < 0,001$), inverse Korrelation¹ zwischen den Gehalten der beiden Tocopherole, d.h. mit zunehmenden α -Tocopherol-Gehalten im Serum sinken die γ -Tocopherol-Gehalte. Bei den Nichtnehmern ist dagegen eine etwas stärkere, positive, ebenfalls hochsignifikante ($p < 0,001$) Korrelation² zwischen den beiden Werten zu beobachten. Während die Tendenz der Abnahme der γ -Tocopherol-Werte mit zunehmenden α -Tocopherol-Werten bei den Nehmern durch den Verdrängungseffekt des in höherer Dosierung zugeführten α -Tocopherols aus den Vitamin-E-Präparaten zu erklären ist (s.o.), reflektiert die positive Korrelation bei den Nichtnehmern die ernährungsbedingte Zufuhr der Tocopherole. Da Lebens-

¹ Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's rho) = - 0,222

² Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's rho) = 0,380

mittel, die natürlicherweise reich an Vitamin E sind, wie z.B. Pflanzenöle, Pflanzenölmargarine, Ölsaaten oder Nüsse, in der Regel neben dem α -Tocopherol auch erhebliche (häufig sogar größere) Mengen an γ -Tocopherol enthalten, wird durch die gekoppelte Zufuhr von α - und γ -Tocopherol die mit bevorzugter α -Tocopherol-Aufnahme assoziierte Reduktion der γ -Tocopherol-Gehalte im Serum verhindert.

Dass es sich bei der Erniedrigung der Gehalte an β - und γ -Tocopherol im Serum der Tocopherol-Nehmer um einen von der zugeführten α -Tocopherol-Dosis abhängigen Effekt handelt, zeigt auch ein Vergleich der Serumgehalte an diesen Tocopherolen zwischen den Anwendern niedrig dosierter α -Tocopherol-Präparate (< 100 I.U. pro Dosiereinheit, vgl. Abschnitt 6.1.2) mit denen der Anwender höher dosierter Präparate (100-1000 I.U.). So weisen Anwender höher dosierter Präparate signifikant höhere Gehalte an α -Tocopherol und signifikant niedrigere Gehalte an β -, γ - und sogar δ -Tocopherol auf als die Anwender der niedrig dosierten Präparate (Tabelle 17). Dabei ist zu beachten, dass die Anwendungsfrequenz und die Anwendungsdauer der Präparate nicht betrachtet wurde. Vermutlich wären die Unterschiede bei Einbeziehung dieser Parameter noch ausgeprägter.

		< 100 I.U. pro Dosiereinheit	≥ 100 I.U. pro Dosiereinheit	Mann-Whitney-U-Test
α-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte	79	114	p < 0,001
	Mittelwert (\pm s)	20,70 \pm 7,12	27,21 \pm 8,69	
	Median	19,99	25,99	
β-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte	79	114	p < 0,001
	Mittelwert (\pm s)	0,14 \pm 0,05	0,10 \pm 0,05	
	Median	0,13	0,09	
γ-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte	79	114	p < 0,001
	Mittelwert (\pm s)	0,64 \pm 0,31	0,32 \pm 0,17	
	Median	0,55	0,29	
δ-Tocopherol (mg/l)	Anzahl Messwerte ¹	60	83	p = 0,020
	Mittelwert (\pm s)	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	
	Median	0,07	0,06	

Tabelle 17: Unterschiede der Tocopherol-Serumkonzentrationen zwischen Anwendern niedrig und höher dosierter Tocopherolpräparate

6.1.4 α -Tocopherol-Konzentrationen im Serum und deren Bedeutung

Die Beurteilung der Vitamin-E-Versorgung anhand von Messwerten in physiologischen Proben wird im allgemeinen über die α -Tocopherol-Konzentrationen vorgenommen. Wie bereits im

¹ Anzahl ist geringer als bei α -, β - und γ -Tocopherol, da einige Proben Gehalte unterhalb der Nachweisgrenze des Messverfahrens aufwiesen

Abschnitt 2 erläutert, handelt es sich beim α -Tocopherol um den im menschlichen Organismus dominierenden Vertreter der Vitamin-E-Gruppe, der außerdem die höchste biologische Wirksamkeit aufweist. Die α -Tocopherol-Konzentration im Serum oder im Plasma ist dabei der am häufigsten verwendete Biomarker für den Vitamin-E-Status. Eine Beurteilung der adäquaten Vitamin-E-Versorgung über die alleinige Messung der Serum- bzw. Plasma- α -Tocopherol-Konzentrationen ist allerdings nicht unumstritten, da diese Konzentrationen von einer Reihe von Faktoren beeinflusst werden. Ein besonders wichtiger Faktor ist dabei der Lipidstatus im Serum bzw. Plasma, da die α -Tocopherol-Konzentrationen stark mit den Lipiden, besonders dem Cholesterin, korrelieren [145]. Daher wird im Allgemeinen die lipidstandardisierte α -Tocopherol-Konzentration als der verlässlichere Marker angesehen, wobei in der Regel entweder auf Gesamt-Cholesterin, Gesamtglyceride oder Gesamtlipide standardisiert wird [225].

Gemäß Literaturangaben können α -Tocopherol-Konzentrationen von $< 11,6 \mu\text{mol/l}$ ($< 5 \text{ mg/l}$) [142,145] bzw. ein α -Tocopherol/Cholesterin-Quotient von $< 2,2 \mu\text{mol/mmol}$ [219,145] im Serum bzw. Plasma als Indikator für einen Vitamin-E-Mangel angesehen werden. Wie aus den Daten in Tabelle 16 ersichtlich, weisen alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probanden α -Tocopherol-Gehalte im Serum von deutlich über 5 mg/l ($11,6 \mu\text{mol}$) auf. Selbst bei den Personen ohne Einnahme von Vitamin-E-Präparaten (Nichtnehmer) wurde als geringster Wert eine Konzentration von $7,24 \text{ mg/l}$ gemessen. Der α -Tocopherol/Cholesterin-Quotient liegt bei den Nichtnehmern im Mittel bei $6,8 \pm 1,6 \mu\text{mol/mmol}$ und bei den Nehmern bei $9,1 \pm 3,1 \mu\text{mol/mmol}$. Der Minimalwert liegt bei den Nichtnehmern bei $2,3 \mu\text{mol/mmol}$ - also knapp über der Defizitgrenze - während bei den Nehmern mindestens $3,5 \mu\text{mol/mmol}$ gemessen wurden. Wie schon bei Betrachtung der α -Tocopherol-Konzentrationen ist auch bei der lipidstandardisierten Variable (α -Tocopherol/Cholesterin) ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Nehmer und Nichtnehmer feststellbar ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

Die oben aufgeführten Schwellenwerte beziehen sich jedoch im Wesentlichen auf die Vermeidung von Vitamin-E-Mangelsymptomen. Im Zusammenhang mit der vermuteten präventiven sowie evtl. sogar kurativen Wirksamkeit von Vitamin E in Bezug auf Zivilisationserkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs sind vermutlich deutlich höhere Serumkonzentrationen empfehlenswert. So wurde von Gey [62] in einem umfangreichen Review eine lipidstandardisierte Serum- bzw. Plasmakonzentration an α -Tocopherol von $> 5,2 \mu\text{mol/mmol}$ Cholesterin als Richtwert für eine „optimale“ Konzentration in Bezug auf die Minimierung des Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorgeschlagen. Dies gelte besonders dann, wenn gleichzeitig der Vitamin-C-Gehalt bei $> 50 \mu\text{mol/l}$ und der β -Carotin-Gehalt bei $> 0,40 \mu\text{mol/l}$ liege. Diese Werte beruhen auf der Auswertung interkultureller epidemiologischer Studien in verschiedenen europäischen Populationen sowie prospektiver epidemiologischer Studien und Fall-Kontroll-Studien, in denen u.a. der Zusammenhang zwischen den Serum- bzw. Plasma-Konzentrationen an Antioxidanzien und dem Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht wurde. Sie sind praktisch identisch mit den zuvor auch mit einem minimalen Krebs-Risiko assoziierten Werten [61].

Leider wurden im Rahmen des BGS 98 die Serumkonzentrationen von Vitamin C und β -Carotin nicht bestimmt, so dass hierzu keine Aussage erfolgen kann. Betrachtet man jedoch den α -Tocopherol/Cholesterin-Quotienten, so ist der Schwellenwert von 5,2 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ bei 87,4% der untersuchten Probanden überschritten. Aufgeschlüsselt in Nehmer und Nichtnehmer sind dies 90,1% der Nehmer und 86,1% der Nichtnehmer. Der Unterschied zwischen Nehmern und Nichtnehmern ist dabei nicht signifikant ($p = 0,084$, χ^2 -Unterschiedstest), d.h., es ist kein signifikanter Nutzen der Tocopherol-Supplementation in Bezug auf das Erreichen des vorteilhaften Schwellenwertes sichtbar.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die untersuchten Probanden offensichtlich generell eine gute bis sehr gute Versorgung mit Vitamin E aufweisen. So wurde bei keinem der Probanden ein Serum- α -Tocopherol-Gehalt bzw. ein α -Tocopherol/Cholesterin-Quotient ermittelt, der einen Vitamin-E-Mangel befürchten ließe. Gleichzeitig liegt die lipidstandardisierte α -Tocopherol-Konzentration (α -Tocopherol/Cholesterin-Quotient) bei mehr als 87% der untersuchten Personen oberhalb des von Gey [61,62] vorgeschlagenen Schwellenwertes von 5,2 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$. Für Personen, deren Serumkonzentrationen diesen Schwellenwert überschritten, wurde in verschiedenen epidemiologischen Studien ein vermindertes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs festgestellt. Unter der Voraussetzung, dass zukünftige wissenschaftliche Studien nicht zu einer Erhöhung der empfohlenen Serumkonzentrationen an α -Tocopherol führen, kann daher geschlossen werden, dass auch ohne die Einnahme von Vitamin-E-Präparaten bei der überwiegenden Mehrheit untersuchten Probanden eine gute Vitamin-E-Versorgung vorliegt. Auch unter dem Aspekt, dass die bisher durchgeführten großen Interventionsstudien zum Einfluss einer Vitamin-E-Supplementation (zum Teil in Kombination mit weiteren Antioxidanzien) auf kardiovaskuläre Erkrankungen uneinheitliche und insgesamt eher enttäuschende Resultate lieferten (vgl. verschiedene aktuelle Übersichtsartikel [173,20,50,3]), ist der Nutzen einer hochdosierten α -Tocopherol-Supplementation fraglich. Dies gilt besonders im Hinblick auf mögliche prooxidative Wirkungen einer solchen Supplementation [154,159,226,182] sowie eventuelle negative Auswirkungen der α -Tocopherol-assoziierten Reduktion der physiologischen γ -Tocopherol-Gehalte (s.o., vgl. auch Abschnitt 2.1.3.1).

Generell sollte daher die gegenwärtige Praxis der unkontrollierten Einnahme von teilweise ausgesprochen hochdosierten Vitamin-E-Präparaten kritisch hinterfragt werden. Während die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) für eine angemessene tägliche Vitamin-E-Zufuhr bei lediglich 11-15 mg RRR- α -Tocopherol-Äquivalenten¹ bzw. 16,4–22,4 IE (in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht) liegen, enthalten Vitamin-E-Präparate in Deutschland bis zu 1000 IE pro Dosiereinheit (Kapsel, Tablette etc.). Zwar wird die Toxizität von Vitamin E allgemein als sehr gering eingeschätzt und akute Nebenwirkungen wurden auch bei kurzzeitiger hochdosierter α -Tocopherol-Supplementation von bis zu 3200 IE/Tag selten beobachtet [12]; Studien zu möglichen unerwünschten Effekten einer mehrjährigen hochdosierten α -Tocopherol-

¹ 1 mg RRR- α -Tocopherol-Äquivalent = 1 mg RRR- α -Tocopherol = 1,49 IE

Supplementation sind jedoch rar.

Hingewiesen wurde jedoch beispielsweise auf das nicht zu vernachlässigende Risiko einer verstärkten Blutungsneigung bei hochdosierter Vitamin-E-Supplementation, insbesondere für Personen, die gleichzeitig Aspirin (Acetylsalicylsäure) einnehmen [79]. So wurde in klinischen Studien eine gegenseitige Verstärkung der antiadhäsiven und antikoagulativen Wirkungen von Vitamin E und Aspirin nachgewiesen, die zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation führte [203]. Eine entsprechende Ko-Medikation von Aspirin und Vitamin E ist auch in Deutschland weit verbreitet [139].

Eine signifikant erhöhte Sterblichkeitsrate an hämorrhagischen Schlaganfall (subarachnoidale Blutung, Gehirnblutung) wurde auch in der finnischen ATBC-Studie (allerdings unabhängig von einer eventuellen Aspirin-Einnahme) bei einer Vitamin-E-Supplementation von 50 mg/Tag festgestellt [51]. Andere große Studien mit meist deutlich höheren Vitamin-E-Dosierungen bestätigten diesen Effekt jedoch nicht [90].

Bekannt ist weiterhin eine Verstärkung der durch Vitamin-K-Mangel verursachten Blutgerinnungsstörung bei hochdosierter Vitamin-E-Zufuhr [100]. Bei Frühgeborenen wurde ein signifikanter Anstieg retinaler Blutungen nach parenteraler Vitamin-E-Gabe beobachtet [148]. Neuere Erkenntnisse bezüglich einer Aktivierung des Xenobiotika-Metabolismus durch die Tocopherole werfen die Frage nach Wechselwirkungen mit Medikamenten auf, da bei hochdosierter Vitamin-E-Supplementation eine eventuelle Wirkungsabschwächung durch einen beschleunigten Katabolismus der Medikamentenwirkstoffe zu befürchten ist [21]. Ebenso spielt Vitamin E möglicherweise eine Rolle im Zusammenhang mit der Regulation des Schilddrüsenhormonspiegels. Dies hat sich bereits in Warnhinweisen im Beipackzettel hochdosierter Vitamin-E-Präparate niedergeschlagen, die auf eine mögliche Reduktion des Schilddrüsenhormonspiegels bei längerfristiger Einnahme von mehr als 400 mg RRR- α -Tocopherol/Tag [184] hinweisen.

Daher ist das tatsächliche Nutzen-Risiko-Verhältnis der Vitamin-E-Einnahme bisher nur schwer abzuschätzen. Uneingeschränkt empfohlen werden kann dagegen die natürliche Zufuhr von Vitamin E und entsprechenden Ko-Antioxidanzien über eine ausgewogene Ernährung, in der besonders Obst und Gemüse, Getreideprodukte und Nüsse in ausreichender Menge enthalten sein sollten und in der Pflanzenölen der Vorzug gegenüber tierischen Fetten eingeräumt werden sollte.

6.1.5 Vergleich mit früheren Surveys

Bei den im Zeitraum von 1984-1992 im Rahmen der Deutschen Herz-Kreislauf-Präventionsstudie durchgeführten Surveys war ein ständiger Anstieg der α -Tocopherol-Konzentrationen im Serum der untersuchten Bevölkerungsstichproben zu beobachten [137,138]. Dieser Trend setzt sich auch beim Bundes-Gesundheitssurvey 1998 (BGS 98) fort. Wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, sind die mittleren α -Tocopherol-Gehalte im Serum innerhalb des betrachteten Zeitraums auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes angestiegen.

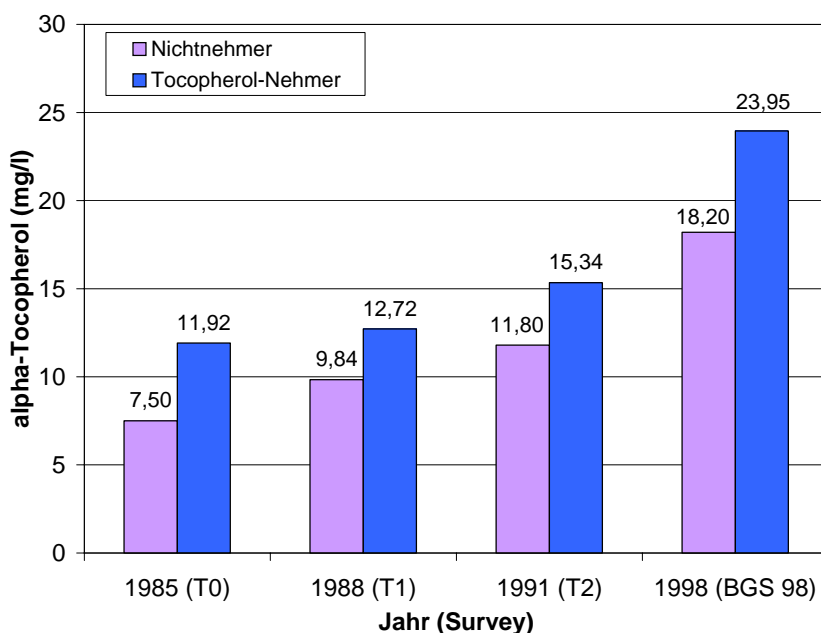


Abbildung 20: Mittlere α -Tocopherol-Konzentrationen bei Nehmern und Nichtnehmern in den untersuchten Serumproben der Surveys im Zeitraum 1984-1998

Tabelle 18 gibt eine kurze Übersicht zur Größe der Studienpopulationen der verschiedenen Surveys sowie der für die Tocopherolbestimmungen untersuchten Unterstichproben.

Zeitraum	Survey	Gesamt-Stichprobe des Surveys	Tocopherol-Stichprobe	
			Nehmer	Nichtnehmer
1984-1986	1985 (T0)	4746	178	133
1987-1989	1988 (T1)	5335	59	122
1990-1991	1991 (T2)	5306	84	159
1991-1992	1991 (Ost)	2393	44	108
1997-1999	BGS 98	7124	302	631

Tabelle 18: Studienzeiträume und Zahl der Studienteilnehmer der deutschen Gesundheits-surveys im Zeitraum 1984-1998

Während bei den Surveys T0-T2 nur Personen aus den alten Bundesländern untersucht wurden, erfolgte in den Jahren 1991-1992 ein Survey in den neuen Bundesländern (Ost). Beim BGS 98 wurde erstmals die gesamtdeutsche Bevölkerung betrachtet.

Wie die Grafik in Abbildung 21 zeigt, bestanden zu Beginn der 90er Jahre (1991 (T2) und 1991 (Ost)) noch deutliche Unterschiede bezüglich der α -Tocopherol Gehalte im Serum der Bewohner der neuen („Ost“) und alten („West“) Bundesländer. Dagegen zeigen die Ergebnisse des BGS 98, dass diese Unterschiede inzwischen praktisch vollkommen verschwunden sind.

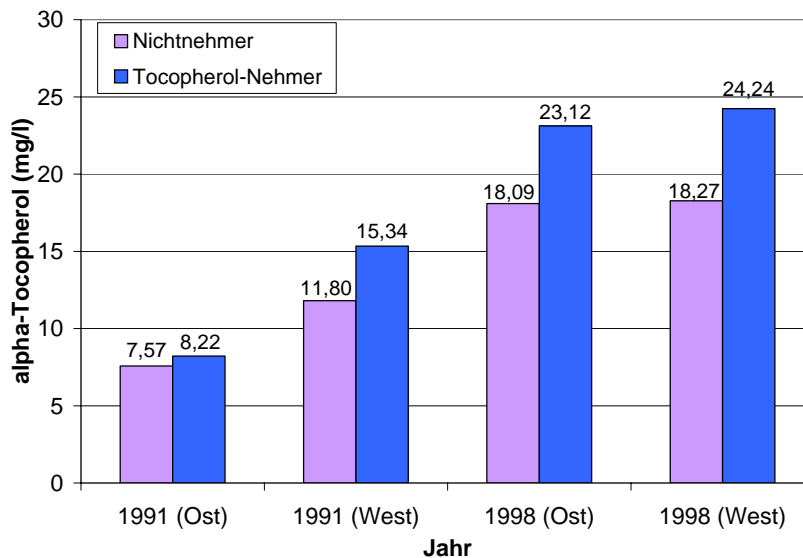


Abbildung 21: Mittlere α -Tocopherol-Konzentrationen bei Nehmern und Nichtnehmern in den neuen („Ost“) und alten („West“) Bundesländern in den Jahren 1991 und 1998

6.2 α -Tocopherolchinon im Humanserum

6.2.1 Probenauswahl und Bestimmungsmethode

Im Anschluss an die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte Entwicklung einer Proben-vorbereitungs- und Messmethode zur Bestimmung des α -TQ-Gehaltes in Serumproben (vgl. Abschnitt 5) wurde die Methode zur Ermittlung der α -TQ-Konzentrationen in einer Auswahl von Seren des BGS 98 eingesetzt. Hierfür wurde unter Verwendung der Statistik-Software SPSS eine Zufallsstichprobe ($n = 100$) aus den Serumproben gezogen, in denen zuvor eine Bestimmung der Tocopherole erfolgt war (vgl. Abschnitt 6.1). Da von drei Proben dieser Stichprobe nicht mehr ausreichend Serum vorhanden war, setzt sich die tatsächlich untersuchte Stichprobe aus 97 Personen zusammen, etwa einem Drittel Tocopherol-Nehmern ($n = 32$) und zwei Dritteln Nichtnehmern ($n = 65$). Tabelle 19 gibt einen Überblick über die Personenzahl, die Geschlechtsverteilung und den Altersdurchschnitt der Probanden im Vergleich zur Gesamtstichprobe des Surveys und der Stichprobe für die Tocopherolbestimmung.

