

**Methoden zur Bestimmung der
antioxidativen Kapazität in Bezug auf
einzelne reaktive Sauerstoffspezies
unter besonderer Berücksichtigung
von Wasserstoffperoxid**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften

vorgelegt von

Guido Schmeinck

Hamburg 2007

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein
Prof. Dr. E. Stahl-Biskup

Datum der Disputation: 12. Oktober 2007

Für meine Eltern
und meine Frau Meike

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2004 bis Juli 2007 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Ihm Danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Motivation, so wie für zahlreiche Anregungen, die diese Arbeit wesentlich bereichert haben.

Frau Prof. Dr. E. Stahl-Biskup

danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Christine Bostedt danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Messungen.

Frau Steffi Jaeger und **Frau Anke Klack** und meiner Frau **Meike** danke ich für die engagierte Hilfe beim Korrekturlesen.

Des Weiteren danke ich **Frau Dr. Katrin Bennesch**, **Frau Steffi Jaeger**, **Frau Anke Klack**, **Herrn Dr. Thomas Lemcke**, **Frau Dr. Andrea-Nicola Lübke**, **Herrn Rudolf Nohr-Jürgens**, **Frau Dr. Bianca Rickerts**, **Frau Dr. Iona Schonn**, **Herrn Andreas Soltau** und **Frau Dr. Katharina Wehner** für die stete Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Atmosphäre.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern und meiner Frau Meike für ihre liebevolle Unterstützung, während des Studiums und der Promotion, bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2'-Azobis-(2-amidinopropan) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ACN	Acetonitril
AO	Antioxidans
CAT	Katalase
DMPD	N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ETOH	Ethanol
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HgAc ₂	Quecksilberacetat
HRP	Meerrettichperoxidase (von horseradish peroxidase)
Lsg.	Lösung
METK	Mitochondriale Elektronen-Transportkette
MPO	Myeloperoxidase
Phosph.	Phosphat
RNS	Reaktive Stickstoff Spezies (von reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies (von reactive oxygen species)
Scop.	Scopoletin
SOD	Superoxiddismutase
U	Einheit (von Units)
vorg.	vorgemischt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
1.1	Oxidativer Stress	15
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies	16
1.3	Oxidativer Stress im menschlichen Organismus	21
1.4	Antioxidantien.....	22
1.4.1	Enzymatische Antioxidantien.....	23
1.4.2	Nicht-enzymatische Antioxidantien:	25
1.5	Bestimmung der antioxidativen Kapazität.....	28
1.5.1	Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität.....	29
1.5.2	Problematik bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität.....	31
2	Zielsetzung.....	33
3	HRP-Test	34
3.1	Grundlagen des Messverfahrens	34
3.2	Durchführung	38
3.3	Festlegung der Messbedingungen.....	41
3.3.1	Einfluss der verwendeten Puffer auf die Messung.....	41
3.3.2	Einfluss der Lösungsmittel auf die Messung	44
3.4	Ergebnisse	46
3.4.1	Untersuchung von Blutplasma	49
3.5	Validierung.....	52
3.5.1	Linearität.....	52
3.5.2	Präzision	53
3.6	Interaktionen	55
3.6.1	Der Einfluss von Quecksilberacetat bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid mit Hilfe des HRP-Tests	56

3.6.2	Der Einfluss von Quecksilberacetat bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma mit Hilfe des HRP-Tests	60
3.6.3	Untersuchungen zur Reaktionsweise des Quecksilberacetats	62
3.7	Spektralphotometrische Untersuchungen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid mit und ohne HRP Zusatz	64
3.8	Diskussion	68
3.8.1	Diskussion der Methode	68
3.8.2	Diskussion der untersuchten Verbindungen	71
4	Titan-Test.....	74
4.1	Grundlagen des Messverfahrens	74
4.2	Durchführung	76
4.3	Ergebnisse.....	77
4.3.1	Bestimmung des Absorptionsmaximums	77
4.3.2	Überprüfung der Linearität	78
4.3.3	Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid	79
4.4	Diskussion	81
5	Chromotropsäure-Test	83
5.1	Grundlagen des Messverfahrens	83
5.2	Durchführung und Ergebnisse.....	84
5.2.1	Ermittlung des Absorptionsmaximums	84
5.2.2	Linearität einer Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe.....	85
5.3	Diskussion	86
6	Clark-Elektrode	88
6.1	Grundlagen des Messverfahrens	88
6.1.1	Die Clark-Elektrode.....	90
6.1.2	Untersuchung weiterer Antioxidantien.....	91
6.2	Durchführung	91

6.3	Ergebnisse	94
6.3.1	Sauerstoff-Freisetzungskurve	94
6.3.2	Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe	95
6.3.3	Einfluss von Acetonitril auf das Messverfahren	97
6.3.4	Einfluss des Messmilieus auf den Zustand der Elektrode.....	98
6.3.5	Vermessung der Substanzen.....	99
6.3.6	Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus Ascorbinsäure	100
6.3.7	Konzentrationsreihe der Antioxidantien EUK-8, EUK-134 und Katalase bei konstanter Wasserstoffperoxid-Konzentration	101
6.3.8	Bestimmung der Reaktionshalbwertszeit der Zerstörung von Wasserstoffperoxid durch EUK-8 und EUK-134	102
6.3.9	Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma.....	105
6.4	Validierung.....	106
6.4.1	Linearität.....	106
6.4.2	Präzision	107
6.5	Diskussion	108
6.5.1	Diskussion der Methode	108
6.5.2	Diskussion der Antioxidantien	110
7	Wasserstoffperoxidelektrode.....	112
7.1	Grundlagen des Messverfahrens	112
7.2	Durchführung	114
7.3	Ergebnisse	117
7.3.1	Auswirkungen des Wasserstoffperoxid-Verbrauchs durch die Oxidation an der Anode.....	117
7.3.2	Vermessung der Substanzen N-Acetylcystein, Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure und Trolox	119
7.3.3	Mögliche Interaktionen mit dem Messsystem.....	120
7.3.4	Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus Ascorbinsäure	121

7.3.5	Untersuchung der Antioxidantien EUK-8 und EUK-134 im Vergleich mit Katalase.....	124
7.3.6	Bestimmung der Halbwertszeit von Wasserstoffperoxid bei der Reaktion mit den Antioxidantien EUK-8 und EUK-134	126
7.3.7	Permeabilitätsverlust der Elektrodenmembran.....	128
7.4	Validierung.....	129
7.4.1	Linearität.....	129
7.4.2	Präzision.....	130
7.5	Diskussion	131
7.5.1	Diskussion der Methode	131
7.5.2	Diskussion der Antioxidantien.....	133
8	Abschlussdiskussion und Ausblick.....	135
9	Zusammenfassung.....	137
10	Summary.....	140
11	Experimenteller Teil.....	142
12	Gefahrstoffverzeichnis.....	174
13	Literaturverzeichnis	176
14	Lebenslauf.....	185

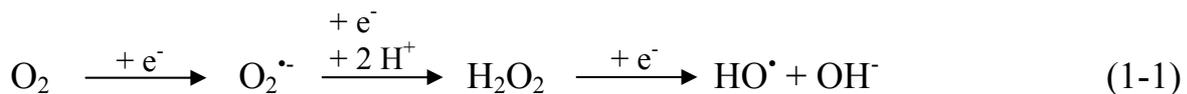
1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress

Vor etwa 2-3 Milliarden Jahren erwarben Cyanobakterien die Fähigkeit Sauerstoff zu erzeugen. Barry Halliwell, einer der führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der reaktiven Sauerstoffspezies beschreibt diese Freisetzung von Sauerstoff als „die möglicherweise größte Luftverschmutzung, die jemals auf diesem Planeten erfasst wurde“ [1]. Vermutlich wurden zahlreiche Lebensformen durch die Anreicherung des mutagenen und toxischen Gases in der Atmosphäre vernichtet. Einige Organismen überlebten in Umgebungen, die für Sauerstoff schlecht zugänglich waren und sind vermutlich die Vorgänger der heutigen Anaerobier. Andere Lebensformen entwickelten in Folge des evolutionären Druckes antioxidative Abwehrmechanismen, die ein Leben in einer sauerstoffreichen Umgebung möglich machten. Im weiteren Verlauf der Evolution erwarben viele Organismen die Möglichkeit den atmosphärischen Sauerstoff für eine effiziente Energiegewinnung zu nutzen. Es entwickelten sich enzymatische Elektronentransportketten, wie die Atmungskette in eukaryotischen Mitochondrien, durch die der Sauerstoff mit günstiger Energiebilanz zum Wasser reduziert werden kann. Jedoch arbeiten auch diese Systeme nicht fehlerfrei. So werden in den menschlichen Mitochondrien ca. 1-5 % des mitochondrial „veratmeten“ Sauerstoffs, bereits nach der Übertragung eines Elektrons freigesetzt, obwohl für die vollständige Reduktion zu Wasser insgesamt 4 Elektronen erforderlich wären. Es wird vermutet, dass der menschliche Körper auf diesem Weg pro Jahr etwa 2 kg Superoxidradikalanion produziert [2]. Diese reaktive Sauerstoffspezies und deren Folgeprodukte können in einem intakten Organismus durch verschiedene antioxidative Abwehrmechanismen erfolgreich beseitigt werden. Wird das Gleichgewicht zwischen reaktiven Spezies und protektiven Mechanismen zugunsten einer höheren Bilanz reaktiver Spezies verändert, spricht man von oxidativem Stress [3]. Wie sensibel dieses Gleichgewicht auf äußere Veränderungen reagiert, konnte an gesunden Ratten gezeigt werden. Die Erhöhung des Sauerstoffgehaltes der Atemluft von 21 % auf 100 %, führte bei allen Tieren innerhalb von 60 bis 72 Stunden zum Tod [4].

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Die biologisch relevanten reaktiven Spezies werden im Wesentlichen in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) unterschieden, wobei Spezies wie Peroxynitrit sowohl ROS als auch RNS zugeordnet werden können [5]. Im Folgenden sollen die ROS vorgestellt werden, die in biologischen Systemen von Bedeutung sind. Die Gleichung (1-1) verdeutlicht die Entstehung von Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal aus dem Sauerstoff.



Superoxidradikalanion

Die wichtigste Quelle für die Entstehung des Superoxidradikalanions ist die mitochondriale Atmungskette [6]. Hier werden wie in Kapitel 1.1 beschrieben ca. 1-5 % des „veratmeten“ Sauerstoffs zu Superoxidradikalanion anstelle von Wasser umgesetzt. Außerdem wird das Radikal während der Phagozytose beim so genannten „respiratorische Ausbruch“ durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase erzeugt (1-2) [7] und dient dabei zusammen mit weiteren Folgeprodukten als bakterizides Agens [8].



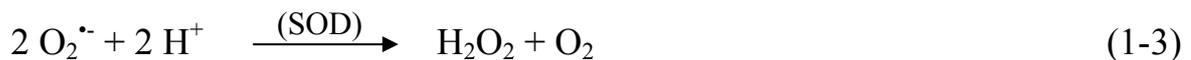
Weitere physiologische Quellen für Superoxidradikalanion sind die Enzyme Xanthinoxidase [9], Cyclooxygenase und Lipoxygenase [10].

Das in verhältnismäßig großen Mengen im Organismus vorkommende Superoxidradikalanion ist verglichen mit anderen radikalischen Spezies nicht sehr reaktiv [11]. Dennoch ist diese Spezies von großer Bedeutung, da durch weitere enzymatische Umsetzung und in Anwesenheit von Übergangsmetallen aus Superoxidradikalanion wesentlich reaktivere ROS gebildet werden können. Außerdem werden durch Superoxidradikalanion einige wichtige Enzyme wie die Katalase [12], die Glutathionperoxidase [13] und die Adenylylcyclase [14] inaktiviert. Das Superoxidradikalanion kann außer durch bestimmte Anionenkanäle keine Biomembranen durchdringen und

bleibt folglich weitgehend in dem Kompartiment eingeschlossen in dem es generiert wurde [10].

Wasserstoffperoxid:

Wasserstoffperoxid entsteht vor allem bei der Disproportionierung des Superoxidradikalanions. Diese Reaktion (1-3) läuft in Anwesenheit des Enzyms Superoxiddismutase um den Faktor 10^4 beschleunigt ab [3].



Die Xanthinoxidase generiert bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zur Harnsäure neben dem Superoxidradikalanion auch Wasserstoffperoxid [3, 9].

Eine Besonderheit des Wasserstoffperoxids ist, dass es im Gegensatz zu den meisten anderen reaktiven Spezies Biomembranen überwinden und so in andere Kompartimente vordringen kann. Diese Eigenschaft macht Wasserstoffperoxid trotz seiner mäßigen Reaktivität sehr gefährlich, da es in Anwesenheit von Übergangsmetallen in nahezu allen Kompartimenten einer Zelle das hochreaktive Hydroxylradikal generieren kann.

Außerdem ist Wasserstoffperoxid ein Substrat der Myeloperoxidase, einem Enzym, welches bei der Phagozytose das bakterizide Hypochlorid erzeugt (1-4) [15, 16].



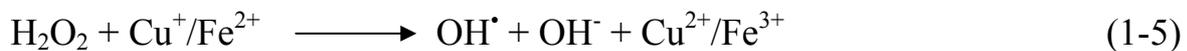
Aus Hypochlorid kann durch Reaktion mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid der hochreaktive Singulett-Sauerstoff gebildet werden (siehe Gleichung (1-9)).

Hydroxylradikal:

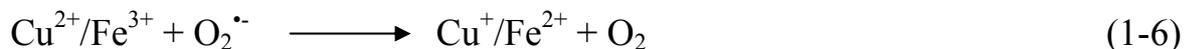
Das Hydroxylradikal ist die reaktivste der in dieser Übersicht aufgeführten Sauerstoffspezies und wird für einen großen Teil der oxidativen Schäden an Biomolekülen verantwortlich gemacht. Das Radikal reagiert unmittelbar

nach der Entstehung willkürlich mit jedem Molekül, welches sich in der Nähe befindet [1, 17]. Dennoch wird die Gefährlichkeit des Hydroxylradikals kontrovers diskutiert, da dessen Diffusionsstrecke aufgrund der hohen Reaktivität nur sehr klein ist. Folglich können nur lokale Schäden am Entstehungsort des Radikals auftreten. Da die Bedingungen für die Entstehung des Hydroxylradikals jedoch häufig in unmittelbarer Umgebung von Biomolekülen günstig sind, bleibt das Radikal trotz der geringen Diffusionsstrecke einer der wichtigsten Verursacher von oxidativen Schäden an Biomolekülen.

Das Hydroxylradikal wird vor allem durch die Fenton-Reaktion gebildet, bei der Wasserstoffperoxid durch Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer reduziert wird.



Ist bei dieser Reaktion das Superoxidradikalanion anwesend, so werden die oxidierten Übergangsmetalle aus der Gleichung (1-5) wieder reduziert.



Zusammengefasst ergeben die Gleichungen (1-5) und (1-6) die Haber-Weiß Reaktion (1-7), die mit Wasserstoffperoxid, Superoxidradikalanion und katalytischen Mengen von Eisen oder Kupfer abläuft. Folglich führt die Anwesenheit von Superoxidradikalanion zu einer Beschleunigung der Fenton-Reaktion [18].



Sowohl das Superoxidradikalanion [19], als auch Wasserstoffperoxid [20] setzen Übergangsmetalle aus Proteinstrukturen frei und fördern somit die Fenton-Reaktion.

Peroxyradikale:

Die wichtigste Quelle für Peroxyradikale in biologischen Systemen ist die Lipidperoxidation. Hierbei werden Wasserstoffatome durch reaktive Spezies

1 Einleitung

wie das Hydroxylradikal von mehrfach ungesättigten Fettsäuren abstrahiert. In Anwesenheit von Sauerstoff bilden sich dann Peroxylradikale (Abbildung 1-1). Diese können wiederum Wasserstoffatome von anderen Biomolekülen abstrahieren und auf diese Weise eine Kettenreaktion propagieren. Die Produkte dieser Kettenreaktion sind zum einen Aldehyde, die häufig toxisch sind und Hydroperoxide, die durch UV-Licht und Übergangsmetalle erneut in Peroxylradikale überführt werden können [3, 21]. Die Lipidperoxidation wird für die Initialisierung der Atherosklerose und die Zerstörung von Lipidmembranen verantwortlich gemacht.