Stichprobe		Personen gesamt	Frauen [%]	Männer [%]	Alter (Mittelwert)
BGS 98		7124	51,6	48,4	45,7
Tocopherole		933	56,4	43,6	50,9
α -TQ	gesamt	97	49,5	50,5	48,9
	Nehmer	32	50,0	50,0	53,7
	Nichtnehmer	65	50,8	49,2	49,3

Tabelle 19: Vergleich von Personenzahl, Geschlechtsverteilung und Altersdurchschnitt der Teilnehmer des BGS 98 sowie der Unterstichproben für die Bestimmung der Tocopherole und des α -Tocopherolchinons (α -TQ)

6.2.2 Messwerte in den Serumproben und Einfluss der Einnahme von Vitamin-E-Präparaten

Die Ergebnisse der α -TQ-Messungen in den ausgewählten Surveyproben sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Eine ausführliche Dokumentation der α -TQ-Gehalte der Proben, inklusive der in diesen Seren gemessenen Tocopherol-Gehalte, des α -TQ/ α -Tocopherol-Quotienten sowie Geschlecht und Alter der untersuchten Personen, ist in Anhang C beigefügt.

		Nehmer	Nichtnehmer	Mann-Whitney-U-Test
α -TQ ($\mu\text{g/l}$)	Anzahl Messwerte	32	65	
	Mittelwert \pm s	173,4 \pm 147,6	135,0 \pm 91,8	p = 0,097
	Median	127,8	106,7	
	Minimalwert	66,9	62,3	
	Maximalwert	856,5	602,9	

Tabelle 20: α -TQ-Gehalte in den Serumproben der Nehmer und Nichtnehmer

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich, liegt der Mittelwert der α -TQ Konzentration bei den Anwendern von Vitamin-E-haltigen Präparaten (Nehmer) höher als bei den Nichtnehmern. Aufgrund der großen Streuung der ermittelten Werte sowie der kleinen Stichprobengröße erreicht dieser Unterschied jedoch keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Abbildung 22 zeigt eine grafische Veranschaulichung der Unterschiede zwischen den Nehmern und Nichtnehmern in Form von Boxplots. Hier ist zu erkennen, dass die α -TQ-Gehalte im Serum der Nehmer eine wesentlich größere Streuung aufweisen als bei den Nichtnehmern. Ähnliches gilt auch für die α -Tocopherol-Gehalte im Serum der Nehmer (Abbildung 19).

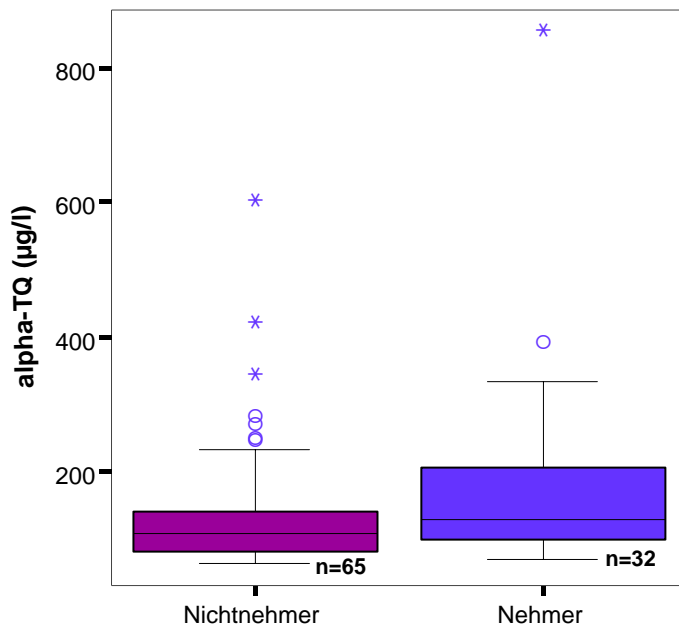


Abbildung 22: Vergleich der α -TQ-Konzentrationen im Serum der Nehmer und Nichtnehmer

6.2.3 Einfluss des α -Tocopherol-Gehaltes auf den α -TQ-Gehalt der Serumproben

Die α -Tocopherol-Konzentration im Serum ist offensichtlich ein Einflussfaktor für die α -TQ-Konzentration, beide Werte zeigen eine statistisch signifikante Korrelation¹ ($p < 0,001$). Abbildung 23 zeigt eine grafische Darstellung dieses Zusammenhanges in Form eines Streudiagramms inklusive der errechneten linearen Regressionsgeraden. Allerdings deuten die starke Streuung der Werte um die Regressionsgerade und das geringe Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,24$) darauf hin, dass der Zusammenhang recht schwach ist und dass weitere Einflussfaktoren vorhanden sind.

Solche weiteren Einflussfaktoren sind es auch, die eine Bestimmung der α -TQ-Konzentration im Serum eigentlich erst interessant machen. In Anbetracht der festgestellten Abhängigkeit des α -TQ-Gehaltes von der α -Tocopherol-Konzentration ist es für die Betrachtung weiterer Einflussfaktoren sinnvoll, die α -TQ-Werte durch Berechnung des α -TQ/ α -Tocopherol-Quotienten (in %) auf den α -Tocopherol-Gehalt zu normieren. Der α -TQ/ α -Toc-Quotient ist ein Ausdruck für den Grad der erfolgten α -Tocopherol-Oxidation im jeweiligen Serum. Eine Berechnung dieses Quotienten wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgeschlagen, besonders dann, wenn die gemessenen α -TQ-Gehalte in verschiedenen Körperflüssigkeiten oder Organen als Indikator für oxidativen Stress eingesetzt werden sollen (vgl. Abschnitt 2.3.2).

¹ Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's rho) = 0,506

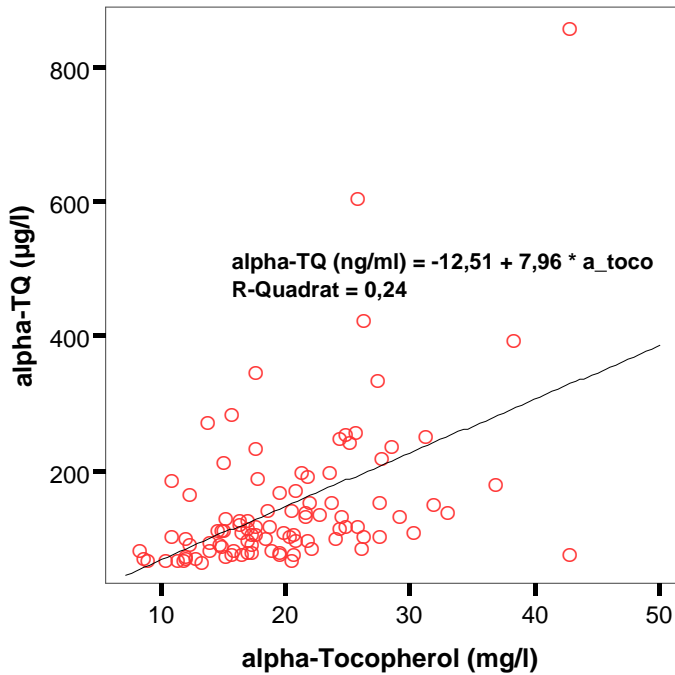


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen dem α -Tocopherol- und dem α -TQ-Gehalt in den Serumproben der TQ-Stichprobe

Bei Berechnung des α -TQ/ α -Toc-Quotienten für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben zeigt sich, dass der im Mittel höhere α -TQ-Wert im Serum der Nehmer (vgl. Tabelle 20, S.87) im Wesentlichen durch deren höhere α -Tocopherol-Werte bedingt ist, so dass die Unterschiede zwischen Nehmern und Nichtnehmern bei Betrachtung der Mittelwerte bzw. des Medians des α -TQ/ α -Toc-Quotienten weitgehend entfallen (Abbildung 24).

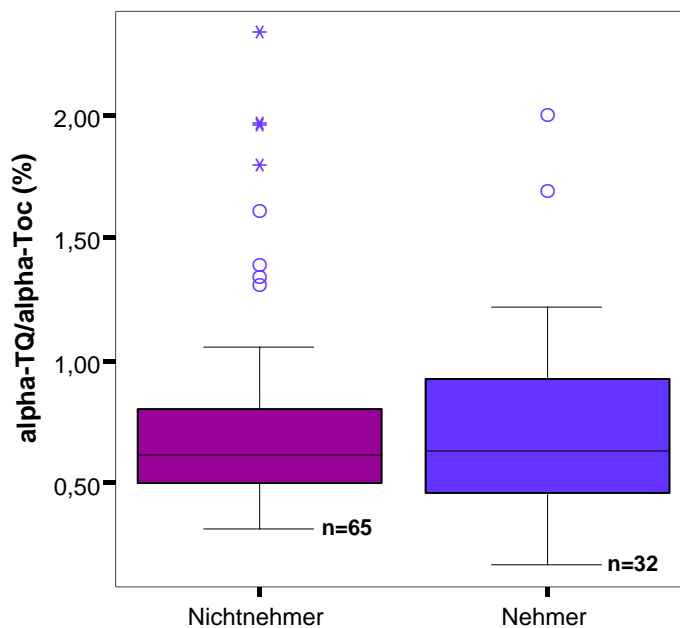


Abbildung 24: Vergleich des α -TQ/ α -Toc-Quotienten im Serum der Nehmer und Nichtnehmer

Allerdings zeigt eine genauere Analyse der Daten, dass diese Schlussfolgerung zu sehr verallgemeinert. So werden beispielsweise die niedrigsten α -TQ/ α -Toc-Quotienten bei den Nehmern gemessen (Minimalwert Nehmer: 0,17%, Nichtnehmer 0,31%), was als Hinweis darauf gedeutet werden könnte, dass einige Tocopherol-Nehmer tatsächlich von der α -Tocopherol-Supplementation profitieren und eine verringerte α -Tocopherol-Oxidation, also einen geringeren Grad an oxidativem Stress, aufweisen. Besonders erwähnenswert ist dabei, dass der Nehmer mit dem geringsten α -TQ/ α -Toc-Quotienten (0,17%) auch die Person mit dem höchsten α -Tocopherol-Serum-Gehalt (42,79 mg/l) der TQ-Stichprobe ist. Im Kontrast dazu wird bei einem weiteren Nehmer, der mit 42,78 mg/l einen nahezu identisch hohen α -Tocopherol-Gehalt im Serum aufweist, der höchste α -TQ-Gehalt im Serum (856,5 μ g/l) und der zweithöchste α -TQ/ α -Toc-Quotient (2,0%) gemessen. Bei diesem Probanden handelt es sich um einen insulinpflichtigen Diabetiker, der auch an koronarer Herzerkrankungen leidet, also unter Krankheiten, für die ein Zusammenhang mit oxidativem Stress vermutet wird. Der hohe α -TQ/ α -Toc-Quotient könnte als Bestätigung für solchen oxidativen Stress interpretiert werden.

Auffällig ist weiterhin, dass bei den Nichtnehmern im Vergleich zu den Nehmern eine deutlich größere Anzahl von Werten gemessen wird, die stark von den Werten der Mehrheit der ermittelten Werte abweichen (Ausreißer/ Extremwerte, vgl. Abbildung 24 und Abschnitt 4.3.11). Dies erweckt den Eindruck, dass die Einnahme von Vitamin-E-haltigen Präparaten die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten solcher auffällig hohen TQ/ α -Toc-Quotienten ($> 1,3\%$) herabsetzt. Für eine genauere Aussage in dieser Hinsicht wäre jedoch die Untersuchung einer größeren Stichprobe erforderlich.

6.2.4 Weitere Einflussfaktoren

Als weiterer Einflussfaktor für den Grad der α -Tocopherol-Oxidation im Organismus kommt beispielsweise der Gehalt an Ko-Antioxidanzien (wie z.B. Vitamin C) im Serum in Frage. Wie bereits im Abschnitt 2.1.3.1 erläutert, wirken die verschiedenen biologischen Antioxidanzien beim Schutz vor oxidativem Stress zusammen und es wird vermutet, dass synergistische Wirkungsmechanismen existieren. Diese beruhen wahrscheinlich auf dem Recycling des bei der Vitamin-E-Oxidation primär entstehenden Tocopheroxyl-Radikals, wodurch eine irreversible Oxidation des α -Tocopherols zu nichtradikalischen Folgeprodukten, wie z.B. dem α -TQ, verhindert wird (vgl. Abschnitt 2.3). Da die Ermittlung entsprechender Parameter weder Bestandteil der im Rahmen des Surveys durchgeführten Laboranalysen noch Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, kann jedoch keine Auswertung in dieser Hinsicht erfolgen. Hier ergeben sich interessante Anhaltspunkte für fortführende Untersuchungen.

Weiterhin stellen vermutlich verschiedene Krankheiten einen Einflussfaktor dar. So wird bei einer Reihe von Krankheiten angenommen, dass oxidativer Stress im Zusammenhang mit deren Pathogenese eine Rolle spielt bzw. zumindest eine schädliche Begleiterscheinung darstellt. Hierzu zählen beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs sowie akute und chronische Entzündungsprozesse, Diabetes mellitus, Katarakt (Grauer Star), Mukoviszidose

oder neurologische Erkrankungen wie die Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung [135,20]. Eine Auswertung der Daten unter diesem Gesichtspunkt ist zwar auf Basis des eingesetzten Studiendesigns eingeschränkt möglich, jedoch ist die Aussagekraft der Untersuchung aufgrund der geringen Stichprobengröße von 97 Personen sowie der entsprechend geringen Fallzahlen der einzelnen Erkrankungen recht gering.

Allerdings lässt eine Analyse der Daten bereits Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem α -TQ/ α -Toc-Quotienten und der Prävalenz von Herzerkrankungen erkennen. So sind bei Unterteilung der TQ-Stichprobe auf Basis des ermittelten α -TQ/ α -Toc-Quotienten in fünf etwa gleich große Untergruppen (Quintile) (Abbildung 25) und Auswertung der Fragebogenangaben der Probanden zu den abgefragten Krankheiten des Themenkomplexes Herzerkrankungen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen.

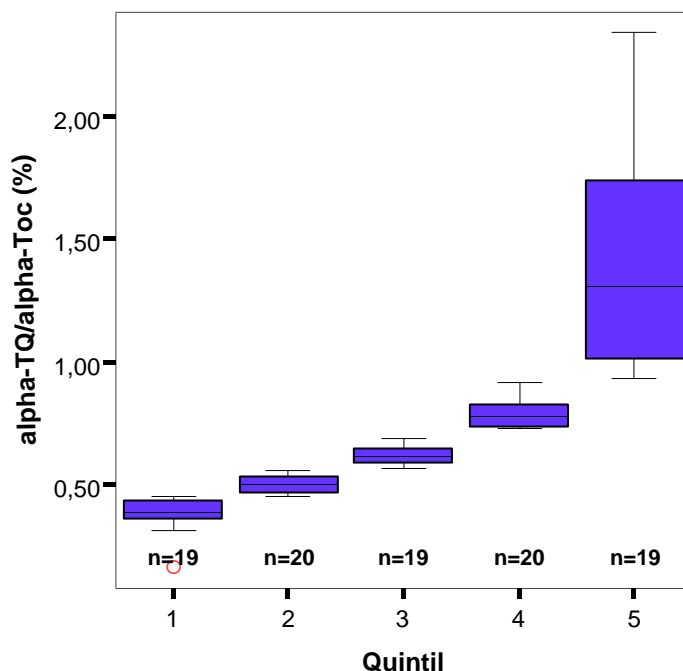


Abbildung 25: Boxplots für den α -TQ/ α -Toc-Quotienten der in Quintile aufgeteilten TQ-Stichprobe

Die kombinierte Variable für Herzerkrankungen setzt sich aus den Krankheitsbildern:

- 1) Durchblutungsstörungen am Herzen, Verengung der Herzkranzgefäße, Angina pectoris,
- 2) Herzinfarkt,
- 3) Herzschwäche, Herzinsuffizienz

zusammen, die im Rahmen des Survey-Fragebogens mit den Antwortmöglichkeiten „ja“, „nein“ und „weiß nicht“ abgefragt wurden. Es handelt sich dabei um Krankheitsbilder, die üblicherweise unter dem Begriff Koronare Herzkrankheit zusammengefasst werden. Dies sind Erkrankungen, bei denen arteriosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße (Koronarsklerose) die eigentliche Krankheitsursache sind [77].

Trotz Bildung der kombinierten Variablen sind die Erwartungshäufigkeiten für das Auftreten der Herzerkrankung so gering (< 5 Fälle im 5. Quintil), dass zur Prüfung der Signifikanz auf den exakten Test nach Fisher zurückgegriffen werden muss (vgl. Abschnitt 4.3.11). Da dieser Test nur für alternative Daten verwendbar ist, wurde die Angabe „weiß nicht“ bei der Frage nach den entsprechenden Erkrankungen im Fragebogen als „nein“ gewertet (Tabelle 21).

Quintil	Personen, gesamt	Herzerkrankung		Exakte Signifikanz (1-seitig), nach Fisher
		ja	nein	
1-4	76 ¹	4	72	0,014
5	19	5	14	

Tabelle 21: Vergleich der Prävalenz von Herzerkrankungen im höchsten (5.) Quintil und im 1.-4. Quintil der anhand des α -TQ/ α -Toc-Quotienten unterteilten TQ-Stichprobe

Die beobachtete signifikant höhere Prävalenz (5 von 19; 26,3%) von Herzerkrankungen bei Probanden, deren α -TQ/ α -Toc-Quotient im höchsten (5.) Quintil der untersuchten Stichprobe liegt, im Vergleich zur Prävalenz bei den Probanden des 1.-4. Quintils (4 von 72; 5,6%), steht im Einklang mit der Theorie, dass solche Erkrankungen mit oxidativem Stress in Verbindung stehen. Die Ergebnisse müssen jedoch sowohl aufgrund der kleinen Stichprobengröße als auch in Anbetracht weiterer vermutlicher Einflussgrößen (s.u.) mit Vorsicht interpretiert werden. Sie liefern jedoch interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Mögliche weitere Einflussgrößen könnten beispielsweise die Einnahme von Medikamenten (auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Medikamenten) oder der Einfluss von Medikamenten oder deren Metaboliten im Serum auf die Lagerstabilität (Oxidationsstabilität) des Serums oder auf die α -TQ- oder α -Tocopherol-Bestimmung sein. Selbst die Einnahme von hochdosierten Vitamin-E-Präparaten könnte, trotz der Normierung auf den α -Tocopherol-Gehalt des Serums in Form des α -TQ/ α -Toc-Quotienten, ein Einflussfaktor sein. So ist nicht auszuschließen, dass ein erhöhter α -TQ/ α -Toc-Quotient bei den Tocopherol-Nehmern (4 der 5 Personen mit Herzerkrankungen aus dem 5. Quintil sind Vitamin-E-Nehmer) möglicherweise auf prooxidative Wirkungen des eingenommenen α -Tocopherols hinweist. Ebenso könnten Variablen wie das Rauchverhalten (Raucher/ Nichtraucher) oder das Ernährungsverhalten weitere Einflussfaktoren darstellen. Interessant wäre beispielsweise eine Betrachtung des Zusammenhanges zwischen dem ernährungsabhängigen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Serumlipiden und den α -TQ-Gehalten bzw. dem α -TQ/ α -Toc-Quotienten.

Ein weiterer nicht zu unterschätzender Einflussfaktor liegt im Falle der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Seren des BGS 98 bei den Transportbedingungen der Proben vom Untersuchungsort zum Labor bzw. bei den Lagerbedingungen und der Dauer der Lagerung für die Proben. Dies gilt besonders im Hinblick darauf, dass die Blutabnahme und Serumgewinnung bei den Proben des BGS 98 bereits im Zeitraum von Oktober 1997 bis März 1999 in

¹ eigentlich 78 Personen, aber bei 2 Probanden im Fragebogen keine Angaben zu Krankheiten vorhanden

120 über ganz Deutschland verteilten Untersuchungsstandorten vorgenommen wurde. Somit war einerseits ein Transport der Proben in das Zentrallabor des RKI erforderlich, andererseits wurden die Proben bis zur Messung des α -TQ-Gehaltes bereits über einen Zeitraum von mehreren Jahren bei Temperaturen von -35 bis -40°C gelagert.

Um einen Eindruck über den Einfluss von Transport und Lagerung auf die α -TQ-Gehalte der Surveyproben zu gewinnen, wurden auch einige frische Seren von 14 freiwilligen Versuchspersonen untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.2). Bei diesen Proben erfolgte die Blutabnahme und Serumgewinnung direkt im Labor und die α -TQ-Bestimmung noch am selben Tag bzw. nach kurzfristiger Lagerung bei -35°C innerhalb weniger Tage nach der Blutentnahme. Ein Vergleich der α -TQ-Messwerte dieser Proben mit jenen der Surveyproben zeigt, dass die Surveyproben generell höhere α -TQ-Gehalte aufweisen als die frischen Vergleichsproben und dass die Streuung der Messwerte bei den frischen Proben wesentlich geringer ist (Tabelle 22). Die Tatsache, dass sich die Wertebereiche der α -TQ-Konzentrationen in den frischen Proben und den Surveyproben nicht überschneiden, muss als deutlicher Hinweis auf einen Einfluss der Lagerung bzw. der Transportbedingungen bei den Surveyproben interpretiert werden.

		BGS 98	Frische	Mann-Whitney-
		TQ-Stichprobe	Seren	U-Test
	Anzahl Messwerte	97	14	
α-TQ ($\mu\text{g/l}$)	Mittelwert \pm s	147,7 \pm 113,9	40,6 \pm 8,4	p < 0,001
	Median	109,7	40,6	
	Minimalwert	62,3	29,7	
	Maximalwert	856,5	61,5	
α-TQ/α-Toc (%)	Mittelwert \pm s	0,74 \pm 0,41	0,33 \pm 0,14	p < 0,001
	Median	0,62	0,32	
	Minimalwert	0,17	0,13	
	Maximalwert	2,34	0,62	

Tabelle 22: Vergleich der α -TQ-Konzentrationen und α -TQ/ α -Toc-Quotienten in den Serumproben des BGS 98 und in frischen Vergleichsproben

Zwar zeigte sich bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lagerversuchen mit frischen Serumproben eine gute Stabilität des α -TQ-Gehaltes der Proben bei -35°C innerhalb eines Zeitraumes von 6-7 Monaten (vgl. Abschnitt 5.5), jedoch berechtigt dies nicht zu der Schlussfolgerung, dass die Proben auch über einen Zeitraum von mehreren Jahren stabil bleiben. Eine weitere unbekannte Größe ist der Transport der Proben vom Untersuchungsstandort zum Labor. Dieser erfolgte zwar in gut isolierten Behältern, in denen durch beigelegte Kühlakkus sichergestellt wurde, dass die zuvor auf -50°C tiefgefrorenen Proben während des Transportes nicht auftauten. Der genaue Temperaturverlauf in diesen Behältern ist jedoch nicht bekannt, zumal die Transportbedingungen der einzelnen Probenchargen sicherlich nicht völlig

identisch waren (z.B. unterschiedliche Transportzeiten und Außentemperaturen).

Inwieweit die offensichtlich erfolgte teilweise α -Tocopherol-Oxidation in den Surveyproben während Transport oder Lagerung die Aussagefähigkeit der α -TQ-Messwerte einschränkt oder gar zunichte macht, ist schwer zu beantworten, da das Ausmaß der erfolgten Oxidation nicht bekannt ist. Die geringe Differenz zwischen dem Maximalwert der α -TQ-Konzentration in den frischen Proben (61,5 $\mu\text{g/l}$) und dem Minimalwert bei den Surveyproben (62,3 $\mu\text{g/l}$) sowie die Überschneidung der Wertebereiche für den α -TQ/ α -Toc-Quotienten in den frischen Proben und den Surveyproben weisen jedoch darauf hin, dass das Ausmaß der erfolgten Oxidation möglicherweise relativ gering ist. Die wesentlich geringere Streuung der gemessenen α -TQ-Werte in den frischen Proben im Vergleich zu den Surveyproben kann jedenfalls auch mit anderen Einflussfaktoren erklärt werden. So handelte es sich bei den Probanden für die frischen Serumproben nur um eine kleine, bei weitem nicht repräsentative Stichprobe, die sich ausschließlich aus Personen zusammensetzte, die keine Vitamin-E-haltigen Präparate eingenommen hatten und die sich generell eines verhältnismäßig guten Gesundheitszustandes erfreuten. Das Alter der Probanden lag zum Zeitpunkt der Probenahme zwischen 31 und maximal 63 Jahren (Survey-Stichprobe 18-75 Jahre), 13 der 14 Probanden (93%) waren Nichtraucher (Survey-Stichprobe 65%) und keiner der Probanden war erheblich übergewichtig. Die α -Tocopherol-Gehalte in den Frischseren lagen zwischen 7,14 und 26,46 mg/l, während bei der Survey-Stichprobe Werte zwischen 8,36 und 42,79 mg/l gemessen wurden. All dies sind Parameter, die wesentlich von denen der Survey-Stichprobe abweichen und die daher Erklärungsansätze für die beobachteten Unterschiede bei den gemessenen α -TQ-Werten bieten.

Auch der ermittelte physiologisch plausible und statistisch signifikante Zusammenhang zwischen dem α -TQ/ α -Tocopherol-Quotienten und der Prävalenz von Herzerkrankungen (s.o.) deutet darauf hin, dass die gemessenen α -TQ-Werte Aussagekraft besitzen. Es ist durchaus möglich, dass das Ausmaß der eventuell erfolgten partiellen α -Tocopherol-Oxidation im Serum während des Transports bzw. der Lagerung der Proben vom physiologischen Grundzustand des Probanden zum Zeitpunkt der Probenahme abhängt, insbesondere von der sogenannten „antioxidativen Kapazität“ des Serums. Hierbei handelt es sich um ein Maß für die kumulative Aktivität der verschiedenen antioxidativen Verbindungen im Serum in Bezug auf die Verzögerung von oxidativen Prozessen [63].

Ebenso zeigt sich eine gute Übereinstimmung der gemessenen α -TQ-Werte bzw. α -TQ/ α -Toc-Quotienten (vgl. Tabelle 22) – sowohl in den frischen Seren als auch (mit gewissen Einschränkungen) in den Surveyseren - mit den wenigen bisher publizierten Literaturangaben zu α -TQ-Gehalten in Humanserum- oder Humanplasma-Proben. So wurden beispielsweise Pacht et al. [162] im Serum von einigen Probanden α -TQ-Mittelwerte (\pm SEM¹) von $80 \pm 20 \mu\text{g/l}$ (7 Raucher) bzw. $90 \pm 30 \mu\text{g/l}$ (12 Nichtraucher) gemessen. Nach 3-wöchiger hochdosierter

¹ Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)

α -Tocopherol-Supplementation (2400 IE/Tag) stiegen diese Werte bei den Nichtrauchern, im Zusammenhang mit einem starken Anstieg des α -Tocopherol-Serumspiegels, auf $150 \pm 30 \mu\text{g/l}$ an, während sie bei den Rauchern im Mittel konstant blieben. Der α -TQ/ α -Toc-Quotient lag sowohl für die Raucher als auch die Nichtraucher vor und nach der α -Tocopherol-Supplementation bei unter 1,1%.

Auch von Jain et al. [89] wurden im Plasma von 26 Müttern und deren neugeborenen Säuglingen α -TQ-Mittelwerte ($\pm \text{SE}^1$) einer ähnlichen Größenordnung gemessen (Mütter: $71,5 \pm 8,9 \mu\text{g/l}$, Säuglinge: $49,1 \pm 8,9 \mu\text{g/l}$). Aus den Mittelwerten der α -TQ- und α -Tocopherol-Konzentrationen lassen sich α -TQ/ α -Toc-Quotienten in der Größenordnung von etwa 0,6% (Mütter) bzw. 2% (Säuglinge) abschätzen.

Murphy et al. [150] ermittelten in zehn voneinander unabhängigen tiefgefrorenen Humanplasma-Portionen von Plasmaspendern einen mittleren α -TQ-Gehalt ($\pm s^1$) von $44,7 \pm 26,8 \mu\text{g/l}$, während der α -TQ-Gehalt im Plasma von Patienten, die sich wegen eines Aortenaneurysmas einer Operation unterziehen mussten, mit im Mittel $160,8 \pm 75,9 \mu\text{g/l}$ deutlich höher lag. In der ischämischen Phase bei der Operation stiegen diese Werte auf $268,0 \pm 89,3 \mu\text{g/l}$, was mit einem Anstieg des α -TQ/ α -Toc-Quotienten von 1,7% (vor der Operation) auf 3,7 % während der ischämischen Phase verbunden war.

Ebenso ermittelten Frey et al. bei Patienten, die sich einer Herzoperation unterziehen mussten, relativ hohe α -TQ/ α -Toc-Quotienten, wobei besonders bei Patienten mit postoperativen Komplikationen ausgesprochen hohe Werte erreicht wurden (Mittelwert 9,7% bei Patienten mit multiplen Organversagen (MOF), vgl. Abschnitt 2.3.2). Die eigentlichen α -TQ-Konzentrationen wurden von den Autoren zwar nicht aufgeführt, aus den angegebenen α -TQ/ α -Toc-Quotienten und den α -Tocopherol-Gehalten im Plasma dieser Patienten lassen sich jedoch Konzentrationen abschätzen, die etwa zwischen $170 \mu\text{g/l}$ (präoperativ) und $900 \mu\text{g/l}$ (postoperativ, bei MOF-Patienten) liegen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Mittelwerte ($\pm s$) von $40,6 \pm 8,4 \mu\text{g/l}$ α -TQ in den frischen Seren bzw. $147,7 \pm 113,9$ in den Surveyseren, bei mittleren α -TQ/ α -Toc-Quotienten von $0,33\% \pm 0,14\%$ (frische Seren) bzw. $0,74\% \pm 0,41\%$ (Survey) passen gut in den Kontext der Literaturangaben. Während bei gesunden Personen ohne massive α -Tocopherol-Supplementation von allen Autoren mittlere α -TQ-Konzentrationen im Bereich von etwa 40 - $90 \mu\text{g/l}$ und α -TQ/ α -Toc-Quotienten von üblicherweise unter 1% gemessen wurden, können die α -TQ-Konzentrationen im Zusammenhang mit hochdosierter α -Tocopherol-Supplementation oder bei Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, offensichtlich durchaus auf Werte von bis zu mehreren $100 \mu\text{g/l}$ ansteigen. Unter diesen Bedingungen, oder auch bei sehr niedrigen α -Tocopherol-Konzentrationen im Blut wie im Falle der Säuglinge, können die

¹ „standard error“, nicht näher definiert, vermutlich entweder Standardfehler des Mittelwertes oder Standardabweichung

α -TQ-Gehalte deutlich mehr als 1% der α -Tocopherol-Konzentrationen erreichen (d.h., α -TQ/ α -Toc-Quotient > 1%).

Der ermittelte α -TQ/ α -Toc-Quotient bei den untersuchten 97 Serumproben des BGS 98 liegt in guter Übereinstimmung mit den Literaturangaben bei etwa 80% der Probanden bei Werten unter 1% und erreicht maximal 2,34%. Auch die α -TQ-Konzentrationen liegen in etwa 50% der Fälle unter 100 μ g/l und in 75% der Fälle unter 167 μ g/l. Der Maximalwert der α -TQ-Konzentration von 856 μ g/l (α -TQ/ α -Toc-Quotient 2,0%) ist zwar in Relation zu den Literaturangaben recht hoch, allerdings handelt es sich bei diesem Probanden um einen insulinabhängigen Diabetiker mit koronarer Herzkrankheit, d.h. mit Erkrankungen, für die ein Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress vermutet wird (s.o.).

Insgesamt muss bei der Beurteilung der Messergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich bei den untersuchten 97 Seren des Bundes-Gesundheitssurveys 1998, im Vergleich zu den vorhandenen Literaturangaben, um die bisher größte Stichprobe für α -TQ-Messungen handelt. Verglichen mit den oben zitierten Arbeiten bezieht sie einen wesentlich heterogeneren Personenkreis ein. So wurden Serumproben von Personen aller Altersgruppen zwischen 18-75 Jahren untersucht, wobei es sich sowohl um gesunde als auch an verschiedenen Erkrankungen leidende Personen handelte. Außerdem schloss die Stichprobe sowohl Nichtnehmer als auch Tocopherol-Nehmer ein, deren α -Tocopherol-Serumkonzentrationen teilweise außergewöhnlich hohe Werte erreichten (bis zu 42,79 mg/l). Da mit der größeren Personenzahl und der Heterogenität der Stichprobe auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Extremwerten steigt, ist der beobachtete etwas größere Wertebereich für die α -TQ-Konzentrationen in diesen Proben durchaus zu erwarten, auch wenn die gemessenen Werte aufgrund einer möglicherweise erfolgten partiellen α -Tocopherol-Oxidation während des Transports oder der Lagerung möglicherweise generell etwas zu hoch sind.

Zur endgültigen Abschätzung des Ausmaßes der erfolgten α -Tocopherol-Oxidation im Verlauf von Transport und Lagerung der untersuchten Proben des BGS 98 sowie zur Etablierung von Referenzbereichen für den α -TQ-Gehalt und den α -TQ/ α -Toc-Quotienten in Serumproben sind jedoch in jedem Fall weitere Untersuchungen in frischen Seren einer größeren Bevölkerungstichprobe erforderlich.

¹ Standardabweichung

7 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Thema Vitamin E und seinen Oxidationsprodukten, wobei der Schwerpunkt bei der Entwicklung einer routinefähigen Methode zur Bestimmung von Tocopheroloxidationsprodukten in Humanserumproben lag. Weitere Bestandteile der Arbeit waren die Anwendung der entwickelten Methode zur Bestimmung der α -Tocopherolchinon-Gehalte in einer Auswahl von Serumproben des Bundes-Gesundheits-surveys 1998 sowie eine Auswertung dieser Ergebnisse. Ebenso erfolgte eine Auswertung der in einer größeren Stichprobe von Seren des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 mittels einer etablierten Labormethode bestimmten Gehalte an α -, β -, γ - und δ -Tocopherol.

Die Methodenentwicklung zur Bestimmung der Tocopheroloxidationsprodukte im Humanserum konzentrierte sich auf die Bestimmung der Tocopherolchinone und Tocopherolhydrochinone. Dazu war es zunächst erforderlich, die entsprechenden Referenzsubstanzen für α -, β -, γ - und δ -Tocopherolchinon (TQ) sowie die entsprechenden Tocopherolhydrochinone (THQ) zu synthetisieren, da diese zum Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Arbeiten nicht kommerziell erhältlich waren. Später konnte allerdings α -TQ als Referenzsubstanz aus dem Chemikalienfachhandel bezogen werden, so dass eine Kontrolle von Identität und Reinheit des erzielten Syntheseproduktes durch Vergleich mit der authentischen Referenzsubstanz möglich wurde. Bei den Syntheseverfahren wurde auf bereits in der Literatur beschriebene Methoden zurückgegriffen, die auf der Oxidation der entsprechenden Tocopherole zu den Tocopherolchinonen mit Eisen-III-chlorid [189,151] bzw. einer Reduktion der Tocopherolchinone zu den Tocopherolhydrochinonen mit Natriumborhydrid [129] beruhen. Alle Referenzsubstanzen wurden erfolgreich synthetisiert; die Tocopherolhydrochinone erwiesen sich jedoch als äußerst oxidationsempfindlich. Auch ein Zusatz von Antioxidanzien wie BHT oder TBHQ konnte die rasche oxidative Rückreaktion zu den Tocopherolchinonen nicht dauerhaft verhindern. Daher wurde auf eine Isolierung und Lagerung der Tocopherolhydrochinone als Reinsubstanzen verzichtet und diese stattdessen bei Bedarf stets frisch synthetisiert.

Anschließend erfolgte eine analytische Charakterisierung der synthetisierten Referenzsubstanzen mittels DC, GPC, GC/FID, GC/MS sowie HPLC/UV. Anhand des chromatographischen Verhaltens bei Verwendung der verschiedenen Analysemethoden sowie insbesondere anhand der Massenspektren konnten Reinheit und Identität der synthetisierten Referenzsubstanzen hinreichend bestätigt werden. Dabei wurden analytische Daten zu Massenspektren und chromatographischen Eigenschaften erarbeitet, die zumindest für die β -, γ - und δ -Tocopherolchinone und -hydrochinone bisher in der Literatur nicht bzw. nur sehr eingeschränkt verfügbar sind.

Die getesteten GC-Methoden erwiesen sich im Hinblick auf die Bestimmung der geringen Konzentrationen an Tocopheroloxidationsprodukten in Humanserumproben wegen der erzielten relativ schlechten Nachweisempfindlichkeit als weitgehend ungeeignet. Daher wurde zunächst

die empfindlichere HPLC/UV-Bestimmung an einer RP-18-Phase für die Messung der Gehalte dieser Substanzen in den Serumextrakten favorisiert. Allerdings werden mit dieser Methode weder β - und γ -TQ noch die verschiedenen Tocopherolhydrochinone voneinander getrennt.

Angesichts der hohen Oxidationsempfindlichkeit der Tocopherolhydrochinone sowie der ungenügenden Trennung in der RP-HPLC wurde beschlossen, auf die gesonderte Bestimmung dieser Substanzen in den Serumproben zu verzichten. Ohnehin kann eine Oxidation der Tocopherolhydrochinone zu den entsprechenden Tocopherolchinonen im Laufe der Probenvorbereitung nur bei Einsatz umfangreicher Präventionsmaßnahmen (Zusatz von Antioxidanzien + anaerobes Arbeiten) verhindert werden. Weiterhin ist eine gesonderte Bestimmung von Tocopherolhydrochinonen vermutlich nur in frischen Proben aussagekräftig, da mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist, dass bei längerer Lagerung der Proben - wie im Fall der Surveyproben - bereits eine (zumindest teilweise) Oxidation zu den entsprechenden Chinonen erfolgt. Daher erschien es im vorliegenden Fall sinnvoller, eine Oxidation der Tocopherolhydrochinone im Zuge der Probenvorbereitung in Kauf zu nehmen und die beiden Substanzgruppen als Summenparameter in Form der Tocopherolchinone zu erfassen.

Mit dem Ziel der Steigerung der Sensitivität und Selektivität der RP-HPLC-Bestimmung wurden neben dem UV-Detektor weitere Detektoren wie der Fluoreszenz-Detektor und ein amperometrischer elektrochemischer Detektor getestet. Da die Tocopherolchinone weder eine native Fluoreszenz zeigen noch im oxidativen Modus des elektrochemischen Detektors bestimmbar sind, war hierzu der Einsatz einer Nachsäulenderivatisierung erforderlich. So wurde einerseits die Verwendung einer Zink-Reduktionssäule getestet, deren Einsatz in Kombination mit elektrochemischer Detektion bereits von anderen Autoren beschrieben wurde [123,249], andererseits wurde mit der Verwendung eines Photoreaktors eine völlig neue Herangehensweise zur Derivatisierung der Tocopherolchinone getestet. Mit beiden Methoden wurden erfolgreich Produkte erzeugt, die sich sowohl mittels Fluoreszenz- als auch elektrochemischer Detektion empfindlich nachweisen ließen. Insgesamt erwies sich jedoch die Kombination der Fluoreszenzdetektion mit der Nachsäulenderivatisierung über den Photoreaktor als günstigste Variante. Bei Verwendung dieser Methode wird die Spezifität der Bestimmung im Vergleich zur UV-Detektion deutlich erhöht. Dies erweist sich besonders bei der Messung von Serumextrakten als wertvoll, da die Bestimmung deutlich weniger durch Matrixinterferenzen beeinträchtigt wird.

Zur Isolierung der Tocopherolchinone aus Humanserumproben wurde anschließend eine Probenvorbereitungsmethode erarbeitet. Diese beinhaltet eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der Serumlipide mit Hexan nach vorheriger Proteinfällung mit Methanol. Anschließend erfolgt eine säulenchromatographische Reinigung des Extraktes an einer kleinen Kieselgelsäule mit einem zweistufigen Hexan/Diethylether-Gradienten. Auf diese Weise wird ein Extrakt mit wesentlich reduzierter Matrixbelastung erhalten.

Für die α -TQ-Bestimmung in Serumproben wurden mit dieser Methode ausgezeichnete Wiederfindungsraten von $99 \pm 5\%$ und eine gute Reproduzierbarkeit erzielt. Demgegenüber erwiesen

sich die Wiederfindungsraten für die anderen Tocopherolchinone mit $62 \pm 8\%$ für γ -TQ und weniger als 25% für β - und δ -TQ als unbefriedigend. Anhand verschiedener Experimente zur Verbesserung der Extraktionseffizienz und Wiederfindungsraten wurde die Erkenntnis gewonnen, dass es sich hierbei vermutlich um einen durch eine Reaktion der Tocopherolchinone mit der Serummatrix verursachten Effekt handelt. So erfolgt bei den am chinoiden Ring nicht vollständig methylierten β -, γ - und δ -Tocopherolchinonen wahrscheinlich eine Bildung von Addukten mit Verbindungen wie Glutathion oder Proteinen, die nucleophile SH-Gruppen enthalten. Daher können diese Tocopherolchinone nur noch partiell als freie Verbindungen erfasst werden. Dass γ - und δ -TQ tatsächlich solche Addukte bilden können, wurde von Cornwell et al. [34] durch eine Synthese der entsprechenden Glutathion-Addukte gezeigt. Angesichts des begrenzten Zeitrahmens für die vorliegende Arbeit musste eine weitere Untersuchung dieses Sachverhaltes unterbleiben. Auf eine Bestimmung von β -, γ - und δ -TQ in den Serumproben wurde daher verzichtet. Da auch die entsprechenden Tocopherole nur in wesentlich geringeren Konzentrationen als das α -Tocopherol im Serum vorkommen, sind die Serumkonzentrationen von β -, γ - und δ -TQ vermutlich ohnehin so gering, dass eine sichere Quantifizierung mit der entwickelten Bestimmungsmethode nicht möglich wäre.