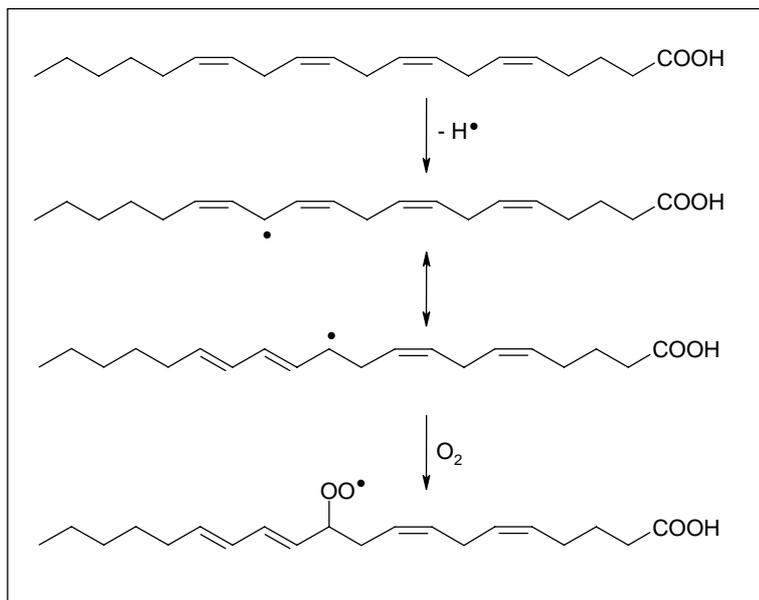


Abbildung 1-1: Lipidperoxidation am Beispiel der Arachidonsäure [3]

Peroxynitrit:

Trotz der geringen Reaktivität in Bezug auf die meisten Biomoleküle ist Stickstoffmonoxid, aufgrund der eigenen radikalischen Struktur, ein potenter Radikalfänger [10]. So konnte in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid eine Inhibition der Lipidperoxidation beobachtet werden [22].

Bei der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxidradikalanion, entsteht jedoch das wesentlich reaktivere und zytotoxische Peroxynitrit (1-8) [7].



Versuche haben ergeben, dass die Reaktion (1-8) ungefähr 6 mal schneller abläuft als die Detoxifizierung des Superoxidradikalanions durch ein Monomer der Cu/Zn-Superoxiddismutase, die in Kapitel 1.4.1 vorgestellt wird [23]. Folglich steht die Bildung des Peroxynitrits aus Stickstoffmonoxid mit der Detoxifizierung des Superoxidradikalanions durch die Superoxiddismutase in Konkurrenz.

Peroxynitrit reagiert direkt mit vielen Biomolekülen und wird für die Nitrierung von Tyrosin-Resten verantwortlich gemacht. In saurem Milieu wird Peroxynitrit zur Peroxynitrosäure protoniert (ONOOH), was zu einer erheblichen Erhöhung der Reaktivität führt. Da in Anwesenheit der Peroxynitrosäure häufig die gleichen Schäden an Biomolekülen beobachtet werden wie beim Hydroxylradikal [24], wurde zunächst angenommen, dass die O-O-Bindung im protonierten Zustand homolytisch gespalten und Hydroxylradikal freigesetzt wird. Diese Hypothese konnte bisher nicht bestätigt werden. Man geht heute davon aus, dass Peroxynitrosäure in eine energetisch höhere Konformation übergeht, die eine ähnliche Reaktivität aufweist, wie das Hydroxylradikal [23]. Die genaue Struktur dieser Konformation ist bisher nicht bekannt.

Singulett-Sauerstoff:

Der Triplettzustand des Sauerstoffs kann in zwei Singulettzuständen angeregt werden, bei denen die π -Elektronen in den antibindenden Orbitalen antiparallel vorliegen [25]. Die Anregung zum Singulett-Sauerstoff führt zu einer erheblichen Steigerung der Reaktivität, da Reaktionen mit anderen Molekülen oder Atomen nicht länger „spin-verboden“ sind [21]. Singulett-Sauerstoff entsteht in biologischen Systemen vor allem durch photochemische Sensibilisierung in Licht bestrahlten Geweben, so wie durch die direkte Reaktion von Wasserstoffperoxid und Hypochlorid, wie sie in Anwesenheit der Myeloperoxidase während der Phagozytose vorkommt (1-9).



Da letztere Reaktion unter physiologischen Bedingungen relativ langsam abläuft wird die Bedeutung während der Phagozytose in Frage gestellt [3].

Singulett-Sauerstoff reagiert direkt mit ungesättigten Fettsäuren und ist folglich ein Initiator der Lipidperoxidation [26]. Außerdem führt der Angriff von Singulett-Sauerstoff an der DNA zu Mutationen und Strangbrüchen [27].

1.3 Oxidativer Stress im menschlichen Organismus

Neben den bereits genannten wichtigsten Quellen für oxidativen Stress, der mitochondrialen Atmungskette und dem respiratorischen Ausbruch bei der Phagozytose, existieren zahlreiche weitere Faktoren, die den Redox-Status im menschlichen Organismus beeinflussen können. Um diese Faktoren ermitteln zu können wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, mit denen der Redox-Status im Organismus erfasst werden kann. Dazu werden häufig die folgenden Parameter bestimmt, die mit oxidativem Stress gleichgesetzt werden: Malondialdehyd - ein Lipidperoxid-Abbauprodukt, 8-Hydroxydeoxyguanosin - ein Oxidationsprodukt der DNA und Isoprostane - Abbauprodukte der Peroxidation von Phospholipiden, die Arachidonsäure enthalten.

Die Messung dieser Parameter hat ergeben, dass Rauchen [2], zunehmendes Alter [7], so wie ein erhöhter Energieumsatz bei extremer körperlicher Ertüchtigung [28] zu einem Anstieg der oxidativen Belastung führen. Außerdem wurde festgestellt, dass sowohl Malondialdehyd, als auch Isoprostane bei Frauen in wesentlich größeren Konzentrationen vorliegen, als bei Männern [29].

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass auch zahlreiche Erkrankungen mit erhöhtem oxidativem Stress in Zusammenhang stehen. Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, wird bei der Atherosklerose eine gesteigerte Lipidperoxidation als Initiator verantwortlich gemacht. Auch bei den Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises geht man von einer Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies aus. Diese werden in gesteigerter Konzentration bei der Immunreaktion freigesetzt. Die Freisetzung der ROS führt zu einer Zerstörung von Hyaluronsäure und anderen Proteoglykanen und damit zum Abbau der Synovialflüssigkeit in den Gelenken. Die Folge ist eine weitere Verschlechterung des Krankheitsbildes [7, 30]. Auch viele Krebserkrankungen werden mit einem Angriff von ROS auf die DNA in Verbindung gebracht. Untersuchungen haben ergeben, dass in jeder Zelle

täglich etwa 10 000 oxidative DNA-Modifikationen durch ROS hervorgerufen werden [2]. Werden solche Läsionen nicht entfernt, ist eine Entartung der Zelle möglich. Weitere Erkrankungen bei denen ein Zusammenhang mit gesteigertem oxidativen Stress vermutet wird, sind unter anderem Allergien, Diabetes, Hepatitis, HIV, Ischämie/Reperfusion-Läsionen und neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer [6, 31].

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt jedoch nicht zwangsläufig zu pathologischen Ereignissen. Wie bereits erwähnt, werden ROS als antimikrobielle Agenzien während der Immunabwehr freigesetzt und führen auf diese Weise zu einer Zerstörung potentiell infektiöser Invasoren. Des Weiteren werden ROS in physiologischen Konzentrationen auch eine große Bedeutung bei der intrazelluläre Kommunikation und Redox-Regulation zugesprochen [6, 32].

1.4 Antioxidantien

In der Literatur werden unterschiedliche Definitionen für den Begriff Antioxidans verwendet, die häufig durch das Forschungsgebiet des Autors geprägt sind. So verhindern Antioxidantien in der Lebensmittelindustrie vor allem den Verderb von Fetten, während in der chemischen Industrie Antioxidantien verwendet werden, um Kunststoffe und Farben vor der Veränderung durch UV-Licht zu schützen. Eine häufig zitierte Definition [33, 34], die auch über das Fachgebiet der Biochemie hinaus weitgehend Gültigkeit behält, wurde durch Barry Halliwell formuliert. Demnach ist ein Antioxidans „any substance that, when present at low concentrations compared with those of any oxidizable substrate, significantly delays or prevents oxidation of that substrate“ [3].

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die Antioxidantien von Bedeutung, die in biologischen Systemen wirksam sind. Diese Antioxidantien lassen sich zunächst in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien einteilen. Die wichtigsten enzymatischen Antioxidantien sind die Superoxid-dismutase (SOD), die Katalase, so wie die Glutathionperoxidase (GPx). Die nicht enzymatischen Antioxidantien können weiter aufgegliedert werden in Inhibitoren von ROS generierenden Enzymen, Metallchelatoren, Cofaktoren antioxidativ wirksamer Enzyme und niedermolekulare Verbindungen mit

1 Einleitung

direkter antioxidativer Kapazität in Bezug auf verschiedene ROS (Tabelle 1-1). Im folgenden Kapitel sollen die wichtigsten antioxidativen Mechanismen in biologischen Systemen zusammengefasst werden.

Enzymatische Antioxidantien	Nicht-enzymatische Antioxidantien
<ul style="list-style-type: none">• Superoxiddismutase• Katalase• Glutathionperoxidase	<ul style="list-style-type: none">• Inhibitoren ROS generierender Enzyme• Metallchelatoren• Cofaktoren antioxidativ wirksamer Enzyme• Niedermolekulare Verbindungen mit direkter antioxidativer Kapazität in Bezug auf verschiedene ROS

Tabelle 1-1: Übersicht Antioxidantien

1.4.1 Enzymatische Antioxidantien

Superoxiddismutase (SOD)

Die SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidradikalanion zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (1-10).



Das Enzym existiert in drei verschiedenen Isoformen, die zytosolische SOD (Cu/Zn-SOD), die mitochondriale SOD (Mn-SOD), so wie die extrazelluläre SOD (EC-SOD), die ebenfalls Kupfer und Zink enthält [31]. Die Mn-SOD ist von besonderer Bedeutung, da dieses Enzym die Akkumulation des Superoxidradikalanions in den Mitochondrien verhindert. Versuche an Mn-SOD Knockout-Mäusen bestätigen dies, da die Abwesenheit des Enzyms in den Mitochondrien innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Geburt zum Tod der Tiere führte [35]. Im Gegensatz dazu erreichten Mäuse, denen lediglich die zytosolische oder die extrazelluläre SOD fehlt das Erwachsenenalter und erscheinen zunächst phänotypisch normal. Bei erhöhtem oxidativem Stress zeigten jedoch auch diese Tiere eine geringere

Überlebensrate als der Wildtyp [36, 37]. Diese Versuche bestätigen die Annahme, dass die mitochondriale Atmungskette eine der größten Quellen für reaktive Sauerstoffspezies in gesunden Organismen ist.

Katalase

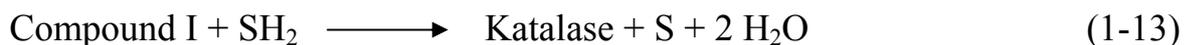
Das Enzym Katalase besteht aus 4 identischen Untereinheiten von je 60 000 Dalton mit jeweils 4 Häm-Gruppen pro Untereinheit [38]. Das Enzym kann in nahezu allen Säugetier-Zellen gefunden werden [39]. Katalase katalysiert zwei Reaktionen, die Katalase- und die Peroxidase-Reaktion, die beide die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid zum Ziel haben. Beide Reaktionen haben gemeinsam, dass sich zunächst aus Katalase und Wasserstoffperoxid das aktivierte Compound I bildet (1-11). Compound I ist ein stärkeres Oxidationsmittel als das Wasserstoffperoxid. Bei der Bildung dieses Ferrylkomplexes gibt das Eisen einer der Häm-Gruppen zwei Elektronen ab und liegt formal in der Oxidationsstufe +5 vor [21].



Bei der Katalase-Reaktion wird anschließend unter Regeneration der Katalase die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert (1-12).



Die Peroxidase-Reaktion läuft im Gegensatz zur Katalase-Reaktion ausschließlich in Anwesenheit geeigneter Substrate (SH_2) ab. Dabei wird Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert während das Substrat oxidiert wird (1-13).



Substrate wie beispielsweise Methanol, Ethanol, Ameisensäure und Nitrit werden hierbei durch Compound I unter Freisetzung von Wasser zu den Oxidationsprodukten Formaldehyd, Acetaldehyd, Kohlendioxid und Nitrat umgesetzt [3].

Glutathionperoxidase (GPx)

Die Glutathionperoxidase besteht aus 4 Untereinheiten, mit jeweils einem Selenocystein-Rest [31]. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Hydroperoxiden mit reduziertem Glutathion (GSH), wobei letzteres zum Disulfid (GSSG) oxidiert wird [39]. Im Gegensatz zur Katalase reduziert die Glutathionperoxidase neben dem Wasserstoffperoxid auch andere Hydroperoxide, wie zum Beispiel Lipidhydroperoxide. Dabei wird die Peroxy-Gruppe zum Alkohol reduziert (1-14) [10].



Die Glutathionperoxidase ist substratspezifisch in Bezug auf den Wasserstoffdonator Glutathion [3].

Damit für die Reaktion (1-14) ausreichend Glutathion zur Verfügung steht, wird das verbrauchte Substrat durch ein weiteres Enzym, die Glutathionreduktase, regeneriert. Die Reduktion des Disulfids findet unter Verbrauch von NADPH statt [39].

GPx-Knockout-Mäuse erscheinen zunächst phänotypisch normal, reagieren jedoch im Vergleich zum Wildtyp empfindlicher auf bestimmte oxidative Noxen, wie Paraquat und Wasserstoffperoxid [40]. Daraus folgt, dass diese Mäuse bei einem physiologischen oxidativen Status das Fehlen der Glutathionperoxidase durch andere antioxidative Systeme ausgleichen können, während eine erhöhte oxidative Belastung nicht toleriert wird.

1.4.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien:

Inhibitoren von ROS generierenden Enzymen

Das Enzym Xanthinoxidase ist wesentlich an den Schäden mitverantwortlich, die während der Reperfusion ischämischer Gewebe durch die Freisetzung von ROS entstehen. Tierexperimente haben gezeigt, dass die Gabe des Xanthinoxidase-Hemmstoffes Allopurinol die Gewebeschädigung bei der Reoxygenierung weitgehend verhindern konnte.

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, ist auch die Cyclooxygenase eine Quelle für das Superoxidradikalanion. Folglich hemmen Inhibitoren dieses

Enzyms wie Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen neben der Cyclooxygenase-reaktion auch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies. Der antioxidative Effekt dieser Inhibition hat jedoch bezogen auf den gesamten Redox-Status eines Individuums nur eine untergeordnete Bedeutung. Aus diesem Grund spricht man bei den Cyclooxygenaseinhibitoren üblicherweise nicht von Antioxidantien.

Cofaktoren antioxidativ wirksamer Enzyme

Zink, Mangan und Selen sind für den Menschen essentielle Spurenelemente. Sie sind Cofaktoren der antioxidativ wirksamen Enzyme SOD und GPx, wodurch sie häufig zu den Antioxidantien gezählt werden. Diese Elemente allein verhindern oder verzögern jedoch nicht die Oxidation eines Substrates und sind folglich entsprechend der Definition von Halliwell keine Antioxidantien [3].

Metallchelatoren

Übergangsmetalle werden in biologischen Systemen für die Funktion zahlreicher Enzyme benötigt. Das wichtigste Element, das in diesem Zusammenhang genannt werden muss ist Eisen, welches bei einem Menschen mit einem Gewicht von durchschnittlich 70 kg in einer Gesamtmenge von etwa 4,5 g vorliegt [3].

In Anwesenheit von Übergangsmetallen kann Wasserstoffperoxid wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben in einer Fenton-Reaktion zum hochreaktiven Hydroxylradikal reduziert werden, welches für Schäden an Biomolekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen verantwortlich gemacht wird. Außerdem werden katalysiert durch Übergangsmetalle Lipidhydroperoxide zu Alkoxyradikalen umgesetzt, die eine Lipidperoxidation initiieren können.

Die Vermeidung von frei vorliegendem Eisen durch die Bindung an Proteine wie Transferrin und Ferirritin verhindert unter physiologischen Bedingungen weitgehend die beschriebene Radikalbildung. Bei Menschen mit Hämochromatose oder Patienten, die häufig Bluttransfusionen (vor allem Erythrozytenkonzentrate) erhalten, kann es jedoch zu einer erheblichen Eisenüberladung kommen. Das überschüssige Eisen kann dann nicht durch

Proteine gebunden werden und liegt entweder frei oder in Komplexen mit niedermolekularen Verbindungen vor, die eine Radikalbildung nicht verhindern können. Das Ergebnis einer dauerhaften Eisenüberladung sind häufig Tumore in Lungen, Leber und Dickdarm [41]. Therapiert werden Eisenüberladungen durch die Gabe von Eisenchelatoren wie Deferoxamin, Deferipron und Deferasirox, wobei die letzteren oral appliziert werden können. Deferoxamin wurde zum Teil erfolgreich in Tiermodellen menschlicher Erkrankungen als Inhibitor eisenabhängiger Radikalreaktionen eingesetzt [42].