Für die α -TQ-Bestimmung zeigte die entwickelte Methode dagegen neben guten Wiederfindungsraten auch eine gute Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit. Weiterhin beweist sie trotz des verhältnismäßig hohen Arbeitsaufwandes für die Probenaufarbeitung Potenzial für eine Anwendung in der Routineanalytik. Dies wurde durch die erfolgreiche Anwendung der Methode zur α -TQ-Bestimmung in einer größeren Zahl von Serumproben demonstriert (s.u.). Die Serumextrakte sind durch die säulenchromatographische Reinigung ausreichend sauber, um eine rasche Kontamination der Trennsäule zu vermeiden. Allerdings ist nach häufiger Injektion von Serumextrakten ein langsames Ansteigen der Retentionszeiten zu beobachten, dem aber durch gelegentliches Spülen des Systems mit einem Methanol-Isopropanol-Gemisch (1+1, v/v) begegnet werden kann. Die Tatsache, dass solche Probleme bereits bei der Injektion säulenchromatographisch gereinigter Lipidextrakte auftraten, zeigt deutlich, dass bei der Injektion ungereinigter Gesamtlipidextrakte, wie von einigen Arbeitsgruppen praktiziert [149,167,214], binnen kurzer Zeit eine erhebliche Kontamination der Trennsäule zu erwarten ist bzw. zumindest ein sehr häufiger Wechsel der Vorsäule erforderlich sein sollte.

Die entwickelte Bestimmungsmethode, bestehend aus der zweistufigen Probenvorbereitungsprozedur und der RP-HPLC-Messung mit Fluoreszenz-Detektion und Nachsäulenderivatisierung über einen Photoreaktor, wurde im Anschluss zur Bestimmung des α -TQ-Gehaltes in einer Stichprobe von Seren des BGS 98 eingesetzt. Die Probandenauswahl erfolgte dabei als ~10% Zufallsstichprobe aus der Gruppe von Personen, in deren Serum zuvor auch eine Tocopherolanalytik erfolgt war. Somit wurden 32 Seren von Personen untersucht, die im detaillierten Medikamentenfragebogen des Surveys angegeben hatten, innerhalb der letzten sieben Tage vor der Untersuchung Vitamin-E-haltige Präparate eingenommen zu haben („Nehmer“) sowie

65 Seren einer Kontrollgruppe von Personen, die innerhalb dieses Zeitraumes keine Medikamente eingenommen hatten („Nichtnehmer“).

Die Ergebnisse dieser Messungen wurden im Abschnitt 6.2 bereits ausführlich diskutiert. Der Mittelwert der α -TQ-Konzentration lag im Serum der Nehmer bei etwa 173 $\mu\text{g/l}$ (Wertebereich: 127,8 – 856,5 $\mu\text{g/l}$), während im Serum der Nichtnehmer mit im Mittel 135 $\mu\text{g/l}$ (Wertebereich: 106,7 – 602,9 $\mu\text{g/l}$) etwas geringere Werte gemessen wurden. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße und der großen Streuung der ermittelten Werte erreichen diese Unterschiede jedoch keine statistische Signifikanz (vgl. Tabelle 20, S.87).

Als wesentlicher Einflussfaktor für die α -TQ-Konzentration im Serum erwiesen sich erwartungsgemäß die α -Tocopherol-Gehalte in den Proben. Die Analyse der Daten ergibt eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem α -TQ- und dem α -Tocopherol-Gehalt, d.h. mit steigendem α -Tocopherol-Gehalt werden auch höhere Werte für den α -TQ-Gehalt gemessen.

Zahlreiche weitere Einflussfaktoren sind denkbar, konnten jedoch aufgrund der kleinen Stichprobengröße sowie des Studiendesigns nur in begrenztem Umfang untersucht werden. Zur Betrachtung solcher Faktoren ist es aufgrund der festgestellten Abhängigkeit von den α -Tocopherol-Gehalten sinnvoll, die α -TQ-Konzentration des Serums auf den α -Tocopherol-Gehalt zu normieren, d.h., den α -TQ/ α -Toc-Quotienten (in %) zu errechnen. Dieser Quotient kann als Ausdruck für den Grad der erfolgten α -Tocopherol-Oxidation im jeweiligen Serum angesehen werden. Er wurde von mehreren Arbeitsgruppen als Marker für oxidativen Stress, also ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidanzien zu Gunsten der Prooxidanzien, vorgeschlagen [162,149,98,57]. Von diesen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass unter Bedingungen, die nachweislich mit oxidativem Stress assoziiert sind, ein erhöhter α -TQ/ α -Toc-Quotient nachzuweisen ist (vgl. Abschnitt 2.3.2).

Bei Berechnung des α -TQ/ α -Toc-Quotienten für die untersuchten Proben des BGS 98 entfallen bei Betrachtung des Mittelwertes (0,72% vs. 0,74%) oder Medians (0,63% vs. 0,62%) die Unterschiede zwischen Nehmern und Nichtnehmern nahezu völlig (vgl. Abbildung 24, S. 89). Somit ist anhand dieser Parameter kein unmittelbarer Einfluss der α -Tocopherol-Supplementation auf den Grad der α -Tocopherol-Oxidation im Serum zu erkennen. Eine genauere Betrachtung der Daten, insbesondere der Extremwerte, lässt jedoch Spielraum für weitere Interpretationen. So wurde beispielsweise der niedrigste Wert des α -TQ/ α -Toc-Quotienten (0,17%) bei einem gesunden Vitamin-E-Nehmer gemessen, bei dem es sich gleichzeitig um die Person mit dem höchsten Serum- α -Tocopherol-Gehalt (42,79 mg/l) der Stichprobe handelt. Im Gegensatz dazu wurde bei einem zweiten Probanden, dessen α -Tocopherol-Konzentration im Serum mit 42,78 mg/l nahezu identisch hoch ist, der höchste α -TQ-Gehalt im Serum (856,5 $\mu\text{g/l}$) und der zweithöchste α -TQ/ α -Toc-Quotient (2,0%) ermittelt. Bei diesem Probanden handelt es sich um den einzigen insulinpflichtigen Diabetiker der Stichprobe, der zusätzlich unter Bluthochdruck und koronaren Herzerkrankungen leidet. Sowohl Diabetes mellitus als auch

koronare Herzerkrankungen zählen zu den Erkrankungen, bei denen ein Zusammenhang mit oxidativem Stress vermutet wird.

Bei Betrachtung der ermittelten α -TQ/ α -Toc-Quotienten und der Prävalenz von verschiedenen Krankheiten bei den Probanden der TQ-Stichprobe lässt sich trotz der kleinen Stichprobengröße bereits ein Zusammenhang zwischen dem α -TQ/ α -Toc-Quotienten und der Prävalenz von koronaren Herzerkrankungen feststellen. So ist bei den Probanden, deren α -TQ/ α -Toc-Quotient im obersten Quintil der für die Stichprobe ermittelten Werte liegt, die Prävalenz von koronaren Herzkrankheiten im Vergleich zum Rest der Stichprobe signifikant erhöht (vgl. Abbildung 25, S.91 und Tabelle 21, S.92). Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass bei diesen Erkrankungen oxidativer Stress eine Rolle spielt.

Koronare Herzerkrankungen zählen zu den Krankheiten, für die sich in großen epidemiologischen Studien Hinweise auf eine Verringerung des Erkrankungsrisikos bei erhöhter Vitamin-E-Zufuhr ergaben [183,202]. Da durch diese Studien Hoffnungen in Bezug auf positive Wirkungen einer α -Tocopherol-Supplementation auch im Zusammenhang mit bereits manifestierten koronaren Herzerkrankungen geweckt wurden, und auch die Werbung für Vitamin-E-Produkte dies suggeriert, ist die Zahl der Vitamin-E-Anwender unter den erkrankten Personen besonders hoch. Auch im vorliegenden Fall sind 3 der 4 erkrankten Personen mit niedrigem α -TQ/ α -Toc-Quotienten (1.-4.Quartil) und 4 der 5 Erkrankten mit hohem α -TQ/ α -Toc-Quotienten (5. Quintil) Vitamin-E-Nehmer. Der hohe α -TQ/ α -Toc-Quotient bei den vier herzkranken Vitamin-E-Nehmern des 5. Quintils deutet darauf hin, dass zumindest diese Personen auf die Vitamin-E-Einnahme nicht wie erwartet mit einer deutlichen Reduktion an oxidativem Stress reagieren. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. So könnten beispielsweise geringe Gehalte an Ko-Antioxidanzien im Serum dieser Personen dafür verantwortlich sein und sogar prooxidative Wirkungen der α -Tocopherol-Supplementation sind in diesem Zusammenhang denkbar.

Interessant wäre daher die Bestimmung der Gehalte an entsprechenden Ko-Antioxidanzien, wie z.B. Vitamin C und eventuell auch β -Carotin oder Ubichinol sowie allgemein eine Untersuchung von Zusammenhängen zwischen dem α -Tocopherol-Gehalt, dem α -TQ-Gehalt und dem α -TQ/ α -Toc-Quotienten sowie den Konzentrationen an weiteren Antioxidanzien im Serum. Wie im Abschnitt 2.1.3.1 erläutert, wirken die verschiedenen biologischen Antioxidanzien beim Schutz vor oxidativem Stress zusammen und es wird vermutet, dass synergistische Wirkungsmechanismen existieren. Da ein erhöhter α -TQ/ α -Toc-Quotient vermutlich ein Zeichen für oxidativen Stress ist, wäre eine inverse Korrelation zwischen diesem Quotienten und den Gehalten an Ko-Antioxidanzien im Serum zu erwarten. Dies gilt besonders unter dem Aspekt, dass der synergistische Wirkungsmechanismus der Ko-Antioxidanzien vermutlich auf dem Recycling des bei der Tocopherol-Oxidation primär entstehenden Tocopheroxyl-Radikals beruht, wodurch eine irreversible Oxidation des α -Tocopherols zu nichtradikalischen Folgeprodukten, wie z.B. dem α -TQ, verhindert wird (vgl. Abschnitt 2.3). Die Ermittlung entsprechen-

der Parameter war jedoch weder Bestandteil der im Rahmen des Surveys durchgeführten Laboranalysen noch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hier ergeben sich interessante Anhaltspunkte für fortführende Untersuchungen.

Wie ausführlich im Abschnitt 6.2.4 diskutiert, sind weitere Einflussfaktoren für die α -TQ-Konzentrationen bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Seren des BGS 98 vermutlich der Transport der Proben vom Untersuchungsort zum Zentrallabor des RKI sowie die mehrjährige Lagerperiode bei -35 bis -40°C bis zur Untersuchung der Proben. So wurde beim Vergleich der α -TQ-Gehalte der Surveyseren mit denen einer Kontrollgruppe frischer Seren ($n = 14$) deutlich, dass die α -TQ-Gehalte und die α -TQ/ α -Toc-Quotienten in den Surveyproben signifikant höher liegen als bei den frischen Proben (vgl. Tabelle 22, S. 93). Dabei muss die Tatsache, dass sich die Wertebereiche für die α -TQ-Konzentrationen in den frischen Proben und den Surveyseren nicht überschneiden, als Hinweis auf eine partielle α -Tocopherol-Oxidation während Lagerung oder Transport der Surveyseren gewertet werden. Allerdings liegen der in den frischen Seren bestimmte Maximalgehalt von $61,5 \mu\text{g/l}$ und der in den Surveyseren gemessene Minimalgehalt von $62,3 \mu\text{g/l}$ nicht weit auseinander, so dass das Ausmaß der erfolgten Oxidation möglicherweise recht gering ist. Dafür spricht auch die bei Lagerversuchen mit frischen Proben bei einer Lagertemperatur von -35°C festgestellte gute Lagerstabilität, die allerdings nur über einen Zeitraum von 6-7 Monaten getestet werden konnte. Die deutlich größere Streuung der gemessenen α -TQ-Konzentrationen bzw. der α -TQ/ α -Toc-Quotienten in den Surveyseren ist in Anbetracht der wesentlich heterogeneren Stichprobe der Surveyseren verständlich. Weiterhin zeigt ein Vergleich mit den wenigen bisher publizierten Literaturdaten zu α -TQ-Gehalten bzw. α -TQ/ α -Toc-Quotienten in Humanserum- bzw. Humanplasma-Proben, dass sich die in den Surveyproben gemessenen Werte im Wesentlichen innerhalb eines plausiblen Bereiches bewegen. Auch der festgestellte physiologisch einleuchtende Zusammenhang zwischen dem α -TQ/ α -Toc-Quotienten und der Prävalenz von koronaren Herzerkrankungen deutet darauf hin, dass die gemessenen Werte in den Surveyproben Aussagekraft besitzen.

Trotzdem wäre im Hinblick auf weitergehende Untersuchungen zum Thema Tocopherol-oxidationsprodukte - beispielsweise im Rahmen eines zukünftigen Surveys - anzuraten, den Einfluss der Transportbedingungen auf den α -TQ-Gehalt der Proben gezielt zu testen sowie die Messung des α -TQ-Gehaltes spätestens innerhalb von sechs Monaten nach der Probenahme durchzuführen. Weiterhin könnte untersucht werden, ob vielleicht eine α -TQ-Bestimmung aus dem Plasma vorteilhafter ist, da aufgrund der Bedingungen bei der Serumgewinnung die Gefahr der Bildung von α -TQ als Artefakt der Probengewinnung erhöht ist. So ist bei der Serumgewinnung ein etwa 30-minütiges Stehenlassen der Blutprobe bei Raumtemperatur zum Ablauf der Spontangerinnung erforderlich, bevor das Serum durch Zentrifugation gewonnen wird. Demgegenüber kann die Zentrifugation zur Plasmagewinnung sofort erfolgen, so dass die Probe schneller gekühlt werden kann. Außerdem wäre es sinnvoll, über einen eventuellen

direkten Zusatz an Antioxidanzien zur Probe nachzudenken.

Um eine weitergehende Interpretation der Messergebnisse für die Tocopherol- und α -TQ-Gehalte bzw. den α -TQ/ α -Toc-Quotienten zu ermöglichen, wäre neben einer Bestimmung von weiteren Antioxidanzien im Serum, wie z.B. Vitamin C oder β -Carotin (s.o.), auch eine Bestimmung des Fettsäurespektrums der Serumlipide von Interesse, da mehrfach ungesättigte Fettsäuren bevorzugte Angriffspunkte der Lipid-Peroxidation sind.

Bezüglich der Messmethode wäre vor allem eine Steigerung der Messempfindlichkeit wünschenswert. Zwar wurde mit der RP-HPLC/Fluoreszenz-Methode unter Verwendung des Photoreaktors zur Nachsäulenderivatisierung ein innovatives und relativ spezifisches Messverfahren entwickelt, das eine zuverlässige Quantifizierung der α -TQ-Gehalte in einem Probenvolumen von 500 μ l gestattet. Speziell im Hinblick auf eine eventuelle zukünftige Untersuchung von Surveyproben wäre jedoch eine Reduktion des benötigten Probenvolumens wünschenswert, da in der Regel nur wenige Milliliter Serum zur Verfügung stehen, aus denen viele verschiedene Bestimmungen erfolgen sollen. Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Messergebnisse für Serumextrakte, die stets deutlich oberhalb der Bestimmungsgrenze des Verfahrens lagen, erscheint zwar eine zukünftige Reduktion des eingesetzten Probenvolumens auf etwa 300-400 μ l gerechtfertigt, erstrebenswert wäre jedoch ein Volumen von etwa 100 μ l. Möglicherweise könnte eine Steigerung der Messempfindlichkeit, wie auch der Spezifität, bei Einsatz einer HPLC/MS-MS-Kopplung erreicht werden. Vielversprechende Resultate in dieser Hinsicht wurden von Mottier et al. [146] kürzlich mit einer RP-HPLC/ESI-MS-MS-Kopplung erzielt, bei der die Nachweisgrenzen im unteren pg-Bereich lagen und für die α -TQ-Bestimmung ein Plasmavolumen von 100 μ l ausreichend war.

Weiterhin ließe sich bei Verwendung einer HPLC/MS- oder HPLC/MS-MS-Methode bei Auswertung substanzspezifischer Ionenspuren vermutlich auch das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Blindwertproblem umgehen. Aufgrund der höheren Spezifität der Messung könnte außerdem die Identifizierung und Quantifizierung des α -TQ-Peaks in den Serumextrakten mit größerer Sicherheit als bei der HPLC/Fluoreszenz-Methode erfolgen. Eine Verwendung der HPLC/MS würde sich auch für Untersuchungen zu weiteren Tocopheroloxidaionsprodukten wie z.B. den Tocopherol-Dimeren und -Trimeren anbieten, auf deren Bestimmung in der vorliegenden Arbeit wegen der fehlenden GC-Tauglichkeit dieser Substanzen und fehlender Kontrollmöglichkeiten¹ bezüglich der Identität der Verbindungen verzichtet werden musste.

Neben der Methodenentwicklung zur Bestimmung der Tocopheroloxidaionsprodukte im Serum und der α -TQ-Bestimmung in einer Auswahl von Surveyproben erfolgte auch eine Bestimmung der α -, β -, γ - und δ -Tocopherole in einer relativ großen Unterstichprobe des BGS 98. Diese umfasste sämtliche Personen, die in einem detaillierten Arzneimittel-Fragebogen angegeben

¹ fehlende Ausstattung des Labors mit Methoden zur Strukturaufklärung

hatten, in den letzten sieben Tagen vor der Untersuchung Vitamin-E-haltige Präparate eingenommen zu haben („Nehmer“). Als Kontrollgruppe wurden 690 Personen untersucht, die in diesem Zeitraum keinerlei Medikamente eingenommen hatten („Nichtnehmer“). Da nicht von allen in der Stichprobe ausgewählten Probanden ausreichend Serum zur Verfügung stand, wurden insgesamt 933 Personen untersucht, 302 Nehmer und 631 Nichtnehmer.

Diese Probandenauswahl ermöglicht interessante Vergleiche zwischen den Nehmern und Nichtnehmern. So sind bei Auswertung der Serumgehalte an α -, β -, γ - und δ -Tocopherol signifikante Unterschiede erkennbar. Während die Nehmer wesentlich höhere Gehalte an α -Tocopherol im Serum aufweisen, sind die β - und γ -Tocopherol-Konzentrationen im Vergleich zu den Nichtnehmern deutlich reduziert. Der höhere α -Tocopherol-Gehalt im Serum der Nehmer ist dadurch zu erklären, dass die eingenommenen Vitamin-E-Präparate in der Regel ausschließlich α -Tocopherol enthalten. Bei der gleichzeitigen Reduktion der Gehalte an β - und γ -Tocopherol im Serum der Nehmer handelt es sich um eine bereits länger bekannte Nebenwirkung der α -Tocopherol-Supplementation [72,8], über deren Folgen in den letzten Jahren vermehrt diskutiert wurde [160,29,92]. So deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass auch γ -Tocopherol wichtige physiologische Funktionen erfüllt und sich dem α -Tocopherol beispielsweise beim Schutz vor reaktiven Stickstoffoxiden wie Peroxynitrit oder NO_2 [32,29] oder im Zusammenhang mit entzündungshemmenden Wirkungen [91] als überlegen erweist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich der bereits im Zeitraum von 1984 und 1991 festgestellte Trend einer ständigen Zunahme der α -Tocopherol-Serum-Konzentrationen sowohl bei den Nehmern als auch den Nichtnehmern fortsetzt. Im Vergleich zu den in den Seren der Nehmer und Nichtnehmer gemessenen Mittelwerten der α -Tocopherol-Konzentrationen im ersten Survey (1984-1986) haben sich die Mittelwerte beim BGS 98 mehr als verdoppelt.

Generell ist dieser Trend sicherlich positiv zu beurteilen, da er als Indikator einer zunehmend besseren Vitamin-E-Versorgung der Bevölkerung anzusehen ist. Demgegenüber hat eine Berechnung der durchschnittlichen täglichen Vitamin-E-Zufuhr im Rahmen des Ernährungssurveys beim BGS 98¹ ergeben, dass die Vitamin-E-Zufuhr über die Ernährung bei 60-70% der Männer und Frauen nicht die Referenzwerte für die empfohlene Vitamin-E-Zufuhr (im Mittel 13 mg RRR- α -Tocopherol, abhängig von Alter und Geschlecht) erreicht [10]. Diese Daten wurden auf Basis einer detaillierten Ernährungsbefragung und der Berechnung der Vitamin-E-Zufuhr anhand der Angaben des Bundeslebensmittelschlüssels (BLS) [40] ermittelt. Selbst unter den Vitamin-E-Nehmern erreichen danach nur etwa 43% der Männer und 50% der Frauen die Referenzwerte (bzw. auch deutlich höhere Werte) durch die kombinierte Zufuhr von Vitamin E aus der Nahrung und den Supplementen.

Dagegen ergibt eine Beurteilung der Vitamin-E-Versorgung auf Basis der α -Tocopherol-Mess-

¹ Unterstichprobe Ernährungssurvey, 4030 Probanden

werte in den untersuchten Serumproben des BGS 98 ein völlig anderes Bild. So wurden bei keinem der untersuchten Probanden α -Tocopherol-Serumkonzentrationen von weniger als 5 mg/l (11,6 μ mol/l) gemessen, die auf die Gefahr eines Vitamin-E-Mangels hinweisen; eine Aussage, die auch bei Betrachtung der lipidstandardisierten Variable α -Tocopherol/Cholesterin¹ ihre Gültigkeit behält. Stattdessen wurden bei 87,4% der untersuchten Personen lipidstandardisierte α -Tocopherol-Konzentrationen von mehr als 5,2 μ mol/mmol (α -Tocopherol/Cholesterin) ermittelt. Bei dieser Konzentration handelt es sich um einen von Gey [61,62] vorgeschlagenen Schwellenwert für eine „optimale“ Konzentration von α -Tocopherol im Serum (bzw. Plasma) in Bezug auf die Minimierung des Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs. Er beruht auf der Auswertung der Ergebnisse mehrerer epidemiologischer Studien, die Hinweise darauf lieferten, dass ein α -Tocopherol/Cholesterin-Quotient von über 5,2 μ mol/mmol mit einem geringeren Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs assoziiert ist.

Um solche „optimalen“ Serumkonzentrationen zu erreichen, ist nach Schätzungen von Traber und Sies [222] eine tägliche Zufuhr von 15-30 mg α -Tocopherol erforderlich. Da bei der Berechnung der Vitamin-E-Zufuhr der Surveyteilnehmer anhand der Angaben zur Ernährung, unter Verwendung der Daten des BLS, für einen hohen Anteil der Surveyteilnehmer eine deutlich geringere Zufuhr ermittelt wurde (s.o.), ist davon auszugehen, dass die im BLS aufgeführten Vitamin-E-Gehalte der Lebensmittel zu gering sind. Dies könnte auf die zunehmende Verwendung von α -Tocopherol als Zusatzstoff in Lebensmitteln sowie auf den Verzehr vitaminangereicherter Lebensmittel zurückzuführen sein.

Eine Betrachtung der ermittelten α -Tocopherol/Cholesterin-Quotienten bei den untersuchten Serumproben des BGS 98 zeigt, dass der Anteil von Personen, bei denen der Schwellenwert von 5,2 μ mol/mmol (s.o.) überschritten ist, bei den Tocopherol-Nehmern geringfügig höher ist als bei den Nichtnehmern (90,1% vs. 86,1%). Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (χ^2 -Test), so dass auf Basis der vorhandenen Daten in dieser Beziehung kein signifikanter Nutzen der α -Tocopherol-Supplementation sichtbar ist. Inwieweit zukünftige Forschungsergebnisse die Vorschläge von Gey [62] bezüglich der „optimalen“ Serumkonzentrationen an α -Tocopherol und weiteren Antioxidanzien (β -Carotin, Vitamin C) bestätigen oder widerlegen, bleibt allerdings abzuwarten.

Wegen der möglichen Risiken und unerwünschten Nebenwirkungen einer hochdosierten Vitamin-E-Einnahme (vgl. Abschnitt 6.1.4) sollte diese vorzugsweise auf Personen begrenzt sein, bei denen die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sie tatsächlich davon profitieren können. Dies einzuschätzen ist jedoch auf der Grundlage des bisherigen Kenntnisstands zum Vitamin E und seinen physiologischen Wirkungen nur eingeschränkt möglich, so dass in dieser Beziehung noch erheblicher Forschungsbedarf besteht.

¹ α -Tocopherol/Cholesterin < 2,2 μ mol/mmol

Die Konzentrationen von α -TQ im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten/-geweben, sowie besonders der α -TQ/ α -Tocopherol-Quotient als Ausdruck für den Grad der in vivo erfolgenden irreversiblen α -Tocopherol-Oxidation, gehören zu den Biomarkern, die möglicherweise zur Abschätzung des tatsächlich vorliegenden Ausmaßes an oxidativem Stress in vivo herangezogen werden können. Eine Bestimmung dieser Parameter könnte sich daher in Zukunft als wertvolles Hilfsmittel zur Beurteilung der Notwendigkeit und zur Kontrolle des Erfolges einer hochdosierten Supplementation von Vitamin E oder weiteren Antioxidanzien erweisen.

Literaturverzeichnis

- [1] **Abidi, S.L., Mounts, T.L.**, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols, *J Chromatogr A*, 782 (1997) 25-32.
- [2] **Abidi, S.L.**, Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants, *J Chromatogr A*, 881 (2000) 197-216.
- [3] **Abudu, N., Miller, J.J., Attaelmannan, M., Levinson, S.S.**, Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E, *Clin Chim Acta*, 339 (2004) 11-25.
- [4] **Al-Malaika, S., Issenhuth, S.**, The antioxidant role of vitamin E in polymers. IV. Reaction products of DL- α -tocopherol with lead dioxide and with polyolefins, *Polymer*, 42 (2001) 2915-2939.
- [5] **Aparicio, J.M., Belanger-Quintana, A., Suarez, L., Mayo, D., Benitez, J., Diaz, M., Escobar, H.**, Ataxia with isolated vitamin E deficiency: case report and review of the literature, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 33 (2001) 206-210.
- [6] **Arita, M., Sato, Y., Miyata, A., Tanabe, T., Takahashi, E., Kayden, H.J., Arai, H., Inoue, K.**, Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization, *Biochem J*, 306 (Pt 2) (1995) 437-443.
- [7] **Azzi, A., Ricciarelli, R., Zingg, J.M.**, Non-antioxidant molecular functions of α -tocopherol (vitamin E), *FEBS Lett*, 519 (2002) 8-10.
- [8] **Baker, H., Handelman, G.J., Short, S., Machlin, L.J., Bhagavan, H.N., Dratz, E.A., Frank, O.**, Comparison of plasma alpha and gamma tocopherol levels following chronic oral administration of either all-rac-alpha-tocopheryl acetate or RRR-alpha-tocopheryl acetate in normal adult male subjects, *Am J Clin Nutr*, 43 (1986) 382-387.
- [9] **Behrens, W.A., Madere, R.**, Alpha- and gamma-tocopherol concentrations in human serum, *J Am Coll Nutr*, 5 (1986) 91-96.
- [10] **Beitz, R., Mensink, G.B., Fischer, B., Thamm, M.**, Vitamins - dietary intake and intake from dietary supplements in Germany, *Eur J Clin Nutr*, 56 (2002) 539-545.
- [11] **Bellach, B.-M., Knopf, H., Thefeld, W.**, Der Bundes-Gesundheitssurvey 1997/98, *Gesundheitswesen*, 60 (1998) S59-S68.
- [12] **Bendich, A., Machlin, L.J.**, The Safety of Oral Intake of Vitamin E: Data from Clinical Studies from 1986 to 1991. In Packer, L., Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, 411-416.
- [13] **Bieri, J.G., Tolliver, T.J.**, On the occurrence of α -tocopherolquinone in rat tissue, *Lipids*, 16 (1981) 777-779.
- [14] **Binder, H.J., Herting, D.C., Hurst, V., Finch, S.C., Spiro, H.M.**, Tocopherol deficiency in man, *N Engl J Med*, 273 (1965) 1289-1297.
- [15] **Bindoli, A., Valente, M., Cavallini, L.**, Inhibition of lipid peroxidation by α -tocopherolquinone and α -tocopherolhydroquinone, *Biochem Int*, 10 (1985) 753-761.
- [16] **Birringer, M., Drogan, D., Brigelius-Flohe, R.**, Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain ω -oxidation and consecutive β -oxidation, *Free Radic Biol Med*, 31 (2001) 226-232.
- [17] **Boaz, M., Smetana, S., Weinstein, T., Matas, Z., Gafer, U., Iaina, A., Knecht, A., Weissgarten, Y., Brunner, D., Fainaru, M., Green, M.S.**, Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial, *Lancet*, 356 (2000) 1213-1218.
- [18] **Boguth, W., Sernetz, M.**, Über die Reaktion von α -Tocopherol mit 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl: II. Trennung der Reaktionsprodukte durch Gelfiltration auf methyliertem Dextrangel Sephadex LH-20, *Int Z Vitaminforsch*, 38 (1968) 175-181.
- [19] **Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G.**, Vitamin E: function and metabolism, *Faseb J*, 13 (1999) 1145-1155.
- [20] **Brigelius-Flohe, R., Kelly, F.J., Salonen, J.T., Neuzil, J., Zingg, J.M., Azzi, A.**, The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research, *Am J Clin Nutr*, 76 (2002) 703-716.
- [21] **Brigelius-Flohe, R.**, Vitamin E and drug metabolism, *Biochem Biophys Res Commun*, 305 (2003) 737-740.
- [22] **Castella, H.**, [Trial treatment of hypertension with a new hypotensive drug (trimethyl-tetramethyl-hexadecanone-olbenzoquinone or tocopherylquinone)], *Praxis*, 50 (1961) 989-991.

- [23] **Catignani, G.L.**, An α -tocopherol binding protein in rat liver cytoplasm, *Biochem Biophys Res Commun*, 67 (1975) 66-72.
- [24] **Catignani, G.L., Bieri, J.G.**, Rat liver α -tocopherol binding protein, *Biochim Biophys Acta*, 497 (1977) 349-357.
- [25] **Chepda, T., Cadau, M., Lassabliere, F., Reynaud, E., Perier, C., Frey, J., Chamson, A.**, Synergy between ascorbate and alpha-tocopherol on fibroblasts in culture, *Life Sci*, 69 (2001) 1587-1596.
- [26] **Chiku, S., Hamamura, K., Nakamura, T.**, Novel urinary metabolite of d- δ -tocopherol in rats, *J Lipid Res*, 25 (1984) 40-48.
- [27] **Chow, C.K., Draper, H.H., Csallany, A.S., Chiu, M.**, The metabolism of C-14- α -Tocopheryl Quinone and C-14- α -Tocopheryl Hydroquinone, *Lipids*, 2 (1967) 390-396.
- [28] **Chow, C.K.**, On the formation and measurement of α -tocopherolquinone and α -tocopherolhydroquinone in rat tissues [letter], *Nutr Rev*, 41 (1983) 98-99.
- [29] **Christen, S., Woodall, A.A., Shigenaga, M.K., Southwell-Keely, P.T., Duncan, M.W., Ames, B.N.**, γ -tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: physiological implications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 3217-3222.
- [30] **Cillard, J., Gobaille, J., Cillard, P.**, Separation of three dimers of α -tocopherol by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr*, 347 (1985) 434-437.
- [31] **Clauß, G., Finze, F.-R., Partzsch, L.**, *Statistik: Für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner*, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt / Main, 3. überarb. und erw. Aufl., 1999.
- [32] **Cooney, R.V., Franke, A.A., Harwood, P.J., Hatch-Pigott, V., Custer, L.J., Mordan, L.J.**, γ -tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to α -tocopherol, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 1771-1775.
- [33] **Cooney, R.V., Harwood, P.J., Franke, A.A., Narala, K., Sundstrom, A.K., Berggren, P.O., Mordan, L.J.**, Products of γ -tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells, *Free Radic Biol Med*, 19 (1995) 259-269.
- [34] **Cornwell, D.G., Jones, K.H., Jiang, Z., Lantry, L.E., Southwell-Keely, P., Kohar, I., Thornton, D.E.**, Cytotoxicity of tocopherols and their quinones in drug-sensitive and multidrug-resistant leukemia cells, *Lipids*, 33 (1998) 295-301.
- [35] **Cornwell, D.G., Williams, M.V., Wani, A.A., Wani, G., Shen, E., Jones, K.H.**, Mutagenicity of tocopheryl quinones: evolutionary advantage of selective accumulation of dietary alpha-tocopherol, *Nutr Cancer*, 43 (2002) 111-118.
- [36] **Cornwell, D.G., Kim, S., Mazzer, P.A., Jones, K.H., Hatcher, P.G.**, Electrophile tocopheryl quinones in apoptosis and mutagenesis: thermochemolysis of thiol adducts with proteins and in cells, *Lipids*, 38 (2003) 973-979.
- [37] **Csallany, A.S., Draper, H.H., Shah, S.N.**, Conversion of d- α -Tocopherol-C¹⁴ to Tocopheryl-p-Quinone in Vivo, *Arch Biochem Biophys*, 98 (1962) 142-145.
- [38] **Csallany, A.S., Ha, Y.L.**, α -Tocopherol oxidation mediated by superoxide anion (O₂⁻). I. Reactions in aprotic and protic conditions, *Lipids*, 27 (1992) 195-200.
- [39] **De Leenheer, A.P., Lambert, W.E., Nelis, H.J.** (Hrsg.), *Chromatographic Science Series, Vol. 60, Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2. Aufl., 1992.
- [40] **Dehne, L.I., Klemm, C., Henseler, G., Hermann-Kunz, E.**, The German Food Code and Nutrient Data Base (BLS II.2), *Eur J Epidemiol*, 15 (1999) 355-359.
- [41] **Desai, I.D.**, Assay Methods. In Machlin, L.J. (Hrsg.), *Vitamin E - a comprehensive treatise*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1980, 67-98.
- [42] **Determann, H., Walter, I.**, Source of aromatic affinity to "Sephadex" dextran gels, *Nature*, 219 (1968) 604-605.
- [43] **d'Ischia, M., Novellino, L.**, Nitric oxide-induced oxidation of α -tocopherol, *Bioorg Med Chem*, 4 (1996) 1747-1753.
- [44] **Doba, T., Burton, G.W., Ingold, K.U.**, Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes, *Biochim Biophys Acta*, 835 (1985) 298-303.

- [45] **Dompert, W.U., Beringer, H.**, Dünnschicht- und Gaschromatographie von Tocopherolen, *Fette Seifen Anstrichmittel*, 78 (1976) 108-111.
- [46] **Dowd, P., Zheng, Z.B.**, On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995) 8171-8175.
- [47] **Draper, H.H., Csallany, A.S., Shah, S.N.**, Isolation and synthesis of a new metabolite of α -tocopherol, *Biochim Biophys Acta*, 59 (1962) 527-529.
- [48] **Draper, H.H., Csallany, A.S., Chiu, M.**, Isolation of a trimer of α -tocopherol from mammalian liver, *Lipids*, 2 (1967) 47-54.
- [49] **Draper, H.H.**, Interrelationships of vitamin E with other nutrients. In Packer, L., Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, 53-61.
- [50] **Dutta, A., Dutta, S.K.**, Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review, *J Am Coll Nutr*, 22 (2003) 258-268.
- [51] The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group., *N Engl J Med*, 330 (1994) 1029-1035.
- [52] **Elmadfa, I., Bosse, W.** (Hrsg.), *Vitamin E - Eigenschaften, Wirkungsweise und therapeutische Bedeutung*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1985.
- [53] **Evans, M., Bishop, K.S.**, On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction., *Science*, 56 (1922) 650-651.
- [54] **Faustman, C., Liebler, D.C., Burr, J.A.**, α -tocopherol oxidation in beef and in bovine muscle microsomes, *J Agric Food Chem*, 47 (1999) 1396-1399.
- [55] **Fontana, L., Peschle, C., Rengo, F.**, [Treatment of essential hypertension with tocopherylquinone], *Clin Ter*, 37 (1966) 437-446.
- [56] **Freedman, J.E., Keaney, J.F., Jr.**, Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity, *J Nutr*, 131 (2001) 374S-377S.
- [57] **Frey, B., Johnen, W., Haupt, R., Kern, H., Rustow, B., Kox, W.J., Schlame, M.**, Bioactive oxidized lipids in the plasma of cardiac surgical intensive care patients, *Shock*, 18 (2002) 14-17.
- [58] **Funk, W.H.**, *Statistische Methoden in der Wasseranalytik - Begriffe, Strategien, Anwendungen*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985.
- [59] **Galli, F., Lee, R., Dunster, C., Kelly, F.J.**, Gas chromatography mass spectrometry analysis of carboxyethyl-hydroxychroman metabolites of α - and γ -tocopherol in human plasma, *Free Radic Biol Med*, 32 (2002) 333-340.
- [60] **Gautier, J., Holzhauser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B., Turesky, R.J.**, Oxidative damage and stress response from ochratoxin a exposure in rats, *Free Radic Biol Med*, 30 (2001) 1089-1098.
- [61] **Gey, K.F.**, Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease, *Br Med Bull*, 49 (1993) 679-699.
- [62] **Gey, K.F.**, Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: Threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk, *J Nut Biochem*, 6 (1995) 206-236.
- [63] **Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C.**, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Radic Biol Med*, 29 (2000) 1106-1114.
- [64] **GISSI-Prevenzione Investigators**, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico, *Lancet*, 354 (1999) 447-455.
- [65] **Gottstein, T., Grosch, W.**, Model study of different antioxidant properties of α - and γ -tocopherol in fats, *Fat Sci Technol*, 92 (1990) 139-144.
- [66] **Ha, K.H., Igarashi, O.**, The oxidation products from two kinds of tocopherols co-existing in autoxidation system of methyl linoleate, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 36 (1990) 411-421.
- [67] **Ha, Y.L., Csallany, A.S.**, Separation of α -tocopherol and its oxidation products by high performance liquid chromatography, *Lipids*, 23 (1988) 359-361.

- [68] **Ha, Y.L., Csallany, A.S.**, α -Tocopherol oxidation mediated by superoxide anion (O_2^-). II. Identification of the stable alpha-tocopherol oxidation products, *Lipids*, 27 (1992) 201-205.
- [69] **Halpner, A.D., Handelman, G.J., Harris, J.M., Belmont, C.A., Blumberg, J.B.**, Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes, *Arch Biochem Biophys*, 359 (1998) 305-309.
- [70] **Ham, A.J., Liebler, D.C.**, Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria, *Biochemistry*, 34 (1995) 5754-5761.
- [71] **Ham, A.J., Liebler, D.C.**, Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation, *Arch Biochem Biophys*, 339 (1997) 157-164.
- [72] **Handelman, G.J., Machlin, L.J., Fitch, K., Weiter, J.J., Dratz, E.A.**, Oral alpha-tocopherol supplements decrease plasma gamma-tocopherol levels in humans, *J Nutr*, 115 (1985) 807-813.
- [73] **Hayashi, T., Kanetoshi, A., Nakamura, M., Tamura, M., Shirahama, H.**, Reduction of α -tocopherolquinone to α -tocopherolhydroquinone in rat hepatocytes, *Biochem Pharmacol*, 44 (1992) 489-493.
- [74] **Helzlsouer, K.J., Huang, H.Y., Alberg, A.J., Hoffman, S., Burke, A., Norkus, E.P., Morris, J.S., Comstock, G.W.**, Association between α -tocopherol, γ -tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer, *J Natl Cancer Inst*, 92 (2000) 2018-2023.
- [75] **Herrera, E., Barbas, C.**, Vitamin E: action, metabolism and perspectives, *J Physiol Biochem*, 57 (2001) 43-56.
- [76] **Himmelfarb, J., Kane, J., McMonagle, E., Zaltas, E., Bobzin, S., Boddupalli, S., Phinney, S., Miller, G.**, Alpha and gamma tocopherol metabolism in healthy subjects and patients with end-stage renal disease, *Kidney Int*, 64 (2003) 978-991.
- [77] **Hoffmann-La Roche AG, Urban & Schwarzenberg** (Hrsg.), *Roche Lexikon Medizin*, Urban & Schwarzenberg, München, 4. neubearb. u. erw. Aufl., 1998.
- [78] **Hogg, N., Joseph, J., Kalyanaraman, B.**, The oxidation of α -tocopherol and trolox by peroxyxynitrite, *Arch Biochem Biophys*, 314 (1994) 153-158.
- [79] **Horwitt, M.K.**, Critique of the requirement for vitamin E, *Am J Clin Nutr*, 73 (2001) 1003-1005.
- [80] **Hosomi, A., Arita, M., Sato, Y., Kiyose, C., Ueda, T., Igarashi, O., Arai, H., Inoue, K.**, Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs, *FEBS Lett*, 409 (1997) 105-108.
- [81] **Howell, S.K., Wang, Y.M.**, Quantitation of physiological α -tocopherol, metabolites, and related compounds by reversed-phase high-performance chromatography, *J Chromatogr*, 227 (1982) 174-180.
- [82] <http://www.rki.de/GBE/GBE.HTM>
- [83] **Hübschmann, H.-J.**, *Handbuch der GC-MS: Grundlagen und Anwendung*, VCH, Weinheim, 1996.
- [84] **Hughes, P., Tove, S.**, Synthesis of α -tocopherolquinone by the rat and its reduction by mitochondria, *J Biol Chem*, 255 (1980) 7095-7097.
- [85] **Infante, J.P., Huszagh, V.A.**, On the molecular etiology of decreased arachidonic (20:4n-6), docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders, *Mol Cell Biochem*, 168 (1997) 101-115.
- [86] **Infante, J.P.**, A function for the vitamin E metabolite α -tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases, *FEBS Lett*, 446 (1999) 1-5.
- [87] **Issidorides, A.**, The antioxygenic synergism of various acids with α -tocopherol, *J Am Chem Soc*, 73 (1951) 5146-5148.
- [88] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendations 1981, *Eur J Biochem*, 123 (1982) 473-475.
- [89] **Jain, S.K., Wise, R., Bocchini, J.J., Jr.**, Vitamin E and vitamin E-quinone levels in red blood cells and plasma of newborn infants and their mothers, *J Am Coll Nutr*, 15 (1996) 44-48.