Niedermolekulare Verbindungen mit direkter antioxidativer Kapazität in Bezug auf verschiedene ROS

Zu dieser Gruppe zählen alle nicht-enzymatischen Verbindungen, die direkt ROS detoxifizieren können. Diese Verbindungen werden in biologischen Systemen synthetisiert oder mit der Nahrung zugeführt und können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein. Die in diesem Zusammenhang am häufigsten genannten Verbindungen sind Polyphenole, Carotenoide, Thiole, Derivate der Vitamine A und E, sowie Ascorbinsäure. Dabei ist das antioxidative Wirkspektrum dieser Verbindungen sehr unterschiedlich. Eine Verbindung die ein Antioxidans für Superoxidradikalanion ist, muss kein Quencher für Singulett-Sauerstoff sein. Um die antioxidativen Fähigkeiten dieser außerordentlich heterogenen Antioxidantiengruppe einstufen zu können wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, die in Kapitel 1.5 vorgestellt werden.

1 Einleitung

In Abbildung 1-2 werden die wichtigsten physiologischen Wege der Entstehung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies zusammengefasst.

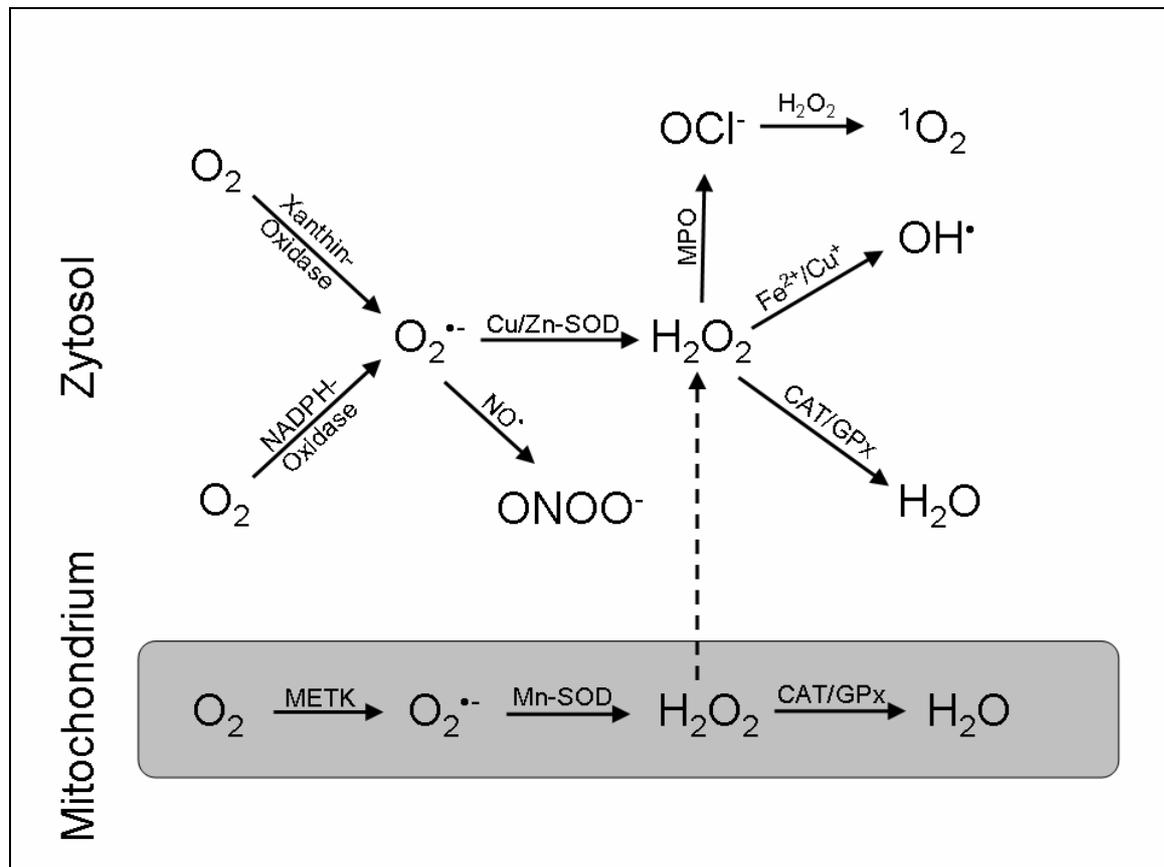


Abbildung 1-2: ROS und deren Entgiftung in biologischen Systemen
(METK = Mitochondriale Elektronen-Transportkette)

1.5 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Die Fähigkeit von Antioxidantien Substrate vor einem oxidativen Angriff zu schützen, wird in dieser Arbeit als antioxidative Kapazität definiert. Durchsucht man die englischsprachige Literatur nach Begriffen, die diesen Zusammenhang beschreiben, so wird neben dem Begriff „antioxidant capacity“ unter anderem auch von „antioxidant efficiency, power, potential, potency und activity“ gesprochen [34]. Diese Vielzahl von Bezeichnungen für denselben Zusammenhang verdeutlichen die Uneinheitlichkeit, die auf diesem Gebiet herrscht. Viel problematischer als die Begrifflichkeit ist jedoch, dass auch bei den Methoden, die für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität Verwendung finden, keine allgemeinen Standards

existieren. Demnach ist ein Vergleich der Ergebnisse dieser Methoden häufig nicht möglich. In den umfangreichen Übersichtsartikeln von Huang und Mitarbeitern [34], Frankel und Meyer [33], so wie von Sanchez-Moreno [43] wurden häufig verwendete Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität zusammengetragen und kritisch kommentiert.

1.5.1 Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Im Folgenden sollen exemplarisch vier häufig verwendete Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität beschrieben werden.

TEAC-Assay (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity):

Bei diesem Verfahren wird die Absorptionsänderung des Radikalkations von 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) (ABTS) (Abbildung 1-3) in Anwesenheit eines Antioxidans bei einer Wellenlänge von 734 nm verfolgt.

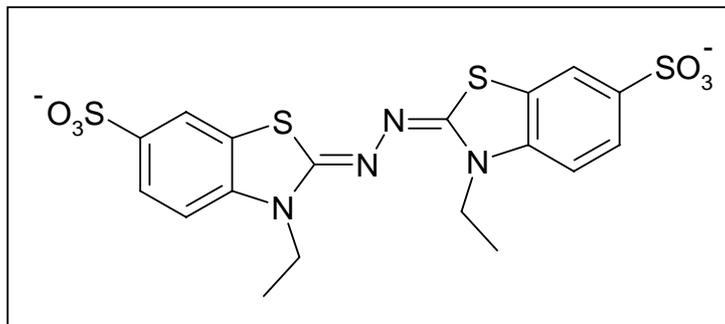


Abbildung 1-3: ABTS [34]

Ausgewertet wird diese Methode, indem die Trolox-Konzentration bestimmt wird, die die gleiche antioxidative Kapazität aufweist, wie eine 1 mM Lösung der untersuchten Substanz. Für die Bildung des ABTS-Radikals wird zunächst Metmyoglobin mit Wasserstoffperoxid aktiviert. Das daraus resultierende Ferrylmyoglobin-Radikal oxidiert anschließend ABTS zum ABTS^{•+} [44, 45]. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die untersuchten Antioxidantien anstelle des ABTS^{•+} das Ferrylmyoglobin reduzieren, wurde die Radikalbildung durch Re und Mitarbeiter modifiziert [46]. Bei diesem Verfahren wird Kaliumpersulfat anstelle von

Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid für die Oxidation von ABTS²⁻ eingesetzt.

ORAC-Assay (Oxygen-Radical Absorbance Capacity):

Beim ORAC-Test wird das fluoreszierende Protein β -Phycoerythrin durch den Radikalinitiator 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH) oxidiert [47, 48]. Dabei zerfällt AAPH zunächst in Stickstoff und zwei Kohlenstoffradikale. Letztere reagieren mit dem Luftsauerstoff zu Peroxylradikalen, die für die Oxidation des β -Phycoerythrins verantwortlich sind. Diese Reaktion führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz, die in Anwesenheit von Antioxidantien verringert werden kann. Die Auswertung dieses Verfahrens erfolgt, indem die Fläche unter der Fluoreszenzabnahme-Kurve ermittelt wird. Aus der Flächendifferenz, die sich in Anwesenheit eines Antioxidans ergibt, wird die „Oxygen-Radical Absorbance Capacity“ berechnet. Nachteile der Verwendung von β -Phycoerythrin sind vor allem ausgeprägte Photobleaching-Effekte, so wie eine große Chargen-Variabilität [34]. Aus diesem Grund wurde bei einer Modifikation des Verfahrens das β -Phycoerythrin durch Fluorescein ausgetauscht [49].

TRAP-Assay (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter):

Dieses Verfahren findet hauptsächlich bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Plasma und Serum Verwendung [33]. Die Durchführung entspricht im Wesentlichen dem bereits beschriebenen ORAC-Test, da auch hier AAPH als Radikalinitiator eingesetzt wird. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass nicht die Oxidation eines Detektormoleküls verfolgt wird, sondern der Sauerstoffverbrauch bei der Peroxidation eines Substrats, wie zum Beispiel Blutplasma. Die Anwesenheit eines Antioxidans führt in Abhängigkeit von der Konzentration und der antioxidativen Kapazität zu einer Verzögerung des Sauerstoffverbrauchs [50]. Diese Verzögerungszeit wird zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität herangezogen. Das Verfahren wurde modifiziert, indem Linolsäure als peroxidierbares Substrat hinzugefügt wurde [51].

DPPH-Assay:

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (Abbildung 1-4) ist ein stabiles, kommerziell erhältliches organisches Radikal mit einem Absorptionsmaximum bei 515 nm. In Anwesenheit von Antioxidantien wird DPPH[•] zum Hydrazin-Derivat reduziert. Diese Reaktion führt in Abhängigkeit von der antioxidativen Kapazität und der Konzentration des untersuchten Antioxidans zu einer Entfärbung von DPPH[•]. Die resultierende Absorptionsänderung kann spektralphotometrisch verfolgt werden [52]. Da die Reduktion von DPPH[•] zu einem Verlust der paramagnetischen Eigenschaften führt, ist auch eine Auswertung mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie möglich [53].

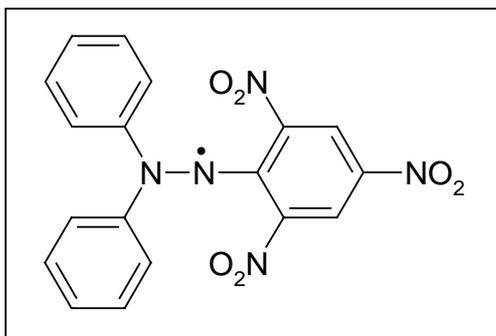


Abbildung 1-4: DPPH[•] [34]

Weitere häufig verwendete Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität, die hier nicht näher erläutert werden sollen sind: **FRAP-Assay** (Ferric Reducing Antioxidant Power) [54], „**total phenol assay by Folin-Ciocalteu Reagent**“ (FCR) [55], „**crocin bleaching assay**“ [56], **DMPD-Assay** [57]

1.5.2 Problematik bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Auch wenn die in Kapitel 1.5.1 beschriebenen Methoden häufig zitierte Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität sind, müssen die Ergebnisse dieser Verfahren kritisch bewertet werden. Letztlich kann mit jeder dieser Methoden allein die antioxidative Kapazität in Bezug auf ein bestimmtes Oxidans ermittelt werden. Beispielsweise ermöglicht der TEAC-Test lediglich eine Aussage über die antioxidative Kapazität in Bezug auf

das ABTS-Radikal. Eine Extrapolation dieser Ergebnisse auf andere Oxidantien ist reine Spekulation. Die Angabe der antioxidativen Kapazität einer Verbindung ist demnach wertlos, wenn nicht gleichzeitig das Oxidans benannt wird, welches bei der Testung verwendet wurde. Des Weiteren werden als Oxidantien meist synthetische Verbindungen verwendet, die sich wesentlich von den reaktiven Sauerstoffspezies unterscheiden, welche in biologischen Systemen zu erwarten sind. Dabei wäre es für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität sinnvoller Oxidantien zu wählen, die entweder selber reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen sind, oder zumindest strukturell mit solchen verwandt sind. Hervorgehoben werden muss an dieser Stelle die TRAP-Methode, die in Anwesenheit der Linolsäure durchgeführt wird. Hier wird zwar mit AAPH ein synthetischer Radikalinitiator gewählt, die Peroxidationsprodukte der Linolsäure sind jedoch reaktive Spezies, die während der Lipidperoxidation in biologischen Systemen denkbar sind. Jedoch ist auch bei der TRAP-Methode lediglich eine Aussage über die antioxidative Kapazität in Bezug auf diese spezielle Reaktion möglich.

Für eine umfassende Bewertung des antioxidativen Spektrums einer Verbindung, ist die Entwicklung einer einfach durchführbaren Testserie wünschenswert, mit der die antioxidative Kapazität in Bezug auf die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt werden kann. Dazu muss zunächst festgelegt werden, welche reaktiven Spezies in biologischen Systemen von Bedeutung sind. Huang und Mitarbeiter machen im Wesentlichen die folgenden 6 reaktiven Spezies für Schädigungen im menschlichen Körper verantwortlich [34]: Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Peroxylradikale, Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff und Peroxynitrit. Um die Testserie zur Bestimmung des reaktiven Spektrums realisieren zu können, müssen leicht anwendbare Verfahren etabliert werden, mit denen die antioxidative Kapazität in Bezug auf die benannten sechs Sauerstoffspezies bestimmt werden kann. Auch wenn diese Vorgehensweise keine absolute Aussage über die antioxidative Kapazität in Bezug auf jedes denkbare Oxidans zulässt, ist dennoch eine Abschätzung bezüglich der wichtigsten reaktiven Spezies möglich.

2 Zielsetzung

Die kritische Betrachtung der bisher veröffentlichten Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität, führte zu dem Ergebnis, dass einfache Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf die reaktiven Sauerstoffspezies Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Peroxylradikale, Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff und Peroxynitrit etabliert werden sollten.

An anderer Stelle unserer Arbeitsgruppe stehen bereits Methoden zur Bestimmung der antioxidative Kapazität in Bezug auf Singulett-Sauerstoff im Mittelpunkt des Interesses [58].

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Etablierung von Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid.

Mit diesen Methoden sollten die folgenden niedermolekularen Verbindungen, für die in der Literatur häufig der Begriff Antioxidans verwendet wird, hinsichtlich der antioxidativen Kapazität im Bezug auf Wasserstoffperoxid untersucht werden: Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure, Melatonin, Naringenin, Quercetin, Retinol und Trolox.

3 HRP-Test

3.1 Grundlagen des Messverfahrens

Durchsucht man die Literatur der vergangenen 50 Jahre nach Methoden zur Bestimmung sehr kleiner Wasserstoffperoxid-Konzentrationen, so wird in den meisten Artikeln ein Verfahren beschrieben, bei dem die peroxidasekatalysierte Oxidation eines Detektormoleküls durch Wasserstoffperoxid ausgenutzt wird. Die Veränderung, die dieses Detektormolekül dabei erfährt, verhält sich proportional zur Wasserstoffperoxid-Konzentration in der untersuchten Probe. Dieses durch Andrae [59] im Jahre 1955 zum ersten Mal beschriebene Verfahren, wurde für eine Vielzahl unterschiedlicher Forschungsgebiete eingesetzt, deren Gemeinsamkeit in der quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid liegt. Verwendung fand dieses Verfahren zur Quantifizierung der Wasserstoffperoxid-Freisetzung aus Granulozyten während der Phagozytose [60], zur Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase [61], zur Messung der Wasserstoffperoxid-Freisetzung aus den Mitochondrien [62, 63] und vor allem zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität natürlicher und synthetischer Antioxidantien in Bezug auf Wasserstoffperoxid [34, 43, 64-68]. Während das Grundprinzip der peroxidasekatalysierten Oxidation unverändert bleibt (Abbildung 3-1), unterscheiden sich die Verfahren in dem verwendeten Detektormolekül.

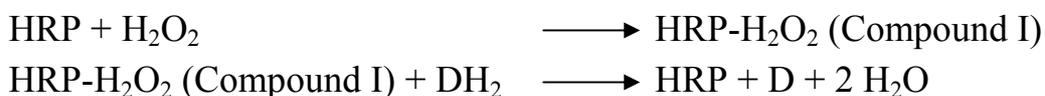


Abbildung 3-1: Die peroxidasekatalysierte Oxidation eines Detektormoleküls (DH_2) durch Wasserstoffperoxid [69] Compound I ist ein Komplex aus Wasserstoffperoxid und Peroxidase. Der Komplex ist ein stärkeres Oxidationsmittel als Wasserstoffperoxid (vergl. Katalase, Kapitel 1.4.1).