- [90] **Jialal, I., Traber, M., Devaraj, S.**, Is there a vitamin E paradox?, *Curr Opin Lipidol*, 12 (2001) 49-53.
- [91] **Jiang, Q., Elson-Schwab, I., Courtemanche, C., Ames, B.N.**, γ -tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 11494-11499.
- [92] **Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M.K., Ames, B.N.**, γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention, *Am J Clin Nutr*, 74 (2001) 714-722.
- [93] **Jiang, Q., Ames, B.N.**, γ -tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats, *Faseb J*, 17 (2003) 816-822.
- [94] **Jones, K.H., Liu, J.J., Roehm, J.S., Eckel, J.J., Eckel, T.T., Stickrath, C.R., Triola, C.A., Jiang, Z., Bartoli, G.M., Cornwell, D.G.**, γ -tocopheryl quinone stimulates apoptosis in drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells, *Lipids*, 37 (2002) 173-184.
- [95] **Joustra, M., Soderqvist, B., Fischer, L.**, Gel filtration in organic solvents, *J Chromatogr*, 28 (1967) 21-25.
- [96] **Kagan, V., Serbinova, E., Packer, L.**, Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling, *Biochem Biophys Res Commun*, 169 (1990) 851-857.
- [97] **Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A.**, The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids*, 31 (1996) 671-701.
- [98] **Kanazawa, H., Miyata, C., Nagata, Y., Urano, S., Matsushima, Y.**, Determination of α -tocopherol and α -tocopherylquinone in rat tissues and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48 (2000) 1462-1466.
- [99] **Kaneko, K., Kiyose, C., Ueda, T., Ichikawa, H., Igarashi, O.**, Studies of the metabolism of α -tocopherol stereoisomers in rats using [5-methyl- ^{14}C]SRR- and RRR- α -tocopherol, *J Lipid Res*, 41 (2000) 357-367.
- [100] **Kappus, H., Diplock, A.T.**, Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report, *Free Radic Biol Med*, 13 (1992) 55-74.
- [101] **Kasperek, S.**, Chemistry of tocopherols and tocotrienols. In Machlin, L.J. (Hrsg.), *Vitamin E: A Comprehensive Treatise*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1980, 7-65.
- [102] **Kawase, T., Kato, S., Lieber, C.S.**, Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding, *Hepatology*, 10 (1989) 815-821.
- [103] **Kayden, H.J., Traber, M.G.**, Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans, *J Lipid Res*, 34 (1993) 343-358.
- [104] **Kiyose, C., Kaneko, K., Muramatsu, R., Ueda, T., Igarashi, O.**, Simultaneous determination of RRR- and SRR- α -tocopherols and their quinones in rat plasma and tissues by using chiral high-performance liquid chromatography, *Lipids*, 34 (1999) 415-422.
- [105] **Kiyose, C., Saito, H., Ueda, T., Igarashi, O.**, Simultaneous determination of α -, γ -tocopherol and their quinones in rats plasma and tissues using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47 (2001) 102-107.
- [106] **Knopf, H., Melchert, H.-U.**, *Bundes-Gesundheitssurvey: Arzneimittelgebrauch*, Robert-Koch-Institut, Berlin, 2003.
- [107] **Kofler, M., Sommer, P.F., Bolliger, H.R., Schmidli, B., Vecchi, M.**, Physicochemical Properties and Assay of the Tocopherols, *Vitamins and Hormones*, 20 (1962) 407-439.
- [108] **Kohar, I., Baca, M., Suarna, C., Stocker, R., Southwell-Keely, P.T.**, Is α -tocopherol a reservoir for α -tocopheryl hydroquinone?, *Free Radic Biol Med*, 19 (1995) 197-207.
- [109] **Komoda, M., Harada, I.**, A dimeric oxidation product of γ -tocopherol in soybean oil, *J Am Oil Chem Soc*, 46 (1969) 18-22.
- [110] **Kontush, A., Spranger, T., Reich, A., Baum, K., Beisiegel, U.**, Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of α -carotene and γ -tocopherol, *Atherosclerosis*, 144 (1999) 117-122.
- [111] **Kramer, K.A., Liebler, D.C.**, UVB induced photooxidation of vitamin E, *Chem Res Toxicol*, 10 (1997) 219-224.
- [112] **Kramer-Stickland, K., Krol, E.S., Liebler, D.C.**, UV-B-Induced photooxidation of vitamin E in mouse skin, *Chem Res Toxicol*, 12 (1999) 187-191.
- [113] **Krol, E.S., Escalante, D.D., Liebler, D.C.**, Mechanisms of dimer and trimer formation from ultraviolet-irradiated α -tocopherol, *Lipids*, 36 (2001) 49-55.

- [114] **Kromidas, S.**, *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2000.
- [115] **Krull, I.S., Selavka, C.M., Lookabaugh, M., Childress, W.R.**, Photochemical derivatizations for improved detection in high performance liquid chromatography, *LC.GC International*, 2 (1989) 28-39.
- [116] **Kuhlenkamp, J., Ronk, M., Yusin, M., Stolz, A., Kaplowitz, N.**, Identification and purification of a human liver cytosolic tocopherol binding protein, *Protein Expr Purif*, 4 (1993) 382-389.
- [117] **Kushi, L.H., Folsom, A.R., Prineas, R.J., Mink, P.J., Wu, Y., Bostick, R.M.**, Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women, *N Engl J Med*, 334 (1996) 1156-1162.
- [118] **Landes, N., Birringer, M., Brigelius-Flohe, R.**, Homologous metabolic and gene activating routes for vitamins E and K, *Mol Aspects Med*, 24 (2003) 337-344.
- [119] **Landes, N., Pfluger, P., Kluth, D., Birringer, M., Ruhl, R., Bol, G.F., Glatt, H., Brigelius-Flohe, R.**, Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor, *Biochem Pharmacol*, 65 (2003) 269-273.
- [120] **Lauridsen, C., Leonard, S.W., Griffin, D.A., Liebler, D.C., McClure, T.D., Traber, M.G.**, Quantitative analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of deuterium-labeled and unlabeled vitamin E in biological samples, *Anal Biochem*, 289 (2001) 89-95.
- [121] **Leedle, R.A., Aust, S.D.**, The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid peroxidation, *Lipids*, 25 (1990) 241-245.
- [122] **Leray, C., Andriamampandry, M., Gutbier, G., Cavadenti, J., Klein-Soyer, C., Gachet, C., Cazenave, J.P.**, Quantitative analysis of vitamin E, cholesterol and phospholipid fatty acids in a single aliquot of human platelets and cultured endothelial cells, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 696 (1997) 33-42.
- [123] **Leray, C., Andriamampandry, M.D., Freund, M., Gachet, C., Cazenave, J.P.**, Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of α -tocopherol oxidation, *J Lipid Res*, 39 (1998) 2099-2105.
- [124] **Liebler, D.C., Baker, P.F., Kaysen, K.L.**, Oxidation of Vitamin E: Evidence for Competing Autoxidation and Peroxyl Radical Trapping Reactions of the Tocopheroxyl Radical, *J Am Chem Soc*, 112 (1990) 6995-7000.
- [125] **Liebler, D.C., Kaysen, K.L., Burr, J.A.**, Peroxyl radical trapping and autoxidation reactions of α -tocopherol in lipid bilayers, *Chem Res Toxicol*, 4 (1991) 89-93.
- [126] **Liebler, D.C., Burr, J.A.**, Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical, *Biochemistry*, 31 (1992) 8278-8284.
- [127] **Liebler, D.C.**, Peroxyl Radical Trapping Reactions of α -Tocopherol in Biomimetic Systems. In Packer, L., Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, 85-95.
- [128] **Liebler, D.C., Burr, J.A.**, Antioxidant stoichiometry and the oxidative fate of vitamin E in peroxyl radical scavenging reactions, *Lipids*, 30 (1995) 789-793.
- [129] **Liebler, D.C., Burr, J.A., Philips, L., Ham, A.J.**, Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products, *Anal Biochem*, 236 (1996) 27-34.
- [130] **Liebler, D.C., Burr, J.A.**, Effects of UV light and tumor promoters on endogenous vitamin E status in mouse skin, *Carcinogenesis*, 21 (2000) 221-225.
- [131] **Lores, M., Cabaleiro, O., Cela, R.**, Post-column photochemical derivatization in high-performance liquid chromatography, *TrAC*, 18 (1999) 392-400.
- [132] **Mackenzie, J.B., Rosenkrantz, H., Ulick, S., Milhorat, A.T.**, The biological activity of α -Tocopherolhydroquinone and α -Tocopherolquinone, *J Biol Chem*, 183 (1950) 655-662.
- [133] **Mackenzie, J.B., Mackenzie, C.G.**, The effect of α -tocopherol, α -tocopherolhydroquinone and their esters in experimental muscular dystrophy in the rat, *J Nutr*, 67 (1959) 223-235.
- [134] **Mackenzie, J.B., Mackenzie, C.G.**, The antisterility activity of α -tocohydroquinone in the female rat, *J Nutr*, 72 (1960) 322-324.
- [135] **Maxwell, S.R.**, Antioxidant vitamin supplements: update of their potential benefits and possible risks, *Drug Saf*, 21 (1999) 253-266.

- [136] **Melchert, H.-U., Rubach, K.**, Untersuchungen über die Oxidation von α -Tocopherol mit Linolsäuremethylester-Hydroperoxiden, *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 3 (1974) 56-59.
- [137] **Melchert, H.-U., Pabel, E.**, The Tocopherol Pattern in Human Serum Is Markedly Influenced by Intake of Vitamin E Drugs - Results of the German National Health Surveys, *JAOCS*, 75 (1998) 213-216.
- [138] **Melchert, H.-U., Pabel, E.**, Quantitative determination of α -, β -, γ - and δ -tocopherols in human serum by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation, *J Chromatogr A*, 896 (2000) 209-215.
- [139] **Melchert, H.-U., Knopf, H., Pabel, E., Braemer-Hauth, M., Du, Y.**, Co- and multimедication in users of ASA and vitamin E drugs in the Federal Republic of Germany. Results of the Federal Health Surveys 1984-1999, *Int J Clin Pharmacol Ther*, 39 (2001) 488-491.
- [140] **Melchert, H.-U., Pollok, D., Pabel, E., Rubach, K., Stan, H.-J.**, Determination of tocopherols, tocopherolquinones and tocopherolhydroquinones by gas chromatography-mass spectrometry and preseparation with lipophilic gel chromatography, *J Chromatogr A*, 976 (2002) 215-220.
- [141] **Mellors, A., Barnes, M.M.**, The distribution and metabolism of alpha-tocopherol in the rat, *Br J Nutr*, 20 (1966) 69-77.
- [142] **Meydani, M.**, Vitamin E, *Lancet*, 345 (1995) 170-175.
- [143] **Meydani, S.N., Hayek, M.G.**, Vitamin E and aging immune response, *Clin Geriatr Med*, 11 (1995) 567-576.
- [144] **Morinobu, T., Yoshikawa, S., Hamamura, K., Tamai, H.**, Measurement of vitamin E metabolites by high-performance liquid chromatography during high-dose administration of α -tocopherol, *Eur J Clin Nutr*, 57 (2003) 410-414.
- [145] **Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.**, Optimal nutrition: vitamin E, *Proc Nutr Soc*, 58 (1999) 459-468.
- [146] **Mottier, P., Gremaud, E., Guy, P.A., Turesky, R.J.**, Comparison of Gas Chromatography - Mass Spectrometry and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Methods to Quantify α -Tocopherol and α -Tocopherolquinone Levels in Human Plasma, *Anal Biochem*, 301 (2002) 128-135.
- [147] **Mukai, K., Itoh, S., Morimoto, H.**, Stopped-flow kinetic study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K, and tocopherolquinone) in solution, *J Biol Chem*, 267 (1992) 22277-22281.
- [148] **Müller-Oerlinghausen, B., Lasek, R., Dүppenbecker, H., Munter, K.-H.** (Hrsg.), *Handbuch der unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen*, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 1999.
- [149] **Murphy, M.E., Kehrер, J.P.**, Simultaneous measurement of tocopherols and tocopheryl quinones in tissue fractions using high-performance liquid chromatography with redox-cycling electrochemical detection, *J Chromatogr*, 421 (1987) 71-82.
- [150] **Murphy, M.E., Kolvenbach, R., Aleksis, M., Hansen, R., Sies, H.**, Antioxidant depletion in aortic crossclamping ischemia: increase of the plasma α -tocopheryl quinone/ α -tocopherol ratio, *Free Radic Biol Med*, 13 (1992) 95-100.
- [151] **Nair, P.P., Sarlos, I., Machiz, J.**, Microquantitative separation of isomeric dimethyl-tocols by gas-liquid chromatography, *Arch Biochem Biophys*, 114 (1966) 488-493.
- [152] **Nakamura, M., Hayashi, T.**, One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions, *J Biochem (Tokyo)*, 115 (1994) 1141-1147.
- [153] **Nelan, D.R., Robeson, C.D.**, The Oxidation Product from α -Tocopherol and Potassium Ferricyanide and Its Reaction with Ascorbic and Hydrochloric Acids, *J Am Chem Soc*, 84 (1962) 2963-2965.
- [154] **Neuzil, J., Thomas, S.R., Stocker, R.**, Requirement for, promotion, or inhibition by α -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation, *Free Radic Biol Med*, 22 (1997) 57-71.
- [155] **Neuzil, J., Witting, P.K., Stocker, R.**, α -tocopheryl hydroquinone is an efficient multifunctional inhibitor of radical-initiated oxidation of low density lipoprotein lipids, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 7885-7890.

- [156] **Neuzil, J., Weber, C., Kontush, A.**, The role of vitamin E in atherogenesis: linking the chemical, biological and clinical aspects of the disease, *Atheroscler*, 157 (2001) 257-283.
- [157] **Nilsson, J.L., Daves, G.D., Jr., Folkers, K.**, New tocopherol dimers, *Acta Chem Scand*, 22 (1968) 200-206.
- [158] **Nilsson, J.L., Daves, G.D., Jr., Folkers, K.**, The oxidative dimerization of α -, β -, γ -, and δ - tocopherols, *Acta Chem Scand*, 22 (1968) 206-218.
- [159] **Niu, X., Zammit, V., Upston, J.M., Dean, R.T., Stocker, R.**, Coexistence of oxidized lipids and α -tocopherol in all lipoprotein density fractions isolated from advanced human atherosclerotic plaques, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (1999) 1708-1718.
- [160] **Öhrvall, M., Sundlöf, G., Vessby, B.**, Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary heart disease patients, *J Intern Med*, 239 (1996) 111-117.
- [161] **Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A.J., Blanco, I., Gil-Martinez, E., van den Berg, H., Thurnham, D., Corridan, B., Chopra, M., Hininger, I.**, A European multicentre, placebo-controlled supplementation study with α -tocopherol, carotene-rich palm oil, lutein or lycopene: analysis of serum responses, *Clin Sci (Lond)*, 102 (2002) 447-456.
- [162] **Pacht, E.R., Kaseki, H., Mohammed, J.R., Cornwell, D.G., Davis, W.B.**, Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers. Influence on alveolar macrophage cytotoxicity, *J Clin Invest*, 77 (1986) 789-796.
- [163] **Packer, J.E., Slater, T.F., Willson, R.L.**, Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature*, 278 (1979) 737-738.
- [164] **Packer, L., Kagan, V.E.**, Vitamin E: The Antioxidant Harvesting Center of Membranes and Lipoproteins. In Packer, L., Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
- [165] **Parker, R.S., Sontag, T.J., Swanson, J.E.**, Cytochrome P4503A-dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin, *Biochem Biophys Res Commun*, 277 (2000) 531-534.
- [166] **Parker, R.S., Swanson, J.E.**, A novel 5'-carboxychroman metabolite of γ -tocopherol secreted by HepG2 cells and excreted in human urine, *Biochem Biophys Res Commun*, 269 (2000) 580-583.
- [167] **Pascoe, G.A., Duda, C.T., Reed, D.J.**, Determination of α -tocopherol and α -tocopherylquinone in small biological samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J Chromatogr*, 414 (1987) 440-448.
- [168] **Plack, P.A., Bieri, J.G.**, Metabolic products of α -tocopherol in the livers of rats given intraperitoneal injections of ^{14}C - α -tocopherol, *Biochim Biophys Acta*, 84 (1964) 729-738.
- [169] **Pokorny, S., Coupek, J., Luan, N.T., Pokorny, J.**, Gel chromatographic separation of unsaponifiable fractions in fats and oils, *J Chromatogr*, 84 (1973) 319-328.
- [170] **Pope, S.A., Burtin, G.E., Clayton, P.T., Madge, D.J., Muller, D.P.**, New synthesis of (+/-)- α -CEHC and its confirmation as a metabolite of α -tocopherol (vitamin E), *Bioorg Med Chem*, 9 (2001) 1337-1343.
- [171] **Pope, S.A., Burtin, G.E., Clayton, P.T., Madge, D.J., Muller, D.P.**, Synthesis and analysis of conjugates of the major vitamin E metabolite, α -CEHC, *Free Radic Biol Med*, 33 (2002) 807-817.
- [172] **Porter, W.L., Levasseur, L.A., Henick, A.S.**, An addition compound of oxidized tocopherol and linoleic acid, *Lipids*, 6 (1971) 1-8.
- [173] **Pruthi, S., Allison, T.G., Hensrud, D.D.**, Vitamin E supplementation in the prevention of coronary heart disease, *Mayo Clin Proc*, 76 (2001) 1131-1136.
- [174] **Radosavac, D., Graf, P., Polidori, M.C., Sies, H., Stahl, W.**, Tocopherol metabolites 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (α -CEHC) and 2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (γ -CEHC) in human serum after a single dose of natural vitamin E, *Eur J Nutr*, 41 (2002) 119-124.
- [175] **Rao, G.H.R., Krick, T., P., White, J., G.**, Preparation, separation and characterization of vitamin E quinone, *J Chromatogr*, 196 (1980) 506-511.
- [176] **Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E., Massaro, E.J.**, Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation, *Life Sci*, 31 (1982) 571-576.

- [177] **Rehlender, B.**, *Qualitative und quantitative Bestimmung von Lipidfraktionen verschiedener ernährungsphysiologisch relevanter Lipoproteine aus Humanserum*, Dissertation, Technische Universität Berlin, 1983
- [178] **Ricciarelli, R., Tasinato, A., Clement, S., Ozer, N.K., Boscoboinik, D., Azzi, A.**, α -Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C α by changing its phosphorylation state, *Biochem J*, 334 (Pt 1) (1998) 243-249.
- [179] **Ricciarelli, R., Zingg, J.M., Azzi, A.**, Vitamin E 80th anniversary: a double life, not only fighting radicals, *IUBMB Life*, 52 (2001) 71-76.
- [180] **Richet, G., Lenoir, J.F.**, [Use of tocopherylquinone in the ambulatory therapy of arterial hypertension], *Presse Med*, 69 (1961) 178-179.
- [181] **Richheimer, S.L., Kent, M.C., Bernart, M.W.**, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a pentafluorophenyl bonded phase for analysis of tocopherols, *J Chromatogr A*, 677 (1994) 75-80.
- [182] **Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Haan, L.d., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., van Zanden, J.J., Woude, H.v.d., Alink, G.M., Koeman, J.H.**, The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ Toxicol Pharmacol*, 11 (2002) 321-333.
- [183] **Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G.A., Willett, W.C.**, Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men, *N Engl J Med*, 328 (1993) 1450-1456.
- [184] **Rote Liste Service GmbH** (Hrsg.), *Rote Liste 2004: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland*, ECV Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 2003.
- [185] **Roxborough, H.E., Burton, G.W., Kelly, F.J.**, Inter- and intra-individual variation in plasma and red blood cell vitamin E after supplementation, *Free Radic Res*, 33 (2000) 437-445.
- [186] **Ruperez, F.J., Martin, D., Herrera, E., Barbas, C.**, Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices, *J Chromatogr A*, 935 (2001) 45-69.
- [187] **Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H., Inoue, K.**, Purification and characterization of the alpha-tocopherol transfer protein from rat liver, *FEBS Lett*, 288 (1991) 41-45.
- [188] **Sattler, W., Mohr, D., Stocker, R.**, Rapid isolation of lipoproteins and assessment of their peroxidation by high-performance liquid chromatography postcolumn chemiluminescence, *Methods Enzymol*, 233 (1994) 469-489.
- [189] **Schudel, P., Mayer, H., Metzger, J., Rüegg, R., Isler, O.**, Die Umkehrung der Konfiguration am Kohlenstoffatom 2 von natürlichem (2 R, 4' R, 8' R)- α -Tocopherol, *Helv chim Acta*, 46 (1963) 333-343.
- [190] **Schuelke, M., Elsner, A., Finckh, B., Kohlschutter, A., Hubner, C., Brigelius-Flohe, R.**, Urinary α -tocopherol metabolites in α -tocopherol transfer protein-deficient patients, *J Lipid Res*, 41 (2000) 1543-1551.
- [191] **Schultz, M., Leist, M., Petrzika, M., Gassmann, B., Brigelius-Flohe, R.**, Novel urinary metabolite of α -tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply?, *Am J Clin Nutr*, 62 (1995) 1527S-1534S.
- [192] **Schwedt, G.**, *Chromatographische Trennmethode: theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*, Thieme, Stuttgart, New York, 3. erw. Aufl., 1994.
- [193] **Sheppard, A.J., Pennington, J.A.T., Weihrauch, J.L.**, Analysis and Distribution of Vitamin E in Vegetable Oils and Foods. In Packer, L., Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, 9-31.
- [194] **Shi, H., Noguchi, N., Niki, E.**, Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and α -tocopherol against lipid peroxidation, *Free Radic Biol Med*, 27 (1999) 334-346.
- [195] **Siegel, D., Bolton, E.M., Burr, J.A., Liebler, D.C., Ross, D.**, The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant, *Mol Pharmacol*, 52 (1997) 300-305.
- [196] **Sies, H.**, Vitamin E in biologischen Systemen: Die Biochemie von Tocopheroxyl-Radikalen und ihre Rolle bei Krankheiten im Menschen. In Schmidt, K., Wildmeister, W. (Hrsg.), *Vitamin E in der modernen Medizin*, MKM Verlagsgesellschaft, Lenggries/Obb., 1993.