Die verwendete apparative Messanordnung hängt von der Auswahl des Detektormoleküls ab. Die Auswertung erfolgt dabei entweder mit einem Fluorimeter oder mit einem UV/VIS-Spektralphotometer. Häufig verwendete Detektormoleküle für eine fluorimetrische Auswertung sind Scopoletin [70],

3 HRP-Test

Homovanillinsäure [67] und N-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin [71, 72], für das der Trivialnamen Amplex Red gebräuchlich ist. Während beim Scopoletin die Oxidation des Moleküls mit einem Verlust der Fluoreszenz einhergeht, werden die anderen beiden Verbindungen durch die Oxidation von einer nicht fluoreszierenden Verbindung in eine fluoreszierende umgesetzt. Bei den Verfahren mit spektralphotometrischer Auswertung wird meist der Naturstoff Guaiacol [66], oder das Tetramethylbenzidin [62] verwendet. Bei den spektralphotometrischen Verfahren ist darauf zu achten, dass die Oxidation des Detektormoleküls zu einer auswertbaren Änderung im Absorptionsspektrum führt.

In der folgenden Versuchsreihe wurde das Cumarinderivat Scopoletin als Detektormolekül verwendet (Abbildung 3-2).

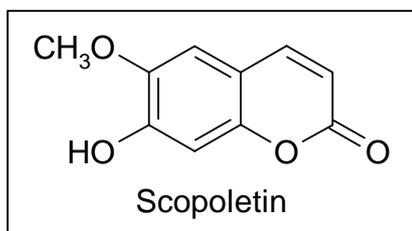


Abbildung 3-2

Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin) [73] zeigt eine ausgeprägte Fluoreszenz bei 470 nm, wenn es mit einer Wellenlänge von 395 nm angeregt wird [74]. Es ist im Streulicht relativ stabil und kann durch Wasserstoffperoxid oder HRP allein nicht zerstört werden. Sind jedoch Wasserstoffperoxid und HRP gleichzeitig anwesend, wird Scopoletin rasch oxidiert [59, 70]. Diese Oxidation des Cumarins führt zu einem Verlust der Fluoreszenz.

Bisher wurde weder ein befriedigender Mechanismus für die Oxidation des Scopoletins beschrieben, noch ein Oxidationsprodukt benannt. Die Oxidationsreaktion des demethylierten und hydrierten Cumarinderivats Dihydroaesculetin zum o-Chinondihydroaesculetin in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und HRP wurde bereits von Moridani und Mitarbeitern formuliert [75]. Daraus folgt, dass auch das Aesculetin unter diesen Bedingungen zum Orthochinon oxidiert werden kann.

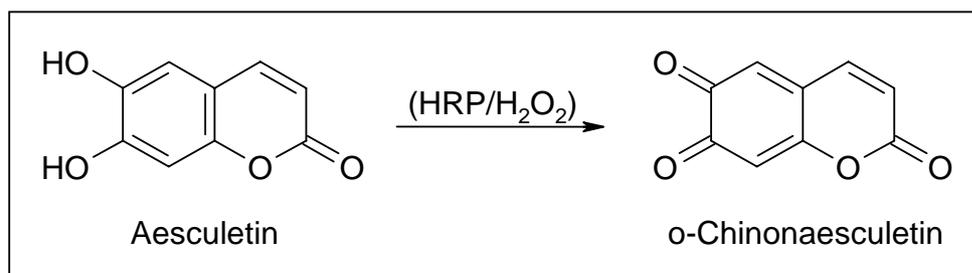


Abbildung 3-3: Oxidation von Aesculetin

Obwohl sich das Scopoletin lediglich an der Position sechs durch eine Methoxygruppe anstelle einer Hydroxygruppe vom Aesculetin unterscheidet, ist die Formulierung eines sinnvollen Oxidationsproduktes beim Scopoletin wesentlich schwieriger. Die Bildung einer Chinonstruktur ist in Anwesenheit der Methoxygruppe nicht formulierbar. Daher ist eine Demethylierung für die Oxidation des Scopoletins unumgänglich. Eigene Untersuchungen haben ergeben, dass die Reaktion bevorzugt im neutralen bis schwach sauren Milieu abläuft. Die Spaltung eines Phenoleters ist jedoch nur unter drastischen Bedingungen in Anwesenheit starker Säuren wie Iodwasserstoff oder Bromwasserstoff möglich [76]. Folglich muss die Demethylierung mit der Peroxidasereaktion in Zusammenhang stehen.

Die Literaturrecherche nach peroxidasekatalysierten Oxidationen von Verbindungen, die ähnliche Strukturelemente aufweisen wie das Scopoletin, führte zu einem Artikel von Meunier und Mitarbeitern [77]. Die Arbeitsgruppe hat den Reaktionsmechanismus der peroxidasekatalysierten Oxidation des zytotoxischen 9-Methoxyellipticin, ein Alkaloid aus der Pflanze *Ochrosia borbonica*, untersucht.

Die Reaktion in Abbildung 3-4 wurde von der Arbeitsgruppe in H₂¹⁸O durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Produkte massenspektrometrisch vermessen. Die Untersuchungen haben ergeben, dass der Sauerstoff im p-Chinonimin nach Oxidation der Verbindung aus dem H₂¹⁸O stammt, während der Methoxy-Sauerstoff der ursprünglichen Verbindung in Form von Methanol frei wird. Anhand dieser Ergebnisse konnte ein Reaktionsmechanismus für die peroxidasekatalysierte Oxidation des 9-Methoxyellipticin formuliert werden.

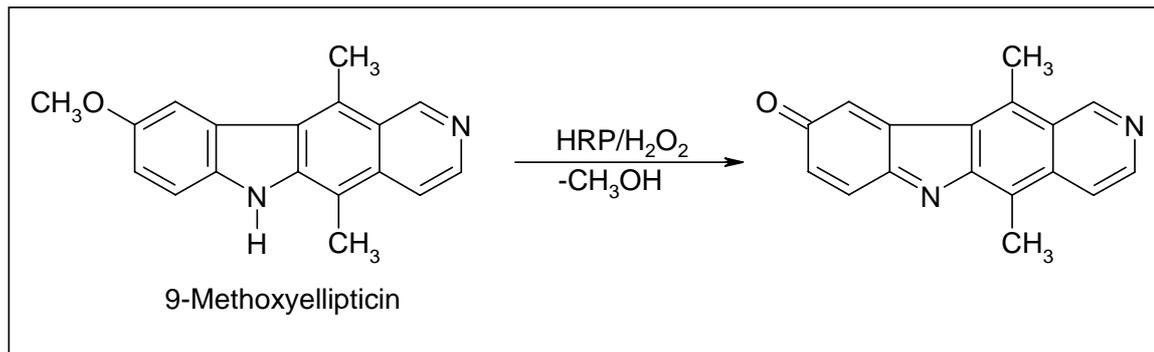


Abbildung 3-4: Oxidation von 9-Methoxyellipticin

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen dem 5-Methoxyindol-Teil des 9-Methoxyellipticins und Scopoletin, wurden die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe auf das Cumarin übertragen. Anstelle eines p-Chinonimins als Endprodukt der Oxidation von 9-Methoxyellipticin, muss beim Scopoletin von der Bildung eines o-Chinons ausgegangen werden, wobei sich der Mechanismus der Oxidation und der anschließenden Demethylierung nicht unterscheidet. Daraus ergibt sich der postulierte Reaktionsmechanismus in Abbildung 3-5.

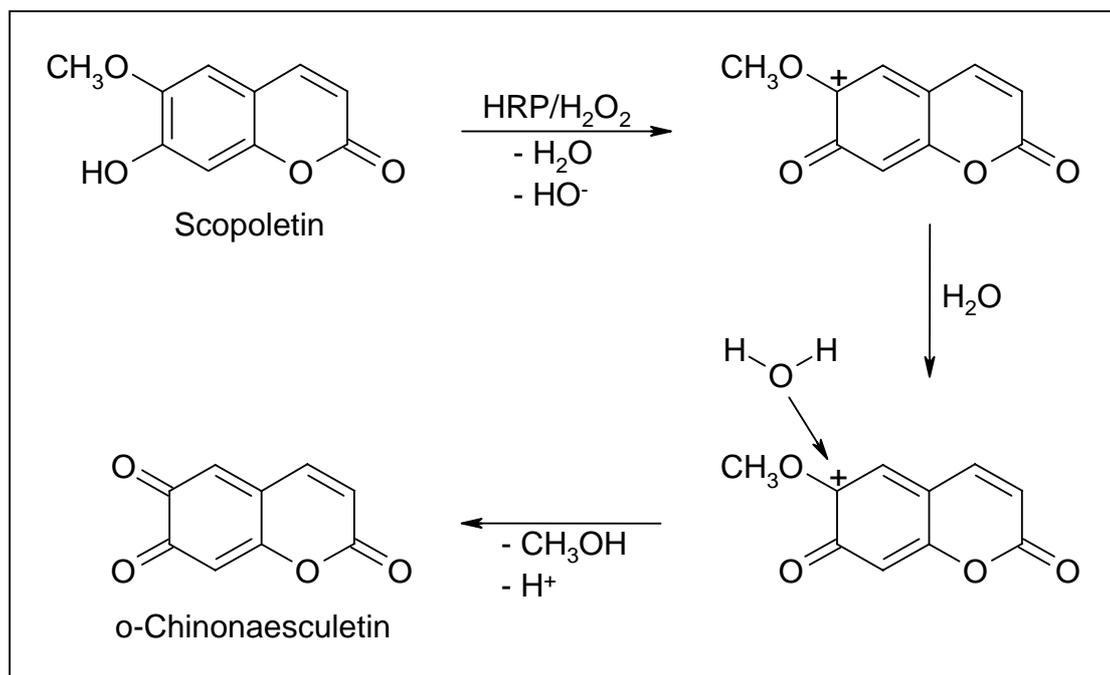


Abbildung 3-5: Oxidation von Scopoletin

Ein Nachteil bei der Verwendung von Scopoletin als Detektormolekül ist die schlechte Löslichkeit des fluoreszierenden Cumarins in Wasser. Bei der Herstellung der Lösung war es erforderlich 2 bis 3 Stunden bei etwa 50°C zu

rühren, bis das Scopoletin vollständig gelöst vorlag. Da Scopoletin in wässriger Lösung bei kühler und dunkler Lagerung weitgehend stabil ist, wurde die Lösung aufgrund der aufwendigen Herstellung lediglich einmal in der Woche frisch hergestellt.

Das beschriebene Verfahren soll verwendet werden, um Substanzen hinsichtlich der antioxidativen Kapazität bezogen auf Wasserstoffperoxid zu untersuchen. Hierbei wird dem Ansatz aus HRP und Scopoletin, bevor die Mischung mit Wasserstoffperoxid versetzt wird, eine Substanz zugesetzt, deren antioxidative Kapazität untersucht werden soll. Reagiert die zu untersuchende Substanz mit dem Wasserstoffperoxid, so steht diese Reaktion in Konkurrenz mit der peroxidasekatalysierten Oxidation des Scopoletins. Je mehr Wasserstoffperoxid durch die Reaktion mit dem Antioxidans zerstört wird, desto weniger Scopoletin kann oxidiert werden. Daraus folgt, dass die Abnahme der Fluoreszenz bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit eines Antioxidans geringer ausfällt.

Untersucht wurden die hydrophilen Verbindungen Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion und Harnsäure, sowie die lipophilen Substanzen Melatonin, Naringenin, Quercetin, Retinol und Trolox. Obwohl Trolox häufig als hydrophiles Vitamin E - Derivat beschrieben wird, wurde es bei dieser Versuchsreihe als lipophile Substanz eingestuft, da es sich wesentlich besser in Acetonitril und Ethanol löst als in Wasser.

3.2 Durchführung

Die Versuchsanordnung der beschriebenen Methode wurde auf einem von Corbet und Mitarbeitern vorgestellten Verfahren, zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid, aufgebaut. Die Abwandlungen dieses Verfahrens beruhen auf Ergebnissen, die in Kapitel 3.3 (Festlegung der Messbedingungen) beschrieben werden.

Für jede untersuchte Substanz wurde eine Konzentrationsreihe bei konstanter Wasserstoffperoxid-Konzentration vermessen. Bei Verbindungen, die in Vorversuchen zu keiner Veränderung der Fluoreszenzintensität geführt haben, wurde auf eine Konzentrationsreihe verzichtet und lediglich bei zwei bis drei Konzentrationsniveaus ein Kontrollwert bestimmt. Alle abgebildeten

3 HRP-Test

Ergebnisse sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Im Folgenden soll der Ablauf der Messung bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid kurz beschrieben werden.

Zunächst wurden in einem verschließbaren Probenröhrchen Scopoletin-Lösung, Phosphatpuffer pH 7,4, HRP-Lösung und die Lösung der zu untersuchenden Substanz gemischt. Die untersuchte Substanz lag dabei entsprechend der Löslichkeit entweder in Wasser oder Acetonitril gelöst vor. Da die zugesetzte Menge der jeweiligen Lösungen in Abhängigkeit vom Konzentrationsniveau variierte, war ein Volumenausgleich mit Acetonitril bzw. Wasser erforderlich, damit alle Proben in Hinblick auf das Volumen die gleiche Zusammensetzung aufwiesen. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Reaktion mit Hilfe eines Boratpuffers mit einem pH-Wert von 10 gestoppt. Die Lösung wurde in eine Quarz-Fluorimeterküvette überführt. Die Probe wurde für drei Minuten unter Lichtausschluss im Küvettenhalter des Fluorimeters belassen, bevor die Messung gestartet wurde. Durch diese Maßnahme konnten eventuelle Photobleaching-Effekte vermindert werden, die durch die Einstrahlung von Streulicht in die Probe hervorgerufen werden [78].

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Messungen, wurden bei jeder Messreihe die Vorproben A-D in Tabelle 3-1 mitbestimmt, um zum einen Interaktionen der untersuchten Substanz mit dem Messsystem aufzudecken und zum anderen um eine prozentuale Auswertung der Messwerte zu ermöglichen.

Probe	Puffer pH 7,4	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	AO	H ₂ O ₂	Puffer pH 10
A	+	+	+	+	+	-	-	+
B	+	+	+	+	-	-	-	+
C	+	+	+	+	+	-	+	+
D	+	+	+	+	+	+	-	+
E	+	+	+	+	-	+	-	+

Tabelle 3-1: Vorproben die bei jeder Messreihe mitbestimmt wurden (+ zugesetzt, -nicht zugesetzt)

Die Messwerte A und B geben die maximale Fluoreszenz des Scopoletins ohne den Einfluss von zugesetztem Wasserstoffperoxid wieder. Aus der Differenz zwischen A und B kann abgelesen werden, wie viel Wasserstoffperoxid in den eingesetzten Lösungsmitteln vorhanden ist, da nur bei der Messung A HRP zugesetzt wurde. Folglich kann auch nur bei der Messung A das im Lösungsmittel vorhandene Wasserstoffperoxid mit dem Scopoletin reagieren. Der Messwert für B lag bei den hier durchgeführten Messungen bei einer Fluoreszenzintensität von etwa 600. Der Messwert für die Messung A lag der Qualität der verwendeten Lösungsmittel entsprechend etwas niedriger.

Messung C gibt die maximale Fluoreszenzminderung wieder, da hier kein Antioxidans anwesend ist, welches Wasserstoffperoxid abbauen kann. Hierbei lag das Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von $0,926 \mu\text{mol}$ pro Liter vor. Vorversuche hatten ergeben, dass das Verfahren bis zu dieser Konzentration linear arbeitet (siehe auch Kapitel 3.5.1). Der Messwert für die Messung C lag in der Regel bei einer Fluoreszenzintensität von 220 bis 270. Die Differenz zwischen Messung C und Messung A ergibt die maximale Fluoreszenzminderung durch die zugesetzte Wasserstoffperoxid-Menge. Um die Messwerte der verschiedenen Messreihen vergleichen zu können, wurde die Differenz zwischen der Messung A und C als 100% Fluoreszenzminderung festgelegt. Die Messwerte der Konzentrationsreihen, bei denen die zu untersuchenden Substanzen anwesend waren, wurden in die prozentuale Inhibition dieser Fluoreszenzminderung umgerechnet.

Mit Hilfe der Messungen D und E sollen mögliche Interaktionen der untersuchten Substanzen mit dem Messsystem aufgedeckt werden. Hierbei kann unterschieden werden, ob diese Interaktion nur in Anwesenheit der Peroxidase vorkommt (D), oder ob auch ohne das Enzym eine Veränderung der Messwerte beobachtet werden kann (E).

Neben den oben aufgeführten Antioxidantien wurde auch Blutplasma hinsichtlich der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid untersucht. Hierzu wurde Kapillarblut entnommen und mit isotoner Kochsalzlösung, anstelle von bidestilliertem Wasser, verdünnt. Nach dem Zentrifugieren dieser Lösung wurde ein Teil des klaren Überstandes abgenommen und dem beschriebenen Versuchsansatz anstelle der Antioxidantien Lösung zugesetzt.

3.3 Festlegung der Messbedingungen

Bevor mit den Messungen zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität begonnen werden konnte, wurde der Einfluss unterschiedlicher Puffer und Lösungsmittel auf den HRP-Test ermittelt.

3.3.1 Einfluss der verwendeten Puffer auf die Messung

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, werden bei diesem Verfahren zwei Puffer verwendet. Ein Puffer wird dem Versuchsansatz zugesetzt, bevor die Reaktion durch Wasserstoffperoxid gestartet wird. Dieser Puffer soll das optimale pH-Milieu für die peroxidasekatalysierte Oxidation des Scopoletins bereitstellen. Da jedoch die Fluoreszenz des Scopoletins im alkalischen Milieu stärker ausgeprägt ist, muss nach Beendigung der Reaktion ein alkalischer Puffer zugesetzt werden um den pH für die Vermessung der Probe anzuheben. In der Literatur werden für die Oxidation des Scopoletins unterschiedliche Pufferlösungen mit neutralem bis schwach saurem pH beschrieben, während für die Anhebung des pH Wertes nach der Beendigung der Oxidation einheitlich ein Boratpuffer mit einem pH Wert von 10 Verwendung findet.

Festlegung des optimalen Puffers für die Oxidation des Scopoletins

Zunächst sollte der optimale Puffer für die Oxidation des Scopoletins ermittelt werden. Dazu wurde die Reaktion unter Verwendung unterschiedlicher Puffer mit einem pH Wert zwischen 2,5 und 10 durchgeführt. Nach abgelaufener Reaktionszeit wurden alle Ansätze mit dem alkalischen Boratpuffer versetzt und anschließend der pH-Wert der Lösung gemessen. Da der Borat-Puffer wesentlich höher konzentriert war, als die getesteten Puffer, wiesen alle Versuchsansätze nach Beendigung der Reaktion einen pH Wert von 9 bis 10 auf. Da die Reaktionsbedingungen mit Ausnahme des initialen Puffers gleich waren und der pH-Wert zum Zeitpunkt der Messung durch den Borat-Puffer ebenfalls angeglichen wurde, war ein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich.

3 HRP-Test

Es wurden folgende Puffer verwendet:

- Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 2,5; 50 mM
- Acetat-Puffer pH 5,0; 50 mM
- Phosphat-Puffer pH 7,4; 66,6 mM
- Borat-Puffer pH 10,0; 50 mM

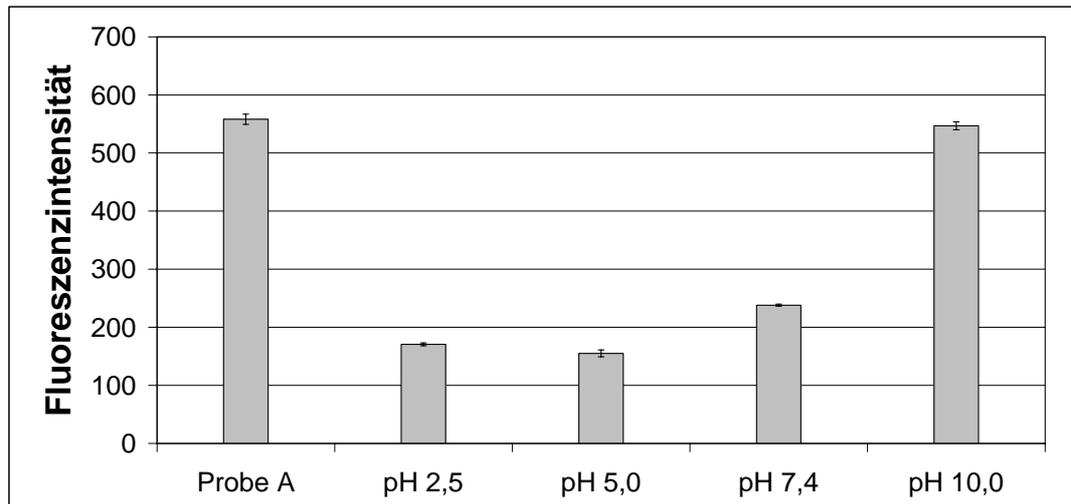


Abbildung 3-6: Einfluss des Puffers auf die Oxidation von Scopoletin

Man kann der Abbildung 3-6 entnehmen, dass die peroxidasekatalysierte Oxidation von Scopoletin pH-abhängig ist und bevorzugt im schwach sauren Milieu abläuft. Bei der Verwendung des Acetatpuffers mit einem pH Wert von 5 wurde am meisten Scopoletin zerstört. Bei einer weiteren Absenkung des pH-Wertes auf 2,5, konnte keine Steigerung des Scopoletin-Abbaus beobachtet werden. Da der Hintergrund dieser Versuchsreihe die Entgiftung von Wasserstoffperoxid in biologischen Systemen ist, wurde für diese Versuchsreihe der Phosphatpuffer mit dem physiologischen pH Wert 7,4 verwendet, obwohl durch eine weitere Absenkung des pH-Wertes eine Optimierung der Reaktionsbedingungen möglich wäre. Wurde von Beginn an ein Boratpuffer mit einem pH-Wert von 10 verwendet, konnte keine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Folglich findet in alkalischem Milieu keine peroxidasekatalysierte Oxidation des Scopoletins statt. Diese Information ist für das beschriebene Testverfahren sehr wichtig, da durch eine Anhebung des pH-Wertes nach Ablauf der Reaktionszeit ein Abbruch der Reaktion möglich ist. Möglicherweise kann die pH-Abhängigkeit der Reaktion mit einer Instabilität des Proteins bei besonders hohen und besonders niedrigen pH-Werten erklärt werden.

Der Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität

Anschließend wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität untersucht. Dazu wurde bei der Probe A der Boratpuffer durch einen Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 ausgetauscht. Die Fluoreszenzintensität dieser Probe wurde gemessen und mit den Messwerten der Probe A verglichen, die mit dem Boratpuffer hergestellt wurde. Die Probe, die mit dem Boratpuffer versetzt wurde, wies einen pH-Wert von 9-10 auf, während die Verwendung eines Phosphatpuffers zu einem pH-Wert von 7-8 führte.

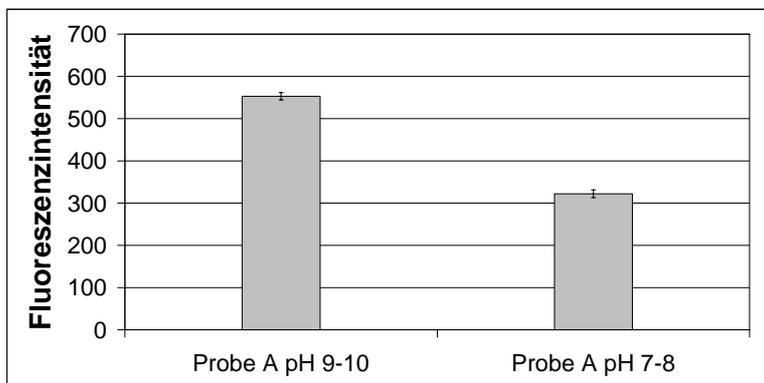


Abbildung 3-7: Auswirkungen des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität

Die Ergebnisse in Abbildung 3-7 zeigen, dass die Absenkung des pH-Wertes zu einer Reduktion des Fluoreszenzsignals um etwa 40 Prozent geführt hat. Möglicherweise führt die Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe des Scopoletins bei basischen pH-Werten zu einer weiteren Delokalisierung der Elektronen und damit zu einer Steigerung der Fluoreszenz.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zu den Einflüssen der verwendeten Puffer zeigen, dass der pH-Wert des Puffers für die Oxidation des Scopoletins schwach sauer bis neutral sein sollte. Um die Reaktion zu beenden, sollte ein alkalischer Puffer zugesetzt werden, der gleichzeitig zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität des Scopoletins führt.

3.3.2 Einfluss der Lösungsmittel auf die Messung

Einfluss von Ethanol auf das Messverfahren

Um mit diesem Verfahren auch die lipophilen Verbindungen Melatonin, Naringenin, Quercetin Retinol und Trolox untersuchen zu können, war es erforderlich ein Lösungsmittel für diese Substanzen zu finden, welches zum einen wassermischbar ist und zum anderen möglichst wenig mit dem Testsystem interagiert. Durch Löslichkeitsversuche stellte sich heraus, dass sowohl Acetonitril als auch Ethanol mögliche Lösungsmittel für diese Verbindungen sind. Aufgrund der geringeren Toxizität wurde zunächst Ethanol hinsichtlich des Einflusses auf das Testverfahren untersucht. Dazu wurde bei der Probe A anstelle des Acetonitrils zum einen frisch destilliertes Ethanol und zum anderen Ethanol, welches sechs Monate zuvor destilliert wurde, verwendet (Abbildung 3-8).

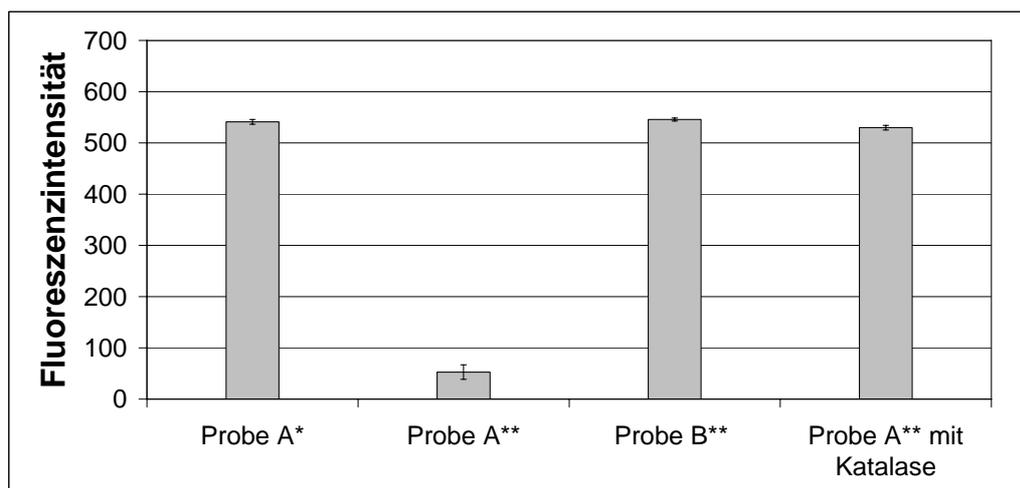


Abbildung 3-8: Einfluss von Ethanol auf das Messverfahren

* Enthält frisch destilliertes Ethanol

** Enthält vor 6 Monaten destilliertes Ethanol

Die Anwesenheit des älteren Ethanols führte in dieser Versuchsreihe im Vergleich zu der Probe mit dem frischen Ethanol zu einer Fluoreszenzminderung um etwa 90 %. Um die Ursache dieser Fluoreszenzabnahme zu ermitteln wurde die Probe B, die kein HRP enthält, mit dem alten Ethanol versetzt. In diesem Fall war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Probe A, die mit dem frischen Ethanol hergestellt wurde erkennbar. Folglich muss die Fluoreszenzabnahme mit einer peroxidasekatalysierten Reaktion in Zusammenhang stehen. Da peroxidase-

katalysierte Reaktionen nur in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Monoalkylperoxiden ablaufen [60], muss davon ausgegangen werden, dass während der Lagerung des Ethanol Peroxide entstanden sind. Um dies zu verifizieren, wurde erneut eine Probe A mit dem alten Ethanol hergestellt und zusätzlich das Wasserstoffperoxid zerstörende Enzym Katalase zugesetzt. Durch den Zusatz der Katalase konnte die Fluoreszenz annähernd auf den Messwert der Probe angehoben werden, die mit dem frisch destillierten Ethanol hergestellt wurde. Die geringe Differenz, die dennoch besteht ist möglicherweise auf Spuren von nicht vollständig zerstörten Peroxiden zurückzuführen. Ein weiterer Hinweis darauf, dass das alte Ethanol erheblich mit Peroxiden belastet war, zeigte auch die Sauerstoffentwicklung, die direkt nach Zugabe der Katalase-Lösung beobachtet werden konnte. Die Untersuchungen zeigen, dass Ethanol ausschließlich frisch destilliert als Lösungsmittel für diese Versuchsreihe verwendet werden kann, da während der Lagerung erhebliche Mengen an Peroxiden entstehen. Aufgrund der geringen Stabilität bezogen auf die Bildung von Peroxiden ist Ethanol als Lösungsmittel für lipophile Antioxidantien im HRP-Test nicht geeignet.

Einfluss von Acetonitril auf das Messverfahren

Anschließend wurde untersucht, ob bei der Verwendung von Acetonitril ähnliche Probleme zu erwarten sind, wie beim Ethanol. Dazu wurden die Proben A und B wie oben beschrieben in Anwesenheit von Acetonitril vermessen. Zum Vergleich wurden diese Messungen erneut durchgeführt, wobei das Acetonitril durch bidestilliertes Wasser ausgetauscht wurde.

Die Ergebnisse in Abbildung 3-9 zeigen, dass bei der Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel für die lipophilen Verbindungen keine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden konnte wie beim Ethanol. Folglich entstehen bei der Lagerung von Acetonitril keine Peroxide. Anstelle einer Abnahme konnte in Anwesenheit von Acetonitril eine Steigerung der Fluoreszenz um etwa 10 Prozent detektiert werden. Diese Zunahme der Fluoreszenz war unabhängig von der Anwesenheit des Enzyms HRP, da sie sowohl bei der Probe A als auch bei der Probe B beobachtet werden konnte. Auch wenn das Messverfahren durch das Acetonitril nicht wesentlich beeinflusst wird, kann die beschriebene Steigerung der Fluoreszenz nicht

ignoriert werden, da die hydrophilen Verbindungen, die nicht in Acetonitril gelöst werden, mit den lipophilen Verbindungen verglichen werden sollen. Aus diesem Grund war es erforderlich auch bei der Vermessung der hydrophilen Verbindungen die gleiche Menge Acetonitril zuzusetzen wie bei den lipophilen Substanzen.

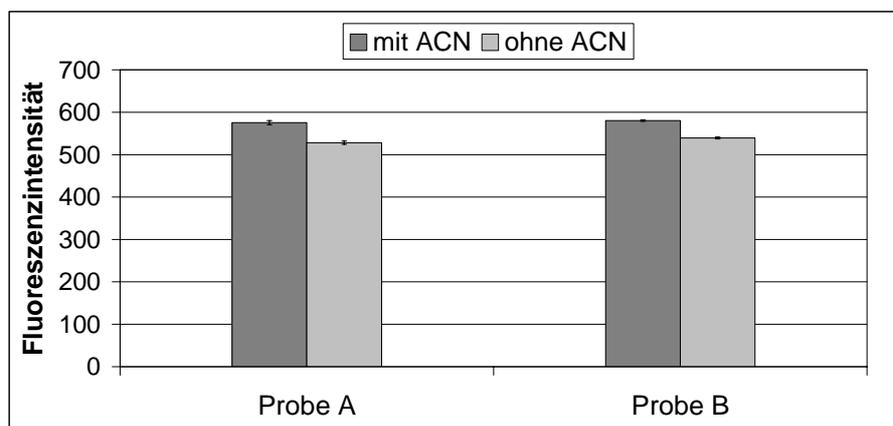


Abbildung 3-9: Einfluss von Acetonitril auf das Messverfahren

3.4 Ergebnisse

Vor Beginn jeder Messung wurden die Vorproben A bis E aus Kapitel 3.2 durchgeführt um Interaktionen zwischen den untersuchten Substanzen und dem Testverfahren auszuschließen. Durch die Vorproben A bis E konnte mit Ausnahme der Ascorbinsäure bei keiner der Verbindungen eine Interaktion festgestellt werden. Das heißt, dass sich die Ergebnisse der Vorproben A, B, D und E nur geringfügig voneinander unterschieden haben und die Werte für die Fluoreszenzintensität der Vorprobe C im Bereich von 220 bis 270 nm lagen. Bei der Untersuchung der Ascorbinsäure konnte eine deutliche Absenkung der Fluoreszenz bei der Vorprobe D beobachtet werden (Abbildung 3-10). Bei der Probe E, der keine HRP zugesetzt wurde, waren die Messergebnisse auf dem Niveau der Proben A und B und zeigten somit keine Interaktion an. Hieraus folgt, dass die beschriebene Absenkung der Fluoreszenzintensität, die bei der Probe D beobachtet wurde, ausschließlich in Anwesenheit von HRP auftrat. Eine Interaktion, die auf einer Absorption des emittierten Lichts beruht kann somit ausgeschlossen werden, da ansonsten auch der Messwert der Probe E erniedrigt worden wäre. Folglich

muss in Anwesenheit der Ascorbinsäure-Lösung und HRP eine Oxidation des Scopoletins stattgefunden haben. Da die peroxidasekatalysierte Oxidation ausschließlich in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Monoalkylperoxiden ablaufen kann [60], müssen in der Ascorbinsäure-Lösung Peroxide vorhanden gewesen sein. Um diese Vermutung zu verifizieren wurde die Ascorbinsäurelösung mit dem Enzym Katalase versetzt, bevor sie dem Versuchsansatz zugesetzt wurde. Man kann der Abbildung 3-10 entnehmen, dass durch diese Maßnahme die Fluoreszenz so weit angehoben wurde, dass sich der Messwert nicht mehr signifikant von den Ergebnissen der Probe A unterscheidet, die weder Ascorbinsäure-Lösung noch Wasserstoffperoxid enthält. Daraus folgt, dass in der relativ kurzen Standzeit nach Herstellung der Ascorbinsäure-Lösung so viel Wasserstoffperoxid in der Lösung generiert wurde, dass dadurch nahezu die Hälfte des Scopoletins zerstört werden konnte. Aufgrund dieser Problematik wurde bei der Ascorbinsäure auf eine weitere Untersuchung der antioxidativen Kapazität mit diesem Verfahren verzichtet.