- [197] **Sies, H., Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E.**, Scavenging of Singlet Molecular Oxygen by Tocopherols. In Packer, L., Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, 141-152.
- [198] **Simon, E.J., Eisengart, A., Sundheim, L., Milhorat, A.T.**, The metabolism of vitamin E. II. Purification and characterization of urinary metabolites of α -Tocopherol, *J Biol Chem*, 221 (1956) 807-817.
- [199] **Simon, E.J., Gross, C.S., Milhorat, A.T.**, The metabolism of vitamin E. I. The absorption and excretion of d- α -tocopheryl-5-methyl-C14-succinate, *J Biol Chem*, 221 (1956) 797-805.
- [200] **Sontag, T.J., Parker, R.S.**, Cytochrome P450 ω -hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status, *J Biol Chem*, 277 (2002) 25290-25296.
- [201] **Stahl, W., Graf, P., Brigelius-Flohe, R., Wechter, W., Sies, H.**, Quantification of the α - and γ -tocopherol metabolites 2,5,7,8- tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman and 2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman in human serum, *Anal Biochem*, 275 (1999) 254-259.
- [202] **Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B., Willett, W.C.**, Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Disease in Women, *N Engl J Med*, 328 (1993) 1444-1449.
- [203] **Steiner, M.**, Vitamin E, a modifier of platelet function: rationale and use in cardiovascular and cerebrovascular disease, *Nutr Rev*, 57 (1999) 306-309.
- [204] **Stephens, N.G., Parsons, A., Schofield, P.M., Kelly, F., Cheeseman, K., Mitchinson, M.J.**, Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS), *Lancet*, 347 (1996) 781-786.
- [205] **Stocker, A., Baumann, U.**, Supernatant protein factor in complex with RRR- α -tocopherylquinone: A link between oxidized vitamin E and cholesterol biosynthesis, *JMB*, 332 (2003) 759-765.
- [206] **Stöggli, W.M., Huck, C.W., Scherz, H., Popp, M., Bonn, G.K.**, Analysis of Vitamin E in Food and Phytopharmaceutical Preparations by HPLC and HPLC-APCI-MS-MS, *Chromatographia*, 54 (2001) 179-185.
- [207] **Strauch, B.S., Fales, H.M., Pittman, R.C., Avigan, J.**, Dimers and trimers of α -tocopherol: metabolic and synthetic studies, *J Nutr*, 97 (1969) 194-202.
- [208] **Streuli, C.A.**, The effect of solvent change on the separation processes of Sephadex LH-20 modified dextran, *J Chromatogr*, 56 (1971) 225-229.
- [209] **Strohschein, S., Pursch, M., Lubda, D., Albert, K.**, Shape selectivity of C30 phases for RP-HPLC separation of tocopherol isomers and correlation with MAS NMR data from suspended stationary phases, *Anal Chem*, 70 (1998) 13-18.
- [210] **Stump, D.D., Roth, E.F., Jr., Gilbert, H.S.**, Simultaneous determination by high-performance liquid chromatography of tocopherol isomers, α -tocopheryl quinone, and cholesterol in red blood cells and plasma, *J Chromatogr*, 306 (1984) 371-376.
- [211] **Suarna, C., Craig, D.C., Cross, K.J., Southwell-Keely, P.T.**, Oxidations of vitamin E (α -tocopherol) and its model compound 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman. A new dimer, *J Org Chem*, 53 (1988) 1281-1284.
- [212] **Swanson, J.E., Ben, R.N., Burton, G.W., Parker, R.S.**, Urinary excretion of 2,7,8-trimethyl-2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major route of elimination of γ -tocopherol in humans, *J Lipid Res*, 40 (1999) 665-671.
- [213] **Swiss Pharmaceutical Society** (Hrsg.), *Index Nominum: International Drug Directory*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 16. Auflage, 1995, 1236.
- [214] **Takeda, H., Shibuya, T., Yanagawa, K., Kano, H., Takasaki, M.**, Simultaneous determination of α -tocopherol and α -tocopherolquinone by high-performance liquid chromatography and coulometric detection in the redox mode, *J Chromatogr A*, 722 (1996) 287-294.
- [215] **Tasinato, A., Boscoboinik, D., Bartoli, G.M., Maroni, P., Azzi, A.**, d- α -tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995) 12190-12194.
- [216] **Terentis, A.C., Thomas, S.R., Burr, J.A., Liebler, D.C., Stocker, R.**, Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions, *Circ Res*, 90 (2002) 333-339.

- [217] **Thefeld, W., Stolzenberg, H., Bellach, B.-M.**, Bundes-Gesundheitssurvey: Response, Zusammensetzung der Teilnehmer und Non-Responder-Analyse, *Gesundheitswesen*, 61 (1999) S57-S61.
- [218] **Thornton, D.E., Jones, K.H., Jiang, Z., Zhang, H., Liu, G., Cornwell, D.G.**, Antioxidant and cytotoxic tocopheryl quinones in normal and cancer cells, *Free Radic Biol Med*, 18 (1995) 963-976.
- [219] **Thurnham, D.I., Davies, J.A., Crump, B.J., Situnayake, R.D., Davis, M.**, The use of different lipids to express serum tocopherol: lipid ratios for the measurement of vitamin E status, *Ann Clin Biochem*, 23 (Pt 5) (1986) 514-520.
- [220] **Traber, M.G., Burton, G.W., Ingold, K.U., Kayden, H.J.**, RRR- and SRR- α -tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR- α -tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoproteins, *J Lipid Res*, 31 (1990) 675-685.
- [221] **Traber, M.G., Burton, G.W., Hughes, L., Ingold, K.U., Hidaka, H., Malloy, M., Kane, J., Hyams, J., Kayden, H.J.**, Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism, *J Lipid Res*, 33 (1992) 1171-1182.
- [222] **Traber, M.G., Sies, H.**, Vitamin E in humans: demand and delivery, *Annu Rev Nutr*, 16 (1996) 321-347.
- [223] **Traber, M.G.**, Regulation of human plasma vitamin E, *Adv Pharmacol*, 38 (1997) 49-63.
- [224] **Traber, M.G., Elsner, A., Brigelius-Flohe, R.**, Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as α -CEHC in human urine: studies using deuterated α -tocopheryl acetates, *FEBS Lett*, 437 (1998) 145-148.
- [225] **Traber, M.G., Jialal, I.**, Measurement of lipid-soluble vitamins - further adjustment needed?, *Lancet*, 355 (2000) 2013-2014.
- [226] **Upston, J.M., Terentis, A.C., Stocker, R.**, Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement, *Faseb J*, 13 (1999) 977-994.
- [227] **Van Houte, H., De Hoffmann, E., Van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P., Carchon, H., Baes, M.I., Declercq, P.E.**, Oxidative catabolism of α -tocopherol in rat liver microsomes, *Lipids*, 36 (2001) 367-372.
- [228] **Van Pelt, C.K., Haggarty, P., Brenna, J.T.**, Quantitative subfemtomole analysis of α -tocopherol and deuterated isotopomers in plasma using tabletop GC/MS/MS, *Anal Chem*, 70 (1998) 4369-4375.
- [229] **Vatassery, G.T.**, In vitro oxidation of α -tocopherol (vitamin E) in human platelets upon incubation with unsaturated fatty acids, diamide and superoxide, *Biochim Biophys Acta*, 926 (1987) 160-169.
- [230] **Vatassery, G.T., Smith, W.E.**, Determination of α -tocopherolquinone (vitamin E quinone) in human serum, platelets, and red cell membrane samples, *Anal Biochem*, 167 (1987) 411-417.
- [231] **Vatassery, G.T.**, Oxidation of vitamin E in red cell membranes by fatty acids, hydroperoxides and selected oxidants, *Lipids*, 24 (1989) 299-304.
- [232] **Vatassery, G.T., Smith, W.E., Quach, H.T.**, Ascorbic acid, glutathione and synthetic antioxidants prevent the oxidation of vitamin E in platelets, *Lipids*, 24 (1989) 1043-1047.
- [233] **Vatassery, G.T., Smith, W.E., Quach, H.T.**, A liquid chromatographic method for the simultaneous determination of α -tocopherol and tocopherolquinone in human red blood cells and other biological samples where tocopherol is easily oxidized during sample treatment, *Anal Biochem*, 214 (1993) 426-430.
- [234] **Vatassery, G.T.**, Determination of tocopherols and tocopherolquinone in human red blood cell and platelet samples, *Methods Enzymol*, 234 (1994) 327-331.
- [235] **Vatassery, G.T.**, Oxidation of vitamin E, vitamin C, and thiols in rat brain synaptosomes by peroxynitrite, *Biochem Pharmacol*, 52 (1996) 579-586.
- [236] **Verleyen, T., Kamal-Eldin, A., Dobarganes, C., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A.**, Modeling of α -tocopherol loss and oxidation products formed during thermoxidation in triolein and tripalmitin mixtures, *Lipids*, 36 (2001) 719-726.
- [237] **Verleyen, T., Verhe, R., Huyghebaert, A., Dewettinck, K., De Greyt, W.**, Identification of α -tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures, *J Agric Food Chem*, 49 (2001) 1508-1511.

- [238] Vitamin E: BASF verdoppelt Produktion, *Nachrichten aus der Chemie*, 49 (2001) 599.
- [239] **Wang, X., Quinn, P.J.**, Vitamin E and its function in membranes, *Prog Lipid Res*, 38 (1999) 309-336.
- [240] **Wechter, W.J., Kantoci, D., Murray, E.D., Jr., D'Amico, D.C., Jung, M.E., Wang, W.H.**, A new endogenous natriuretic factor: LLU- α , *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 6002-6007.
- [241] **Yamauchi, R., Kato, K., Ueno, Y.**, Formation of trimers of α -tocopherol and its model compound, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol, in autoxidizing methyl linoleate, *Lipids*, 23 (1988) 779-783.
- [242] **Yamauchi, R., Matsui, T., Satake, Y., Kato, K., Ueno, Y.**, Reaction products of α -tocopherol with a free radical initiator, 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile), *Lipids*, 24 (1989) 204-209.
- [243] **Yamauchi, R., Matsui, T., Kato, K., Ueno, Y.**, Reaction Products of γ -Tocopherol with an Alkylperoxyl Radical in Benzene, *Agric Biol Chem*, 54 (1990) 2703-2709.
- [244] **Yamauchi, R., Matsui, T., Miyake, N., Kato, K., Ueno, Y.**, Reaction of δ -Tocopherol with an Alkylperoxyl Radical, *Agric Biol Chem*, 54 (1990) 2993-2999.
- [245] **Yamauchi, R., Miyake, N., Kato, K., Ueno, Y.**, Reaction of α -tocopherol with alkyl and alkylperoxyl radicals of methyl linoleate, *Lipids*, 28 (1993) 201-206.
- [246] **Yamauchi, R., Yagi, Y., Kato, K.**, Oxidation of α -tocopherol during the peroxidation of dilinoleoylphosphatidylcholine in liposomes, *Biosci Biotechnol Biochem*, 60 (1996) 616-620.
- [247] **Yamauchi, R., Yagi, Y., Kato, K.**, Oxidation of alpha-tocopherol during the peroxidation of dilinoleoylphosphatidylcholine in liposomes, *Biosci Biotechnol Biochem*, 60 (1996) 616-620.
- [248] **Yamauchi, R., Goto, K., Kato, K.**, Reaction of α -tocopherol in heated bulk phase in the presence of methyl linoleate (13S)-hydroperoxide or methyl linoleate, *Lipids*, 33 (1998) 77-85.
- [249] **Yamauchi, R., Noro, H., Shimoyamada, M., Kato, K.**, Analysis of vitamin E and its oxidation products by HPLC with electrochemical detection, *Lipids*, 37 (2002) 515-522.
- [250] **Yanagawa, K., Takeda, H., Egashira, T., Sakai, K., Takasaki, M., Matsumiya, T.**, Age-related changes in α -tocopherol dynamics with relation to lipid hydroperoxide content and fluidity of rat erythrocyte membrane, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 54 (1999) B379-383.
- [251] **Yanagawa, K., Takeda, H., Matsumiya, T., Takasaki, M.**, Redox dynamics of α -tocopherol in erythrocyte membranes of elderly patients with asymptomatic primary hyperlipidemia, *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 21 (1999) 195-201.
- [252] **Yoshida, H., Yusin, M., Ren, I., Kuhlenkamp, J., Hirano, T., Stolz, A., Kaplowitz, N.**, Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol, *J Lipid Res*, 33 (1992) 343-350.
- [253] **Yoshikawa, T., Yoshida, N., Manabe, H., Terasawa, Y., Takemura, T., Kondo, M.**, α -Tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells, *Biofactors*, 7 (1998) 15-19.
- [254] **Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., Bosch, J., Sleight, P.**, Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, *N Engl J Med*, 342 (2000) 154-160.

Anhang A:

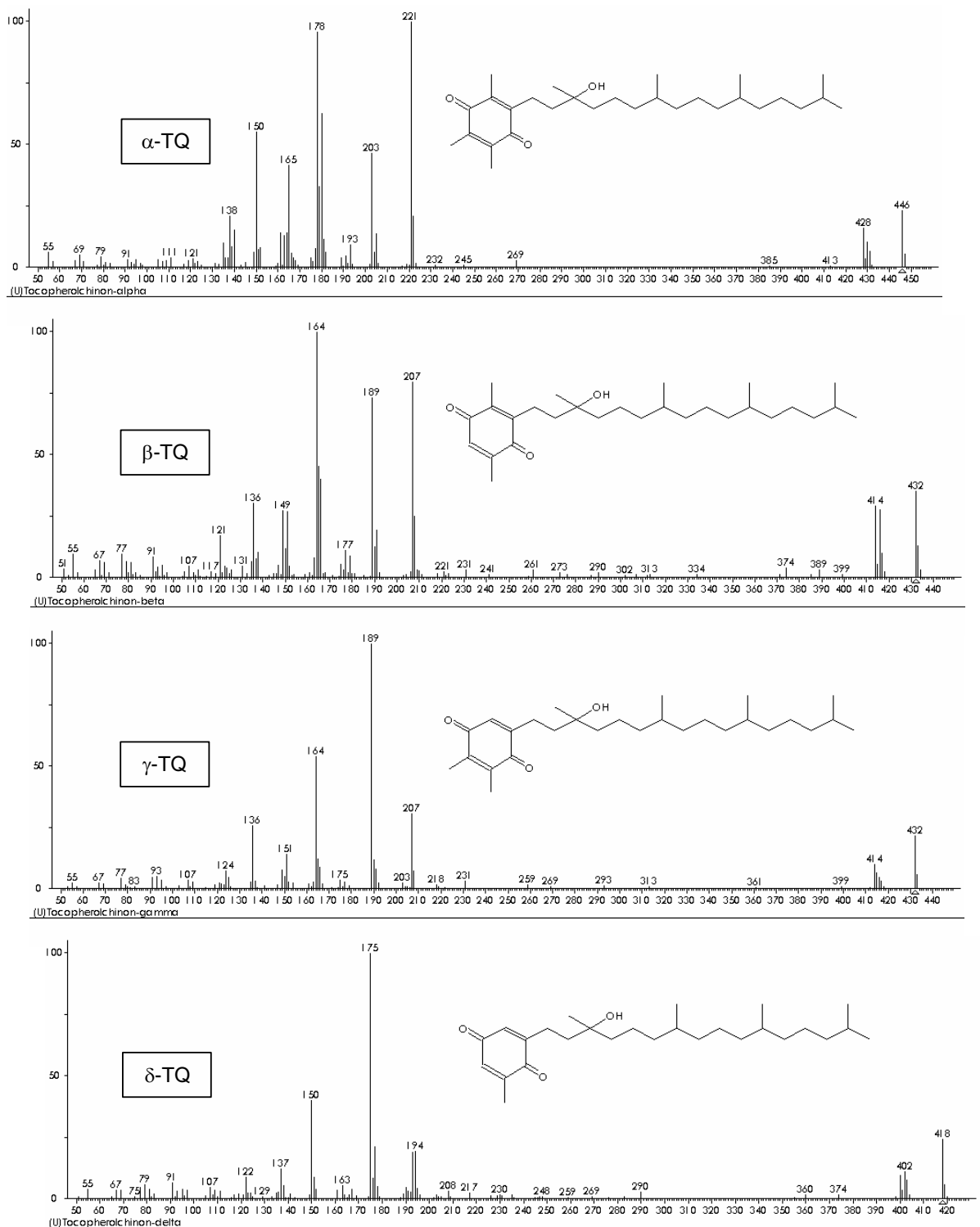
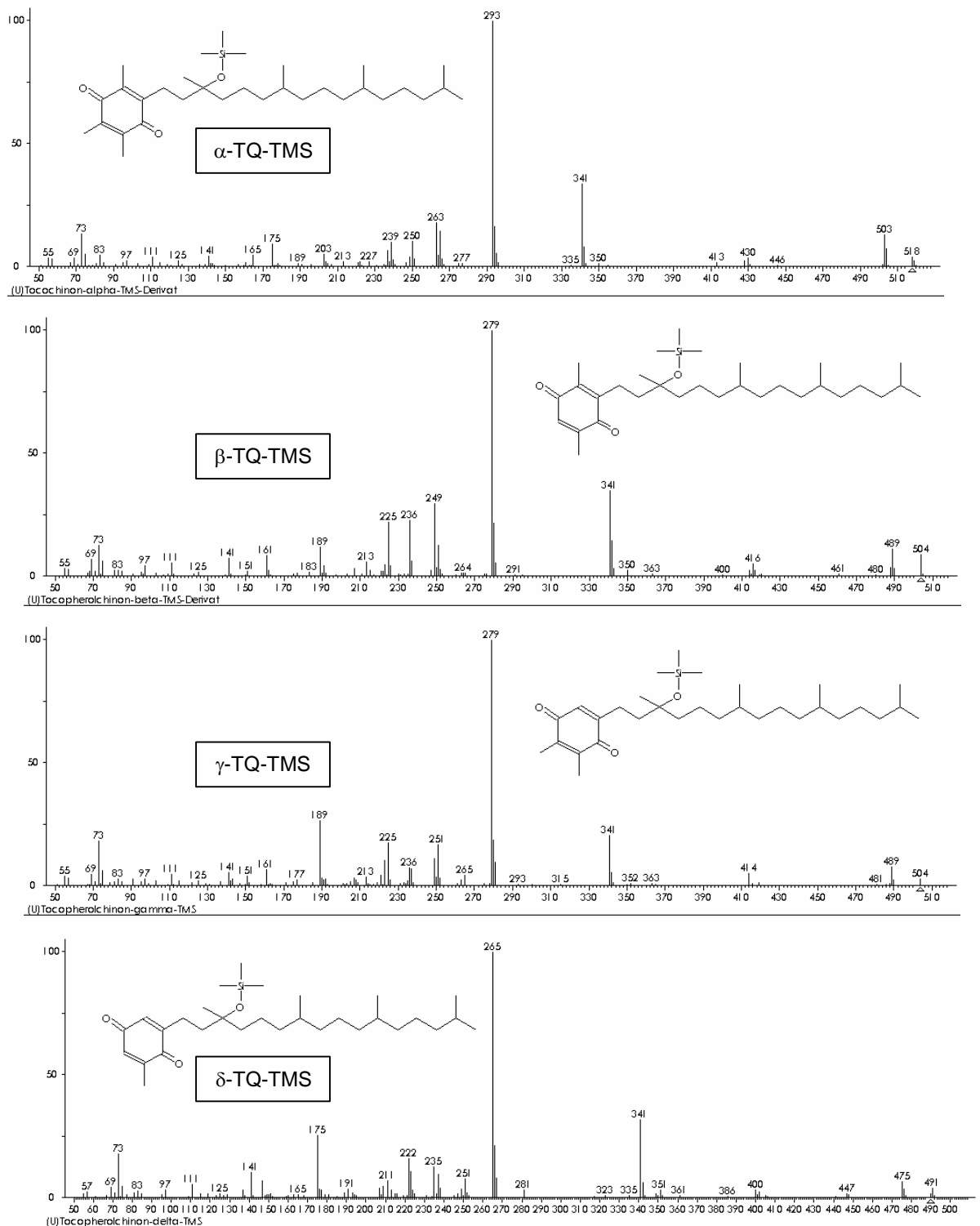
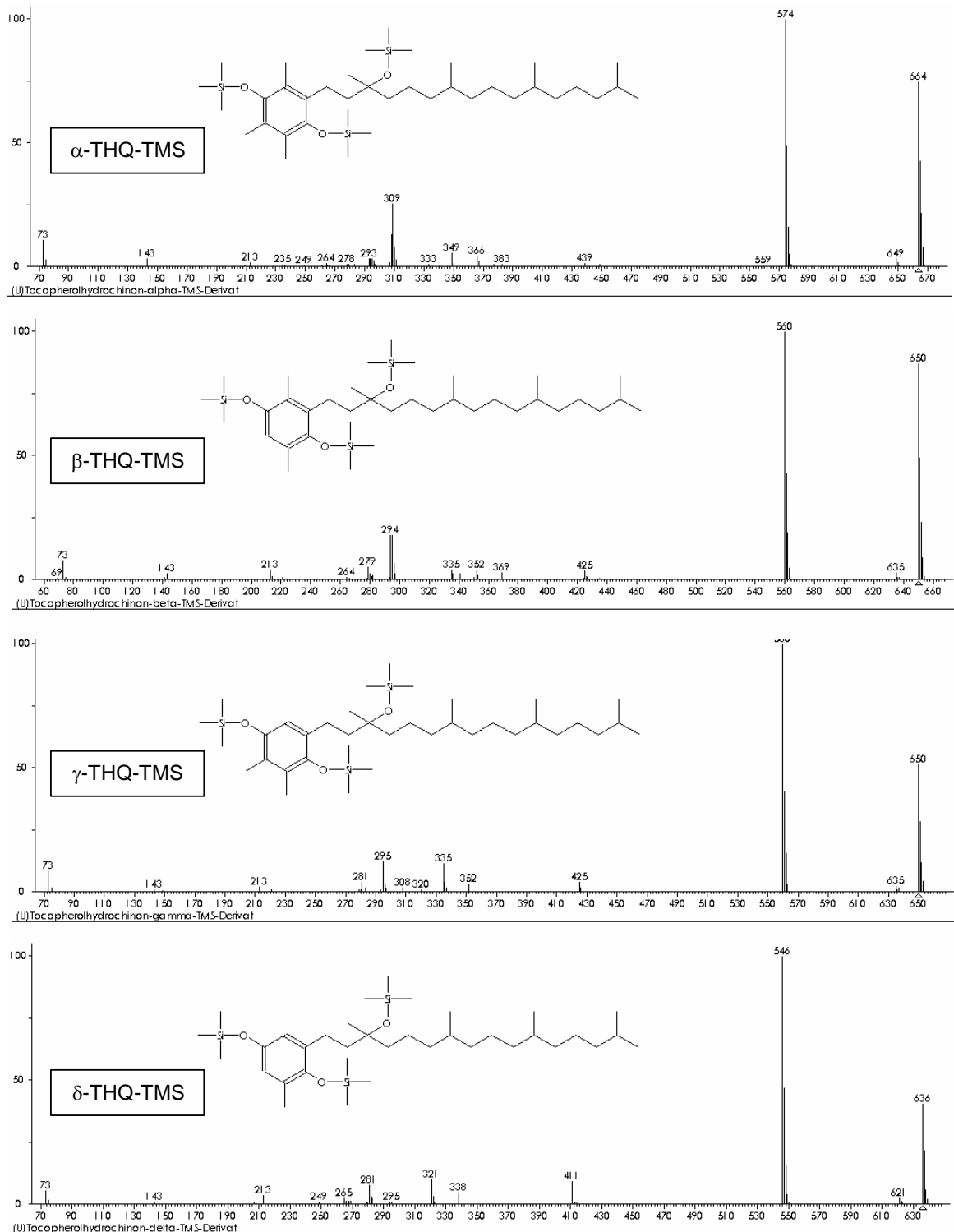
Massenspektren von α -, β -, γ - und δ -TQ, -TQ-TMS und -THQ-TMS