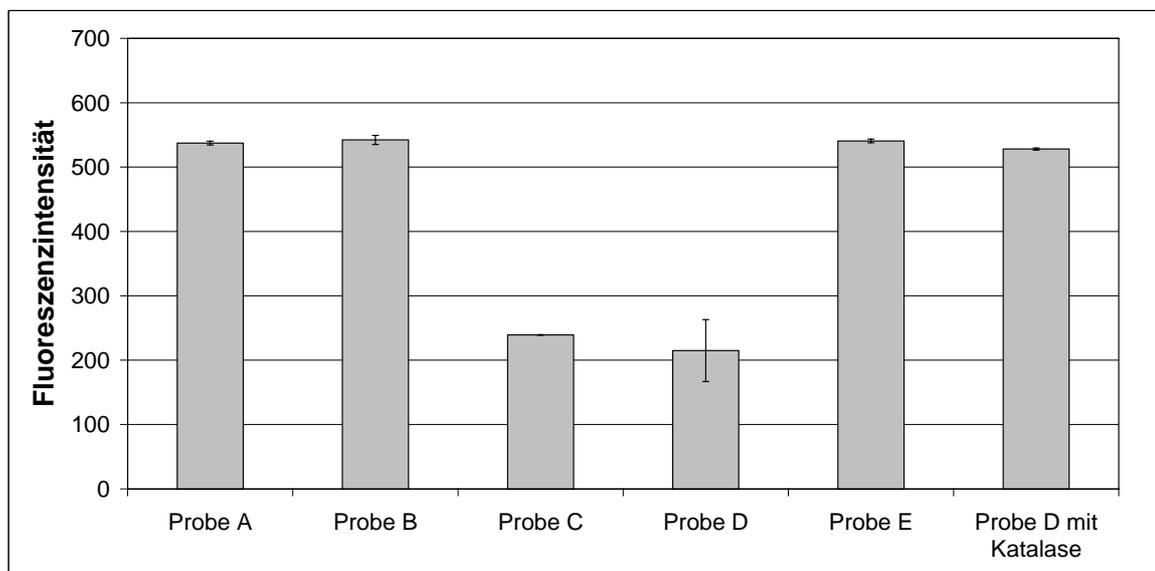


Abbildung 3-10: Interaktion von Ascorbinsäure mit dem Testverfahren

Die Vermessung der Verbindungen, die keine Interaktionen bei den Vorproben gezeigt haben, wurde durchgeführt wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Bei den Verbindungen Melatonin, Naringenin und Retinol war auch bei einem molekularen Verhältnis von 2 zu 1 zwischen der untersuchten Substanz und Wasserstoffperoxid keine Veränderung der

3 HRP-Test

Fluoreszenz feststellbar. Folglich hat bei diesen Verbindungen keine Reaktion mit Wasserstoffperoxid stattgefunden.

Für die übrigen Verbindungen wurde eine Konzentrationsreihe bei konstanter Wasserstoffperoxid-Konzentration vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in Abbildung 3-11 zusammengestellt. Für Glutathion wurde zunächst ebenfalls versucht eine Reihe mit dicht beieinander liegenden Konzentrationsniveaus, wie bei den anderen untersuchten Verbindungen, zu vermessen. Dabei nahm die Inhibition bei steigender Glutathion-Konzentration zunächst wie erwartet zu, flachte dann jedoch immer weiter ab. Wurde eine Messung 10 bis 20 Minuten später mit der gleichen Glutathion-Stammlösung noch einmal durchgeführt, so war der Messwert wesentlich niedriger. Die inhibierende Wirkung der Glutathion-Lösung nahm nach Herstellung der Lösung rapide ab. Daraus folgt, dass Glutathion in wässriger Lösung nicht stabil ist. Wahrscheinlich wird das Thiol der verwendeten reduzierten Form durch den Luftsauerstoff zum Disulfid oxidiert und damit der weiteren Reaktion entzogen. Um Glutathion dennoch mit dieser Methode untersuchen zu können, wurde lediglich bei zwei Konzentrationsniveaus direkt nach Herstellung der Glutathion-Lösung gemessen. Dadurch konnte eine lange Standzeit der Glutathion-Lösung vermieden werden.

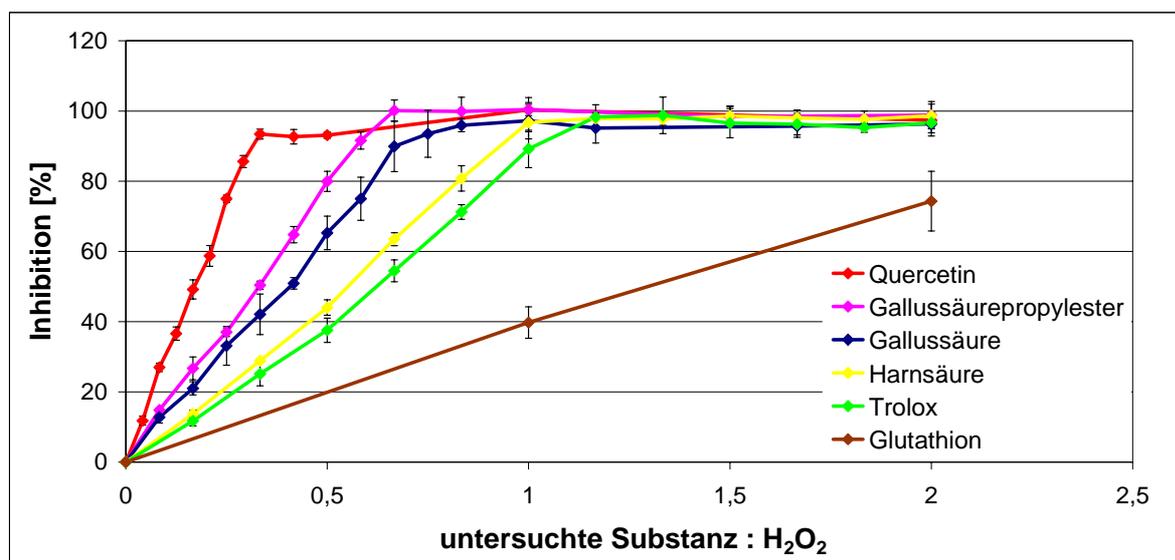


Abbildung 3-11: Konzentrationsreihe der untersuchten Substanzen bei konstanter Wasserstoffperoxid-Konzentration

Die Verbindungen Gallussäure, Gallussäurepropylester, Harnsäure, Quercetin und Trolox waren in gelöster Form stabil und wurden als Konzentrationsreihe vermessen. Es konnte mit zunehmender Konzentration eine Steigerung der Inhibition beobachtet werden, bis diese 100 Prozent erreicht hat.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte, indem eine Regressionsgerade durch den Bereich der Kurve gelegt wurde, bei dem auf eine Steigerung der Konzentration eine Zunahme der Inhibition folgt, also bis zu einer Inhibition von 100 Prozent. Die Einstufung der Verbindungen erfolgte anhand der Steigung der Regressionsgeraden (Tabelle 3-2). Beim Glutathion wurde auf eine Bestimmung der Geradengleichung verzichtet, da nicht ermittelt werden konnte, ob in dem Zeitraum zwischen Herstellung der Lösung und dem Beginn der Messungen bereits Glutathion zerstört wurde.

Untersuchte Substanz	Steigung
Gallussäure	0,844
Gallussäurepropylester	1,042
Harnsäure	0,656
Quercetin	1,949
Trolox	0,586

Tabelle 3-2: Steigung der Regressionsgeraden

Aus den Steigungen der Geradengleichungen ergibt sich die folgende Reihenfolge für die Inhibition der Wasserstoffperoxid bedingten Fluoreszenzminderung, beginnend mit der schwächsten Verbindung:

Trolox<Harnsäure<Gallussäure<Gallussäurepropylester<Quercetin

3.4.1 Untersuchung von Blutplasma

In dieser Versuchsreihe wurde die antioxidative Kapazität von Blutplasma untersucht. Neben einigen der bisher untersuchten Verbindungen mit einer Molekülmasse unterhalb von 500 Gramm pro Mol enthält das Blutplasma weitere Substanzen die für eine Zerstörung des Wasserstoffperoxids verantwortlich sein können. Dazu zählen zum einen antioxidative Enzyme, wie Katalase und verschiedene Peroxidasen, so wie Übergangsmetalle, die

die Zerstörung des Wasserstoffperoxids katalysieren können. Die antioxidativen Enzyme spielen im Blutplasma unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle, da sie vor allem innerhalb der Zellen biosynthetisiert werden [3]. Kommt es jedoch durch Verdünnung des Kapillarblutes mit hypotonen Lösungsmitteln oder durch eine unsachgemäße Behandlung der Blutlösung zu einer Zerstörung der Blutzellen, so ist mit einer unphysiologisch hohen Konzentration dieser Enzyme im Blutplasma zu rechnen. Durch das Platzen der Erythrozyten ist zusätzlich, aufgrund des austretenden Hämoglobins mit einer erhöhten Eisenkonzentration im Blutplasma zu rechnen. Außerdem führt das austretende Hämoglobin zu einer intensiven Rotfärbung der Lösung. Diese Färbung führt zu einer Absorption des Lichtes, welches während der fluorimetrischen Messungen emittiert wird. Aus diesen Gründen ist eine Verdünnung des Kapillarblutes mit isotoner Kochsalzlösung unerlässlich. Um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten wurden alle Proben mit der gleichen Menge isotoner Kochsalzlösung versetzt.

Auch bei dieser Versuchsreihe wurde den Proben Acetonitril zugesetzt, um die Ergebnisse mit den anderen untersuchten Verbindungen vergleichen zu können. In der vorwiegend wässrigen Lösung, die nur einen geringen Anteil Acetonitril enthielt, war bei Zugabe der Blutplasma-Lösung keine Proteinfällung sichtbar, die jedoch bei höheren Acetonitril Konzentrationen auftrat.

Um die Anzahl der Kapillarblutentnahmen zu reduzieren, wurde neben den Vorversuchen lediglich bei 7 Konzentrationsniveaus gemessen. Auch bei dieser Messreihe wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Da dennoch 36 Blutentnahmen erforderlich waren, konnten für diese Versuchsreihe keine weiteren Probanden verpflichtet werden.

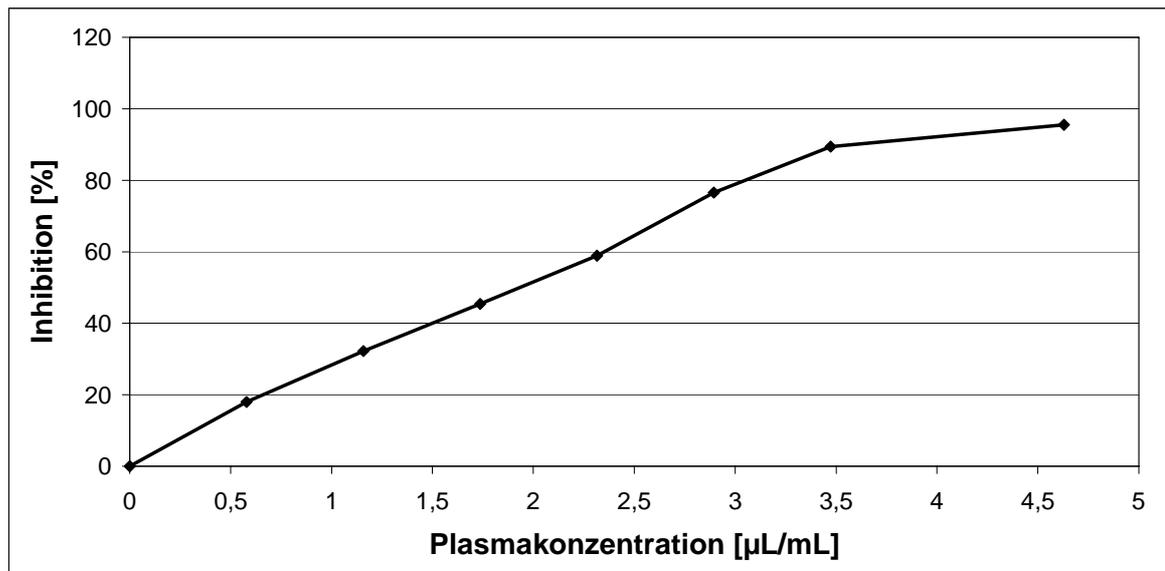


Abbildung 3-12: Untersuchung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma

Abbildung 3-12 zeigt die Inhibition der Fluoreszenzminderung durch Wasserstoffperoxid bei unterschiedlichen Plasmakonzentrationen. Die Plasmakonzentration wird in μL Plasma pro mL Versuchsansatz angegeben. Auch hier wurde mit Hilfe einer Regressionsgeraden im linear verlaufenden Teil der Kurve die Steigung bestimmt. Die Steigung dieser Regressionsgeraden beträgt 4,710. Da dieser Wert nur auf ein Volumen und nicht auf eine bestimmte Stoffmenge bezogen werden kann, ist ein direkter Vergleich der Verbindungen, die in Kapitel 3.4 untersucht wurden, nicht möglich. Aufgrund der Heterogenität des Blutplasmas ist mit dieser Versuchsreihe keine weitere Aussage über die Antioxidantien möglich, die für die beobachtete Inhibition verantwortlich sind. Das beschriebene Verfahren könnte verwendet werden, um unterschiedliche Plasmaproben hinsichtlich der antioxidativen Kapazität zu vergleichen.

3.5 Validierung

3.5.1 Linearität

Um die Linearität des beschriebenen Verfahrens zu bestimmen wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe mit 5 Konzentrationsniveaus vermessen. Für jedes Konzentrationsniveau wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

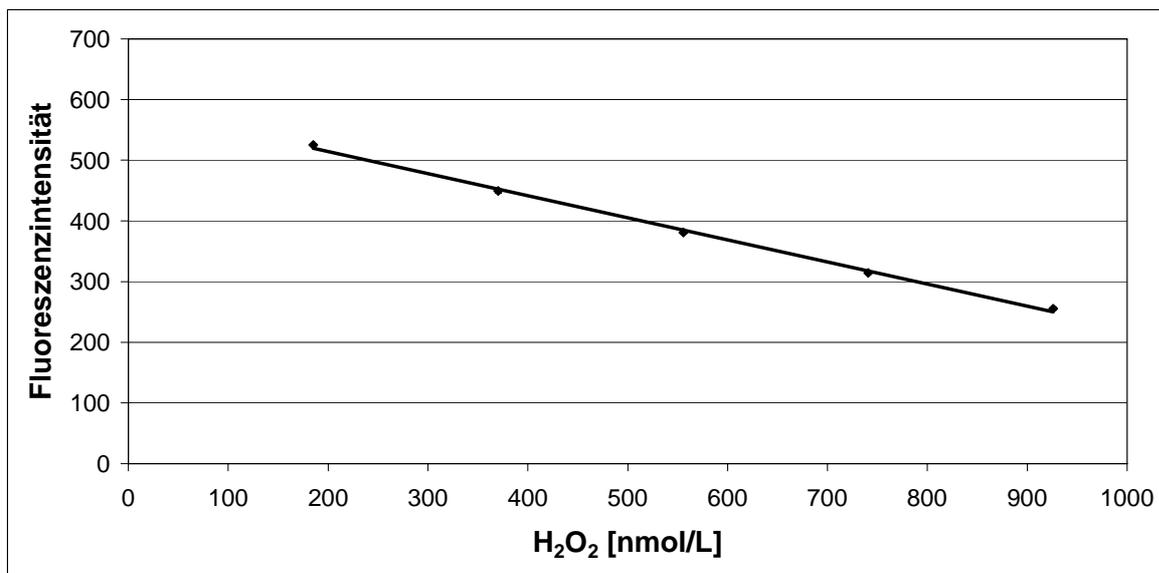


Abbildung 3-13: Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe zur Bestimmung der Linearität

Die Dintest[®]-Auswertung für die lineare Regression, so wie die Ergebnisse des Mandel-Tests befinden sich im experimentellen Teil (Kapitel 11)

Bei der durchgeführten Linearitätsuntersuchung konnte für die lineare Regression ein Korrelationskoeffizient von 0,9990 ermittelt werden. Die Prüfung auf Normalverteilung der Residuen, ergab bei Dintest[®] für die lineare Funktion keine Normalverteilung. Die quadratische Regression lieferte einen Korrelationskoeffizienten von 1,000, wobei die Residuen normalverteilt sind. Daraus ergibt sich, dass das optimale Regressionsmodell bei dieser Konzentrationsreihe die quadratische Regression ist. Aufgrund des guten Korrelationskoeffizienten und dem Ergebnis des Mandel-Tests ist eine lineare Regression dennoch vertretbar.