Abbildung A 1: Massenspektren der unterivatisierten Tocopherolchinone

Abbildung A 2: Massenspektren der TMS-Derivate von α -, β -, γ - und δ -Tocopherolchinon

Abbildung A 3: Massenspektren der TMS-Derivate von α -, β -, γ - und δ -Tocopherolhydrochinon

Anhang B: Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die TQ-Bestimmung mittels HPLC/Fluoreszenz mit Nachsäulenderivatisierung (Photoreaktor)

Zugrunde liegende statistische Berechnungsformeln [58]:

Kalibrationsgerade

Es wird eine Kalibrationsgerade der Form:

$$y = a_0 + a_1 x \quad \text{erhalten.}$$

- y Peakfläche (Informationswert)
- a_0 Achsenabschnitt
- a_1 Anstieg
- x Konzentration

Nachweisgrenze XN

Zur Berechnung der Nachweisgrenze werden folgende Gleichungen verwendet:

$$y_c = a_0 + VB \ y(x = 0)$$

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(0 - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$XN = 2 \cdot VB \ x(y = y_c)$$

$$XN = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

- y_c obere Prognoseintervallsgrenze für den Informationswert $y = a_0$ bzw. $x = 0$
- $VB_y(x)$ Höhe des Prognoseintervalls für einen Informationswert y bei der zugehörigen Konzentration x
- s_y Reststandardabweichung
- t Student- t -Faktor
- N Anzahl der Kalibrationspunkte
- \bar{x} mittlere Kalibrationskonzentration
- x_i Konzentration des i -ten Kalibrationsstandards
- $VB_x(y)$ Breite des Prognoseintervalls für eine Konzentration x beim zugehörigen Informationswert y
- \bar{y} Mittelwert der Informationswerte der Kalibrationsstandards

Die Abbildung B 1 zeigt eine graphische Darstellung der beschriebenen Größen.

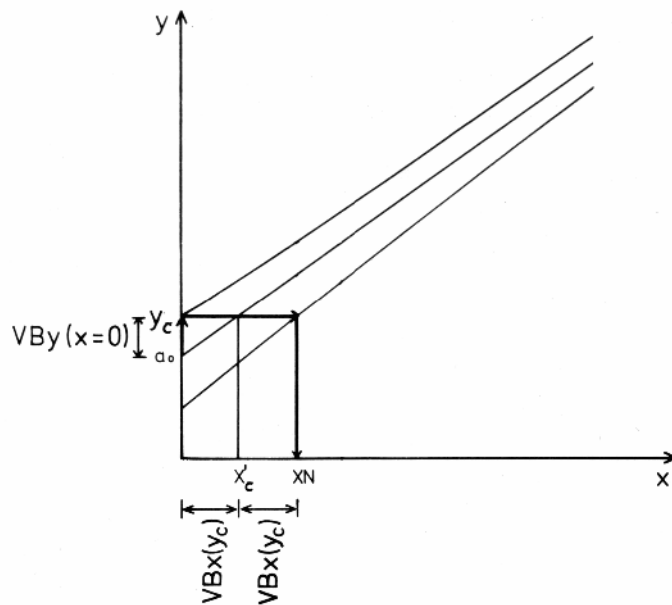


Abbildung B 1: Ermittlung des Hilfswertes y_c und der Nachweisgrenze XN , Quelle: [58]

Bestimmungsgrenze XB

Die Berechnung der Bestimmungsgrenze erfolgt mit Hilfe der folgenden Gleichungen:

$$x_c = 2 \cdot VBx(x=0)$$

$$x_c = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$y_h = a_0 + 2 \cdot VB y(x = x_c)$$

$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$XB = x(y = y_h) + VBx(y = y_h)$$

$$XB = \frac{y_h - a_0}{a_1} + \frac{s_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

x_c Hilfsgröße, ergibt sich aus dem Vertrauensbereich VBx für den Blindwert ($x = 0$)

y_h obere (vertikale) Vertrauensbereichsgrenze für $x = x_c$

Die Abbildung B 2 zeigt eine graphische Darstellung der beschriebenen Größen.

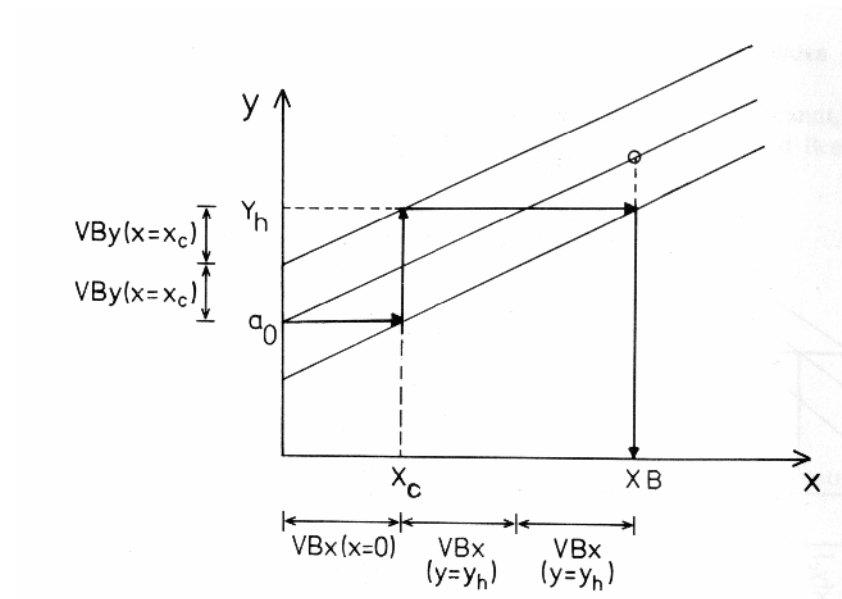


Abbildung B 2: Ermittlung der Hilfswerte x_c und y_h sowie der Bestimmungsgrenze x_B ,

Quelle: [58]

Anhang C:**Übersicht über die α -TQ- und α -, β -, γ - und Tocopherol-Messwerte in der TQ-Stichprobe des BGS 98**

lfd. Nr.	Nehmer	Geschlecht	Alter	α -TQ [μ g/l]	α -Toc [mg/l]	β -Toc [mg/l]	γ -Toc [mg/l]	δ -Toc [mg/l]	α -TQ/ α -Toc [%]
1	ja	männlich	37	74,8	15,70	0,08	0,60	< XN	0,48
2	ja	männlich	75	98,4	18,48	0,17	0,23	< XN	0,53
3	ja	weiblich	37	126,2	15,14	0,06	0,33	0,06	0,83
4	ja	männlich	60	239,8	25,07	0,10	0,31	< XN	0,96
5	ja	männlich	53	129,5	29,19	0,09	0,16	0,04	0,44
6	ja	weiblich	73	147,8	31,90	0,08	0,30	0,04	0,46
7	ja	weiblich	73	217,4	27,78	0,08	0,38	0,05	0,78
8	ja	männlich	69	233,7	28,60	0,16	0,30	0,04	0,82
9	ja	weiblich	34	72,1	11,98	0,12	0,76	0,08	0,60
10	ja	weiblich	24	115,2	24,80	0,24	0,86	0,09	0,46
11	ja	männlich	43	109,7	15,10	0,16	0,79	0,07	0,73
12	ja	weiblich	43	100,8	20,26	0,16	0,86	0,09	0,50
13	ja	männlich	61	194,9	21,27	0,20	0,51	< XN	0,92
14	ja	weiblich	41	183,0	10,85	0,06	0,24	0,07	1,69
15	ja	männlich	68	151,3	21,91	0,24	1,38	0,06	0,69
16	ja	weiblich	47	178,0	36,88	0,11	0,22	0,07	0,48
17	ja	männlich	69	106,4	30,26	0,21	0,54	0,04	0,35
18	ja	weiblich	35	90,8	13,85	0,19	1,06	0,07	0,66
19	ja	männlich	59	97,1	24,04	0,19	0,70	0,06	0,40
20	ja	männlich	26	66,9	8,68	0,07	0,50	0,07	0,77
21	ja	männlich	65	251,7	24,85	0,20	0,86	< XN	1,01
22	ja	männlich	70	332,4	27,33	0,06	0,27	0,06	1,22
23	ja	männlich	48	101,9	10,90	0,17	0,68	0,06	0,93
24	ja	weiblich	75	151,0	27,49	0,06	0,24	< XN	0,55
25	ja	weiblich	61	135,1	32,97	0,11	0,34	0,06	0,41
26	ja	weiblich	36	72,2	42,79	0,15	0,36	0,09	0,17
27	ja	weiblich	50	856,5	42,78	0,07	0,42	0,08	2,00
28	ja	weiblich	55	392,7	38,33	0,27	0,43	0,06	1,02
29	ja	männlich	39	77,4	17,27	0,10	0,49	< XN	0,45
30	ja	männlich	59	74,2	20,72	0,19	0,72	0,05	0,36
31	ja	weiblich	62	256,0	25,58	0,18	0,33	0,07	1,00

lfd. Nr.	Nehmer	Geschlecht	Alter	α -TQ [$\mu\text{g/l}$]	α -Toc [mg/l]	β -Toc [mg/l]	γ -Toc [mg/l]	δ -Toc [mg/l]	α -TQ/ α -Toc [%]
32	ja	weiblich	71	113,4	24,40	0,14	0,16	0,07	0,46
33	nein	weiblich	61	78,4	15,79	0,17	0,93	0,12	0,50
34	nein	weiblich	33	104,2	17,32	0,12	0,34	0,07	0,60
35	nein	weiblich	46	87,6	14,74	0,17	0,97	0,09	0,59
36	nein	männlich	46	137,1	21,55	0,14	1,26	0,08	0,64
37	nein	weiblich	39	102,8	17,58	0,13	0,68	0,05	0,58
38	nein	weiblich	41	69,0	11,92	0,11	0,30	< XN	0,58
39	nein	männlich	28	106,7	19,87	0,15	0,43	< XN	0,54
40	nein	männlich	50	250,3	31,26	0,47	1,62	0,20	0,80
41	nein	männlich	56	115,3	25,82	0,24	1,52	0,06	0,45
42	nein	männlich	37	78,8	18,88	0,24	2,11	0,08	0,42
43	nein	weiblich	46	78,5	13,97	0,23	0,95	0,12	0,56
44	nein	männlich	60	345,0	17,53	0,26	0,62	0,07	1,97
45	nein	männlich	37	140,6	20,44	0,23	1,28	0,08	0,69
46	nein	weiblich	34	84,3	14,83	0,20	0,72	0,06	0,57
47	nein	männlich	70	100,9	27,53	0,31	0,64	0,07	0,37
48	nein	männlich	70	107,3	16,43	0,08	0,18	0,06	0,65
49	nein	weiblich	30	65,5	8,96	0,09	0,42	0,05	0,73
50	nein	weiblich	57	76,4	16,92	0,20	1,59	0,06	0,45
51	nein	männlich	28	65,5	11,90	0,13	0,63	< XN	0,55
52	nein	männlich	46	113,0	16,95	0,14	0,94	0,05	0,67
53	nein	weiblich	35	71,2	15,24	0,22	1,19	0,10	0,47
54	nein	männlich	64	131,5	24,50	0,35	1,40	0,09	0,54
55	nein	weiblich	60	124,7	16,26	0,17	0,96	0,05	0,77
56	nein	männlich	55	76,2	19,53	0,25	1,42	0,04	0,39
57	nein	weiblich	17	62,3	13,26	0,15	0,66	< XN	0,47
58	nein	weiblich	17	66,1	10,44	0,14	0,90	0,04	0,63
59	nein	männlich	32	196,3	23,58	0,28	1,55	0,08	0,83
60	nein	weiblich	57	108,6	14,87	0,19	0,60	0,06	0,73
61	nein	männlich	27	245,5	24,28	0,26	0,57	0,05	1,01
62	nein	männlich	57	73,9	19,47	0,20	0,60	0,08	0,38
63	nein	männlich	29	66,9	12,77	0,15	0,83	0,08	0,52
64	nein	männlich	43	93,7	21,83	0,28	2,09	0,10	0,43
65	nein	weiblich	48	166,9	19,52	0,23	1,07	0,08	0,85

lfd. Nr.	Nehmer	Geschlecht	Alter	α -TQ [$\mu\text{g/l}$]	α -Toc [mg/l]	β -Toc [mg/l]	γ -Toc [mg/l]	δ -Toc [mg/l]	α -TQ/ α -Toc [%]
66	nein	weiblich	46	152,4	23,70	0,22	1,58	0,08	0,64
67	nein	weiblich	36	114,3	17,61	0,21	0,83	0,08	0,65
68	nein	weiblich	69	93,9	20,88	0,25	0,42	0,05	0,45
69	nein	männlich	57	104,4	20,73	0,24	1,57	0,07	0,50
70	nein	weiblich	74	230,8	17,63	0,22	0,77	0,05	1,31
71	nein	männlich	57	93,8	17,01	0,22	0,71	< XN	0,55
72	nein	männlich	40	64,1	20,56	0,19	0,72	0,06	0,31
73	nein	männlich	54	99,6	26,22	0,10	1,70	0,09	0,38
74	nein	weiblich	45	282,0	15,70	0,18	0,64	0,05	1,80
75	nein	männlich	48	130,5	21,65	0,26	1,27	0,08	0,60
76	nein	weiblich	56	602,8	25,78	0,30	0,73	0,07	2,34
77	nein	weiblich	29	66,2	11,32	0,15	0,82	0,09	0,59
78	nein	weiblich	29	270,4	13,79	0,15	0,94	0,08	1,96
79	nein	männlich	43	87,6	17,24	0,22	0,80	0,06	0,51
80	nein	männlich	62	80,3	8,36	0,21	1,12	0,05	0,96
81	nein	weiblich	42	98,9	12,01	0,16	0,91	0,04	0,82
82	nein	männlich	22	89,5	12,23	0,23	1,20	0,04	0,73
83	nein	weiblich	60	137,8	18,64	0,24	1,34	0,06	0,74
84	nein	weiblich	50	125,7	17,01	0,21	0,92	< XN	0,74
85	nein	männlich	54	116,5	18,80	0,30	1,77	0,04	0,62
86	nein	weiblich	64	189,1	21,79	0,25	0,77	0,06	0,87
87	nein	männlich	46	119,8	16,27	0,16	0,51	0,06	0,74
88	nein	weiblich	52	422,1	26,21	0,39	1,36	0,06	1,61
89	nein	weiblich	55	167,7	20,84	0,30	1,54	0,11	0,80
90	nein	männlich	38	210,0	15,10	0,20	1,59	0,15	1,39
91	nein	männlich	23	186,8	17,75	0,20	1,15	0,10	1,05
92	nein	weiblich	24	74,8	16,42	0,16	0,61	0,05	0,46
93	nein	weiblich	74	83,2	22,16	0,26	1,20	0,08	0,38
94	nein	weiblich	69	164,1	12,27	0,24	0,93	< XN	1,34
95	nein	männlich	61	108,2	14,53	0,25	0,73	0,06	0,74
96	nein	männlich	55	133,4	22,78	0,16	0,76	< XN	0,59
97	nein	männlich	34	83,5	26,05	0,28	0,86	< XN	0,32

Tabelle C 1: Übersicht über Alter, Geschlecht und die α -TQ- sowie α -, β -, γ - und Tocopherol-Messwerte sowie den α -TQ/ α -Toc-Quotienten in der TQ-Stichprobe des BGS 98

Lebenslauf

Name: Dagmar Pollok

Geburtsdatum/-Ort: 09.01.1972 in Berlin

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/ 1978 – 08/ 1988 Polytechnische Oberschule in Berlin-Lichtenberg

09/ 1990 – 06/ 1992 Abitur an der Volkshochschule Berlin-Treptow

Berufsausbildung:

09/ 1988 – 04/ 1990 Berufsausbildung zur Chemielaborantin bei der Akademie der Wissenschaften der DDR (AdW)

Studium:

10/ 1993 – 09/ 1999 Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Berlin, Abschluss mit dem Staatsexamen, Teil A

10/ 1995 – 09/ 1996 Auslandsstudium an der University of Strathclyde, Glasgow (Schottland), Abschluss als „Bachelor of Science in Forensic and Analytical Chemistry“

10/ 1999 – 07/ 2000 Ergänzungsstudiengang Lebensmittelchemie (Diplom), Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemikerin

03/ 2000 – 08/ 2000 Praktikum im Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben, Abschluss mit dem Staatsexamen, Teil B

Berufstätigkeit:

05/ 1990 – 12/ 1991 Chemielaborantin bei der AdW

01/ 1992 – 10/ 1993 Chemielaborantin bei der FORGENTA GmbH

12/ 2000 – 11/ 2003 wissenschaftliche Angestellte beim Robert Koch-Institut im Rahmen des RKI-Doktorandenprogramms

01/2004 – 6/2004 freie Mitarbeiterin am Robert Koch-Institut auf Werkvertragsbasis

seit 07/2004 wissenschaftliche Angestellte bei der Institut Kirchhoff Berlin GmbH

Eidstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.