3.5.2 Präzision

Methodenpräzision

Es wurden nacheinander 6 Proben vermessen, die entsprechend der Probe C mit der maximalen Wasserstoffperoxid-Konzentration von 0,926 μmol pro Liter hergestellt wurden. Um bei dieser Methodenpräzisionsbestimmung auch die Streuung zu erfassen, die sich aus der Verdünnung der Wasserstoffperoxid-Stammlösung ergibt, wurde für jede der 6 Messungen eine Wasserstoffperoxid-Lösung vor Beginn der Messung frisch hergestellt.

Messung	1	2	3	4	5	6
Intensität	265,2	267,2	265,7	259,5	263,6	255,3

Tabelle 3-3: Bestimmung der Methodenpräzision

Messpräzision

Die Messpräzision wurde sowohl mit einer Probe bestimmt, die die maximale Wasserstoffperoxid-Konzentration enthält als auch mit einer Probe, die kein Wasserstoffperoxid enthält. Folglich wurde entsprechend der Herstellungsvorschriften der Proben A und C jeweils ein Ansatz in 6facher Menge hergestellt. Diese beiden Lösungen wurden je 6-mal hintereinander vermessen. Die Küvette wurde vor jeder Messung neu befüllt und die bereits vermessenen Proben wurde verworfen. Auf diesem Wege konnte Fluoreszenzminderungen durch Photobleaching verhindert werden. Um Photobleaching Effekte durch das Streulicht zu verhindern wurden die beiden Proben unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Messung	1	2	3	4	5	6
Intensität	606,2	605,0	603,6	606,3	605,0	603,0

Tabelle 3-4: Bestimmung der Messpräzision mit Probe A

Messung	1	2	3	4	5	6
Intensität	264,9	263,9	264,8	264,9	267,2	264,8

Tabelle 3-5: Bestimmung der Messpräzision mit Probe C

3 HRP-Test

	Methodenpräzision Probe C	Messpräzision Probe A	Messpräzision Probe C
Mittelwert	262,75	604,85	265,08
Standardabweichung	4,50	1,34	1,10
Variationskoeffizient	1,71	0,22	0,42
David Test	2,64	2,47	2,99

Tabelle 3-6: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung

David-Test g_u/g_o (6, P = 99 %): 2,15 / 3,16

Da die Messreihen normalverteilt sind, kann die Auswertung mit den üblichen statistischen Methoden erfolgen. Sowohl der Dixon-Test, als auch der Grubbs-Test lieferten keinen Hinweis auf Ausreißer. Die Ergebnisse der Messpräzisionsbestimmungen sind insgesamt als gut einzustufen. Der Variationskoeffizient, der bei der Methodenpräzisionsbestimmung ermittelt wurde, ist wesentlich größer, da hier die Streuungen mit einfließen, die sich durch die Verdünnungsschritte der Wasserstoffperoxid-Lösung ergeben. Obwohl der Variationskoeffizient im Vergleich mit anderen Methoden der Analytik relativ groß ist, muss bedacht werden, dass mit dieser Methode Wasserstoffperoxid-Konzentrationen unterhalb von einem μmol pro Liter bestimmt wurden. Folglich ist die Präzision dieses Verfahrens insgesamt als gut einzustufen.

Stabilität der Lösungen

Um zu belegen, dass die verwendeten Lösungen ausreichende Stabilität aufweisen, wurden die Messergebnisse der Probe C über ein Zeitintervall von 150 Minuten beobachtet. Dazu wurde in Abständen von 30 Minuten jeweils eine Probe C hergestellt und vermessen. Für jede dieser Messungen wurden die gleichen Reagenzien-Lösungen verwendet, die vor Beginn dieser Messreihe frisch hergestellt wurden. Weist eines der verwendeten Reagenzien keine ausreichende Stabilität auf, so ist ein stetiges Abfallen oder Ansteigen der Messwerte zu erwarten.

Zeit [min]	0	30	60	90	120	150
Intensität	265,2	271,8	255,2	256,0	257,3	269,7

Tabelle 3-7: Überprüfung der Stabilität der Reagenzien

Anhand der Ergebnisse der Tabelle 3-7 ist kein Trend der Messwerte zu erkennen. Folglich sind die Reagenzien über ein Zeitintervall von 150 Minuten stabil. Dieses Zeitintervall entspricht etwa dem Zeitaufwand für eine Messreihe.

3.6 Interaktionen

In der Einleitung zu diesem Kapitel wurde bereits erwähnt, dass die beschriebene Messmethode in der Literatur sehr häufig zur Bestimmung sehr kleiner Wasserstoffperoxid-Konzentrationen verwendet wird. In einigen Artikeln [66, 69], wird jedoch auf eine Interaktion aufmerksam gemacht, die von vielen Anwendern dieses Verfahrens ignoriert wird. Bei der Anwendung dieses Messverfahrens muss darauf geachtet werden, dass der Probenansatz keine Verbindungen enthält, die ebenfalls als Substrat der HRP durch Wasserstoffperoxid oxidiert werden. Diese potenziellen Substrate der Peroxidase stehen andernfalls in Anwesenheit von HRP mit dem Scopoletin in Konkurrenz um das Wasserstoffperoxid. Dementsprechend wird dann in Abhängigkeit von der Konzentration des Konkurrenzsubstrats weniger Scopoletin oxidiert, obwohl die Wasserstoffperoxid-Konzentration nicht verändert wurde. Die Anwesenheit möglicher Konkurrenzsubstrate führt folglich immer zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Wasserstoffperoxid-Gehaltes. Für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid bedeutet das, dass die untersuchte Verbindung möglicherweise nicht direkt mit Wasserstoffperoxid reagiert, sondern lediglich als Substrat der Peroxidase oxidiert wird. In diesem Fall wäre das Resultat der Messung ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzminderung, obwohl keine direkte Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und der untersuchten Verbindung stattgefunden hat. Die Detektion einer solchen Interaktion ist mit den bisher beschriebenen Vorproben nicht möglich. Verbindungen die in der Literatur häufig als Substrate der HRP benannt werden, sind Ascorbinsäure und Thiolverbindungen wie Glutathion und Acetylcystein [59, 79]. Im Folgenden sollten nun alle Substanzen hinsichtlich dieser Interaktion überprüft werden, die in den bisherigen Untersuchungen eine Inhibition der Fluoreszenzminderung gezeigt haben.

3.6.1 Der Einfluss von Quecksilberacetat bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid mit Hilfe des HRP-Tests

Um unterscheiden zu können, ob eine Verbindung direkt mit Wasserstoffperoxid reagiert, oder lediglich ein Substrat der HRP ist, war es erforderlich die Verbindung mit Wasserstoffperoxid über einen festgelegten Zeitraum zu inkubieren und anschließend dem Reaktionsansatz vollständig zu entziehen bevor HRP zugesetzt wird. Corbett und Mitarbeiter beschreiben eine Möglichkeit mit der Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Glutathion quantitativ bestimmt werden kann [70]. Dabei wird dem Versuchsansatz in Abhängigkeit von der vorliegenden Glutathion-Konzentration ein Überschuss eines Quecksilber(II)-Salzes zugesetzt. Da Quecksilber(II) ein Komplexbildner für Thiolverbindungen ist, bildet es mit Glutathion einen Komplex. Glutathion wird folglich dem Reaktionsansatz entzogen. Um die Ergebnisse, die für Glutathion in den bisherigen Messungen gefunden wurden, hinsichtlich der beschriebenen Interaktion untersuchen zu können, wurde Glutathion mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit der Lösungsmittel Wasser und Acetonitril inkubiert und nach abgelaufener Inkubationszeit mit Quecksilberacetat versetzt. Ein Teil dieser Mischung wurde dem Reaktionsansatz bestehend aus Phosphatpuffer und HRP-Lösung zugesetzt. Nach 5 Minuten wurde die Probe mit Boratpuffer versetzt und vermessen, wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Zusätzlich wurde der gleiche Versuchsansatz ohne Quecksilberacetat vermessen. Da Quecksilber(II) als Übergangsmetall nicht nur Komplexe mit Thiolverbindungen ausbildet, wurden neben Glutathion auch die anderen Verbindungen untersucht, die in den bisherigen Versuchen eine Inhibition in dieser Weise gezeigt haben. Die Konzentrationen der untersuchten Verbindungen wurden dabei so gewählt, dass eine deutliche Veränderung des Messwertes im Vergleich zur Probe C beobachtet werden konnte. Für die Visualisierung der Resultate wurden die Proben A und C mitbestimmt. Dabei wurden die Proben A und C mit und ohne Quecksilber(II)-Zusatz vermessen. Hierdurch sollte bestätigt werden, dass Quecksilber(II) keinen wesentlichen Einfluss auf die Messung von Wasserstoffperoxid hat [61].

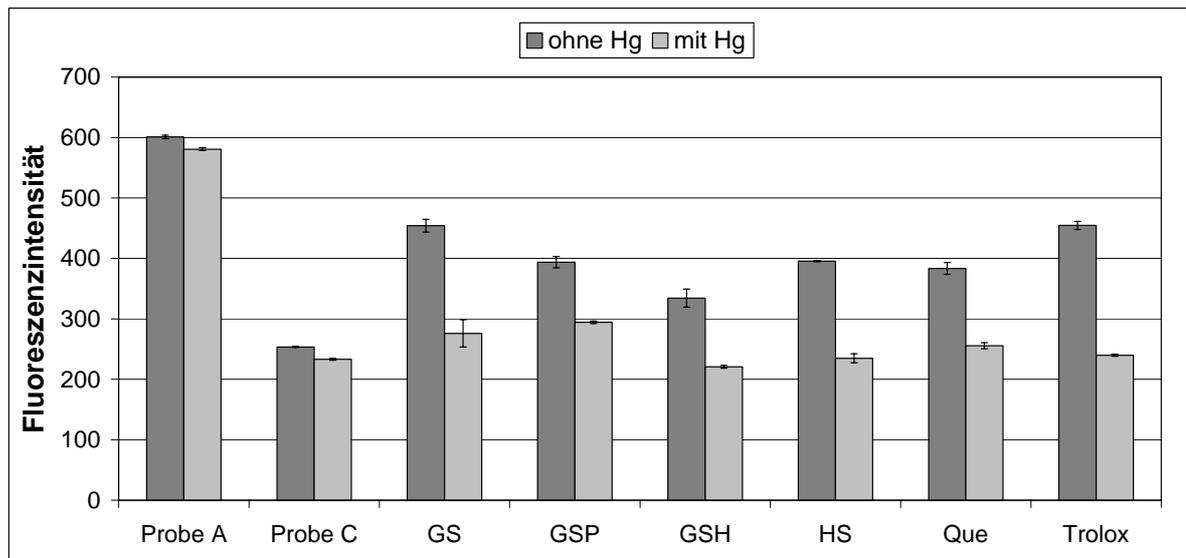


Abbildung 3-14: Einfluss von Quecksilber(II) bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid mit Hilfe des HRP-Tests

(GS = Gallussäure; GSP = Gallussäurepropylester; GSH = Glutathion; HS = Harnsäure; Que = Quercetin)

Die Vermessung der Proben A und C mit und ohne Quecksilber(II) ergab, dass in Anwesenheit von Quecksilber(II) eine geringfügige Abnahme der Fluoreszenzintensität um etwa 20 Einheiten beobachtet werden kann (Abbildung 3-14). Daraus folgt, dass durch das Übergangsmetall bei der gewählten Versuchsanordnung kein Wasserstoffperoxid zerstört wird, da dies zu einer Steigerung der Fluoreszenz bei der Probe C geführt hätte. Aus dem gleichen Grund kann auch eine Komplexbildung des Scopoletins, oder eine Vergiftung der HRP durch Quecksilber(II) ausgeschlossen werden. Die geringfügige Fluoreszenzabnahme in Anwesenheit von Quecksilber(II) beruht vermutlich auf einer für Schwermetalle typischen Fluoreszenzquenchung und ist für die durchgeführte Messreihe nicht von Bedeutung.

Die Ergebnisse der untersuchten Substanzen in Anwesenheit von Quecksilber(II), wurden mit dem Messwert der quecksilberhaltigen Probe C verglichen. Hierbei ergab sich für die Antioxidantien Glutathion, Harnsäure, Quercetin und Trolox statistisch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Probe C. Das bedeutet, dass die in den bisherigen Versuchen gefundene Inhibition der Fluoreszenzminderung nicht auf einer direkten Reaktion zwischen den untersuchten Verbindungen und Wasserstoffperoxid beruhen kann. Die in Kapitel 3.4 beschriebene Fluoreszenzänderung ist das Resultat einer Konkurrenzreaktion mit dem Scopoletin. Anstelle einer direkten Reaktion mit den untersuchten Substanzen, wird das Wasserstoffperoxid in

3 HRP-Test

einer peroxidasekatalysierten Oxidation dieser Verbindungen verbraucht. Das verbrauchte Wasserstoffperoxid steht für eine peroxidasekatalysierte Oxidation des Scopoletins folglich nicht mehr zur Verfügung. Daraus resultiert die Inhibition der Fluoreszenzminderung in Anwesenheit dieser Verbindungen.

Der Zusammenhang zwischen der Zugabe der einzelnen Reagenzien und der daraus folgenden Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität soll in der nachstehenden Übersichtsabbildung (Abbildung 3-15) verdeutlicht werden.

Probe:	Auswirkung:	Fluoreszenzintensität:
Phosphatpuffer, Wasser, Acetonitril, Scopoletin, HRP	Scopoletin fluoresziert	ca. 600 Fluoreszenzeinheiten
Phosphatpuffer, Wasser, Acetonitril, Scopoletin, HRP, H₂O₂	Scopoletin wird durch H ₂ O ₂ in Anwesenheit von HRP oxidiert „Fluoreszenzminderung“	↓
Phosphatpuffer, Wasser, Acetonitril, Scopoletin, HRP, untersuchte Substanz , H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ wird verbraucht: ⇒ weniger Scopoletin wird oxidiert „Inhibition der Fluoreszenzminderung“	↑
Phosphatpuffer, Wasser, Acetonitril, Scopoletin, HRP, Quecksilberacetat , untersuchte Substanz, H ₂ O ₂	Quecksilberacetat komplexiert die untersuchte Substanz: ⇒ weniger H ₂ O ₂ wird abgebaut ⇒ mehr Scopoletin wird oxidiert	↓

Abbildung 3-15: Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität

Bei den beiden Gallussäurederivaten Gallussäure und Gallussäurepropylester waren die ermittelten Messwerte in Anwesenheit von Quecksilber(II)acetat zwar deutlich niedriger als ohne Übergangsmetall, im Vergleich zu dem Messwert, der für die Probe C mit Quecksilber(II) gefunden wurde, bestand jedoch ein signifikanter Unterschied.

Dass die Werte, die in Anwesenheit des Quecksilbersalzes für die beiden Gallussäurederivate gefunden wurden, deutlich niedriger lagen als die

Messwerte ohne Quecksilber-Zusatz ist vermutlich ebenfalls auf die oben beschriebene Interaktion zurückzuführen. Für die Beobachtung, dass der Wert der Probe C mit Quecksilber(II) dabei nicht erreicht wurde, sind zwei Gründe denkbar: Entweder hat in diesem Fall eine direkte Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und den Gallussäurederivaten stattgefunden oder die komplexierende Wirkung von Quecksilber(II) auf die beiden Verbindungen ist nicht ausreichend. Träfe letzteres zu, so wäre der Zusatz einer größeren Menge Quecksilberacetat bei diesen beiden Verbindungen erforderlich. Dabei ist zu bedenken, dass das Quecksilber(II)-Salz bereits in einem 100 bis 150fachen Überschuss vorlag. Dennoch wurde die beschriebene Messreihe für die beiden Gallussäurederivate mit der doppelten Quecksilberacetat-Konzentration wiederholt. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass die Diskrepanz zwischen den Werten der beiden Gallussäurederivate und der Probe C auf einer ungenügenden Komplexbildung mit dem Quecksilber(II) beruht.

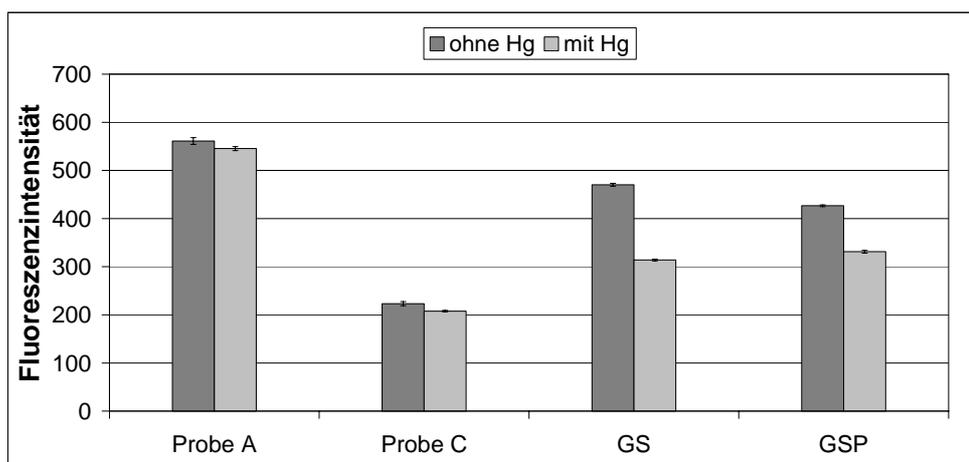


Abbildung 3-16: Gallussäure und Gallussäurepropylester mit doppelter Quecksilber(II)-Konzentration (GS = Gallussäure; GSP = Gallussäurepropylester)

Auch die doppelte Quecksilberacetat-Konzentration führte bei den Proben A und C lediglich zu einer geringfügigen Abnahme der Fluoreszenzintensität um 15 bis 20 Einheiten. Folglich muss auch bei dieser Quecksilber(II)-Konzentration mit keiner wesentlichen Interaktion gerechnet werden. Die Verdopplung der Quecksilber(II)-Konzentration hat zu keiner wesentlichen Veränderung der Ergebnisse bei den beiden Gallussäurederivaten geführt. Auch hier wird der Wert der Probe C nicht erreicht. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu den anderen untersuchten Substanzen die

Wirkung der beiden Gallussäurederivate durch den Zusatz von Quecksilber(II) nicht vollständig aufgehoben werden kann. Folglich kann eine geringfügige Zerstörung des Wasserstoffperoxids durch die beiden Gallussäurederivate nicht ausgeschlossen werden. Diese Beobachtungen schließen jedoch nicht aus, dass Gallussäure und Gallussäurepropylester Substrate der HRP sind und aufgrund dessen mit dem Messverfahren interagieren. Für eine abschließende Aussage bezüglich der Reaktion zwischen den Gallussäurederivaten und Wasserstoffperoxid sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Um zu zeigen, dass die Änderung der Fluoreszenzintensität bei Zusatz von Quecksilberacetat konzentrationsabhängig verläuft, wurde exemplarisch eine Messreihe mit Trolox und unterschiedlichen Mengen Quecksilberacetat-Lösung durchgeführt (Abbildung 3-17).

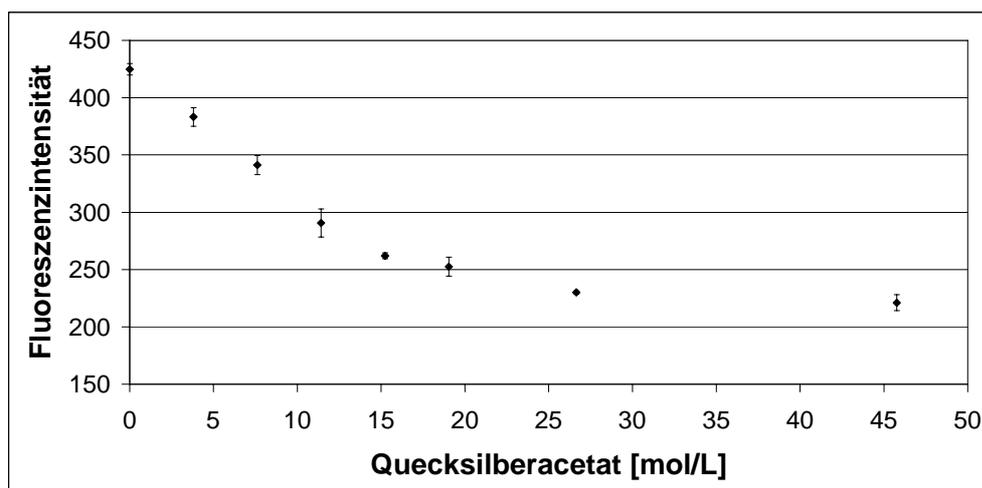


Abbildung 3-17: Quecksilberacetat-Konzentrationsreihe bei konstanter Trolox-Konzentration

3.6.2 Der Einfluss von Quecksilberacetat bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma mit Hilfe des HRP-Tests

Außerdem wurde untersucht, ob die beschriebene Interaktion auch auf die Ergebnisse zutrifft, die bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma ermittelt wurden. Blutplasma ist ein äußerst heterogenes Gemisch, welches zahlreiche antioxidativ wirksame Bestandteile enthält,

aber möglicherweise auch Verbindungen, die Substrate der HRP sind. Deshalb wurde auch beim Blutplasma der Einfluss von Quecksilberacetat auf das Messergebnis untersucht. Grundsätzlich wurde diese Versuchsreihe durchgeführt, wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Beim Blutplasma mussten jedoch einige Besonderheiten beachtet werden. Zum einen wurde das Plasma mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Folglich wurde jeder Ansatz mit dem gleichen Volumen isotoner Kochsalzlösung versetzt. Des Weiteren wurde auch hier aus Gründen der Vergleichbarkeit jedem Versuchsansatz Acetonitril zugesetzt. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Versuchen, durfte das Acetonitril jedoch nicht direkt mit dem Blutplasma vermischt werden, da ansonsten eine Trübung beobachtet werden konnte, die auf eine Denaturierung der Plasmaproteine zurückzuführen ist. Diese Trübung führte zu einer zusätzlichen Fluoreszenzminderung während der Messung. Aus diesem Grund wurde das Acetonitril der Probelösung erst zugesetzt, als alle weiteren Komponenten bereits enthalten waren, um eine ausreichende Verdünnung des Acetonitrils sicherzustellen.

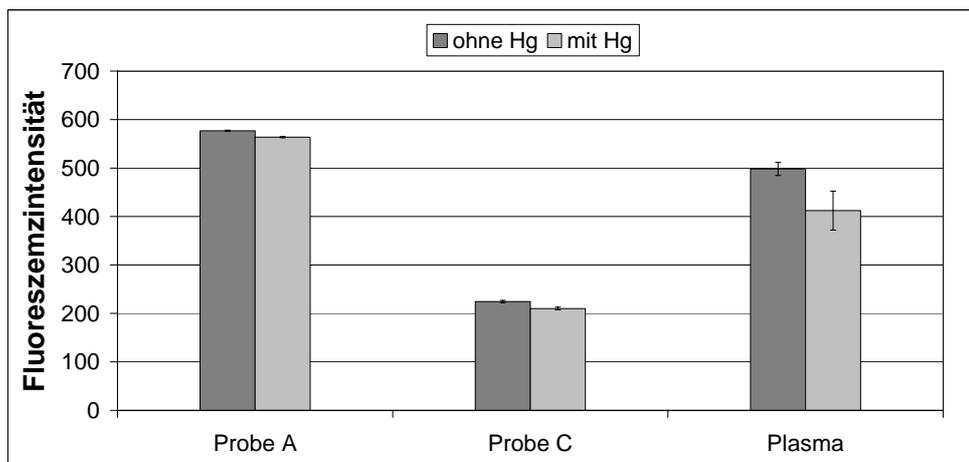


Abbildung 3-18: Einfluss von Quecksilberacetat auf die Vermessung von Blutplasma

Der Zusatz von Quecksilberacetat zu den Proben, die Plasma enthielten, führte wie bei den vorangegangenen Versuchen zu einer Absenkung der Messwerte im Vergleich zu der Plasmaprobe, die kein Quecksilber enthielt. Diese Absenkung war jedoch nur sehr gering und der Wert der quecksilberhaltigen Probe C, wurde bei weitem nicht erreicht. Da der Quecksilberzusatz zu einer Absenkung der Messwerte geführt hat, ist davon auszugehen, dass das Blutplasma Substanzen enthält, die Substrate der HRP

sind und durch Quecksilberacetat komplexiert werden können. Dass trotz relativ hoher Quecksilberacetat-Konzentration der Messwert der Probe C bei weitem nicht erreicht wird, kann wie folgt erklärt werden: Entweder enthält das Blutplasma Verbindungen, die wie erwartet eine direkte Reaktion mit dem Wasserstoffperoxid eingehen und somit Antioxidantien für Wasserstoffperoxid sind oder es liegen Substanzen vor, die zwar ein Substrat der HRP sind, jedoch nicht durch Quecksilber(II) komplexiert werden können. Welcher der beiden Erklärungsversuche hier von Bedeutung ist, kann mit Hilfe des HRP-Tests nicht weiter aufgeschlüsselt werden.

3.6.3 Untersuchungen zur Reaktionsweise des Quecksilberacetats

Mit dieser Versuchsreihe sollte der Mechanismus aufgeklärt werden, mit dem die untersuchten Verbindungen durch das Quecksilberacetat dem weiteren Reaktionsverlauf entzogen werden. Um zu beweisen, dass der Quecksilber(II)-Zusatz zu einer Komplexierung der untersuchten Verbindungen führt, wurden mit einem UV/VIS-Spektralphotometer Spektren dieser Verbindungen mit und ohne Quecksilberzusatz aufgenommen. Da Quecksilberacetat lediglich unterhalb von 250 nm eine Absorption zeigt (Abbildung 3-19), kann eine Absorptionsänderung oberhalb von 250 nm in Anwesenheit von Quecksilber(II) auf eine Komplexierung der jeweiligen Substanz zurückgeführt werden.

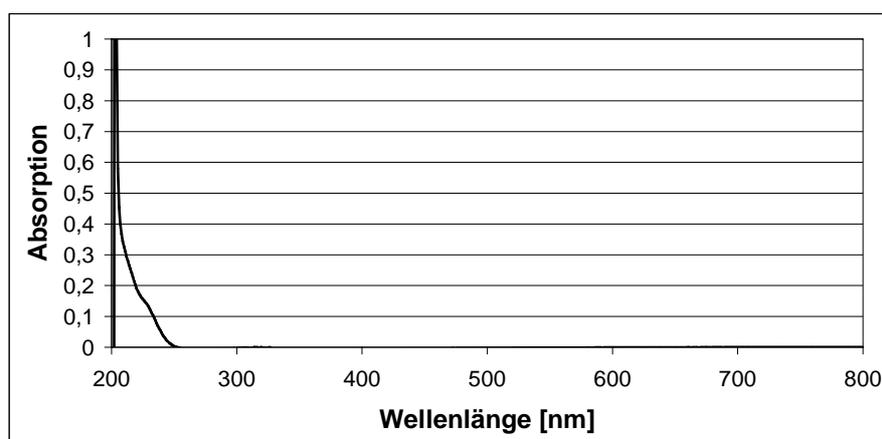


Abbildung 3-19: Absorptionsspektrum einer Quecksilberacetat-Lösung

3 HRP-Test

Auf diese Weise sollten die Verbindungen Gallussäure, Gallussäurepropylester, Harnsäure, Quercetin und Trolox hinsichtlich der Komplexbildung mit Quecksilber(II) untersucht werden. Da Glutathion aufgrund des fehlenden π -Elektronensystems keine Absorption oberhalb von 250 nm aufweist, wurde auf die Aufnahme eines Spektrums verzichtet. Dennoch muss auch beim Glutathion von einer Komplexbildung mit Quecksilber(II) ausgegangen werden, da bekannt ist, dass Thiolverbindungen mit Schwermetallen schwerlösliche Salze bilden [80]. In Anwesenheit größerer Mengen Acetonitril in Verbindung mit dem Quecksilberacetat konnte eine deutliche Trübung der Lösung beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde auf Acetonitril als Lösungsmittel verzichtet. Alle untersuchten Verbindungen wurden in einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst. Harnsäure und Trolox konnten unter entsprechender Wärme- einwirkung ebenfalls in Lösung gebracht werden. Bei dem Versuch Quercetin in der Hitze zu lösen, konnte eine Verfärbung der Suspension von grün nach braun beobachtet werden. Diese Suspension wurde abfiltriert und die Lösung vermessen. Das daraus resultierende Spektrum zeigte keine wesentliche Absorption oberhalb von 250 nm. Hieraus kann geschlossen werden, dass in dem Puffer lediglich Abbauprodukte des Quercetins gelöst vorlagen, die möglicherweise beim Erhitzen entstanden sind, da bei einem Polyphenol wie Quercetin mit Absorptionsbanden im längerwelligen Bereich gerechnet werden muss. Aus diesem Grund wurde auf eine spektral- photometrische Untersuchung des Flavonoids verzichtet.

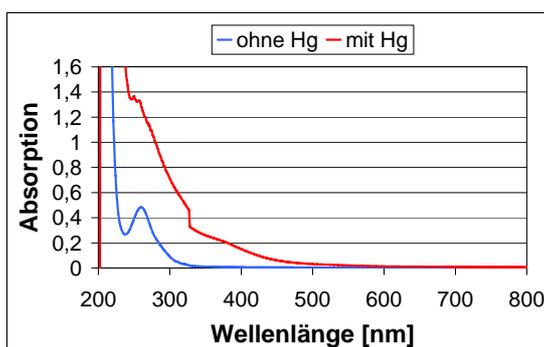


Abbildung 3-20: Gallussäure

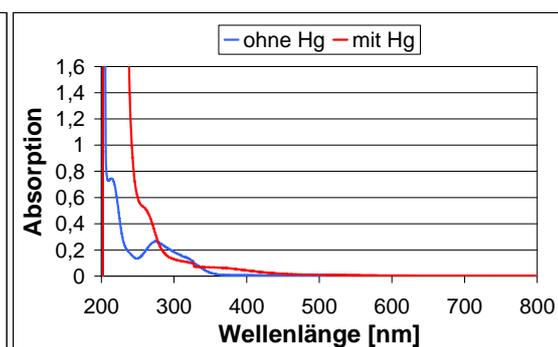


Abbildung 3-21: Gallussäurepropylester

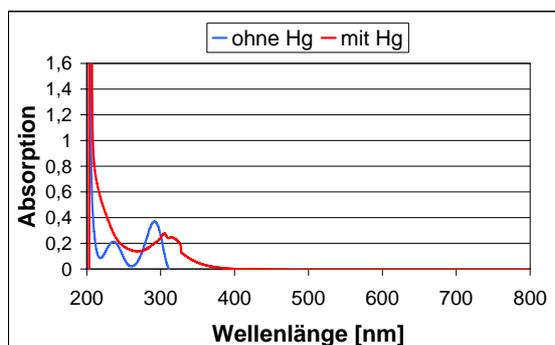


Abbildung 3-22: Harnsäure

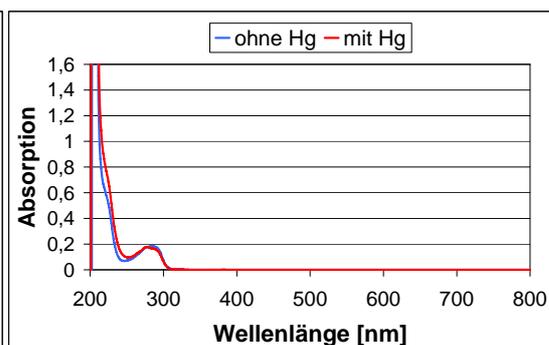


Abbildung 3-23: Trolox

Bei allen Verbindungen, mit Ausnahme von Trolox, war in Anwesenheit von Quecksilberacetat eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsspektren erkennbar (Abbildung 3-20 bis 3-23). Diese Beobachtungen deuten auf die Ausbildung eines Komplexes zwischen den untersuchten Substanzen und Quecksilber(II) hin. Trolox zeigte in Anwesenheit von Quecksilberacetat keine Veränderung im Absorptionsspektrum. Aus dieser Beobachtung folgt, dass Trolox entweder keinen Komplex mit Quecksilber(II) ausbildet, oder es entsteht ein Komplex, der zu keiner Veränderung im Absorptionsspektrum der Substanz führt. Für den Fall, dass Trolox keinen Komplex mit Quecksilber(II) ausbildet, ist der Mechanismus, mit dem Trolox dem Reaktionsansatz entzogen wird unbekannt.

3.7 Spektralphotometrische Untersuchungen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid mit und ohne HRP Zusatz

Ziel dieser Versuchsreihe war mit Hilfe der UV-VIS-Spektroskopie herauszufinden, ob nach einer ausreichenden Inkubationszeit eine direkte Reaktion zwischen den untersuchten Substanzen und Wasserstoffperoxid stattfindet. Außerdem sollte geklärt werden, ob der Zusatz der HRP einen Einfluss auf diese Reaktion hat und somit, ob die Verbindungen Substrate der HRP sind. Mit dieser Versuchsreihe ist lediglich eine qualitative Unterscheidung möglich, ob eine Verbindung ein Antioxidans für Wasserstoffperoxid darstellt. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität einer Verbindung, also eine quantitative Aussage darüber, wie viel Wasserstoffperoxid pro Zeiteinheit durch diese Substanz zerstört wird, ist nicht möglich. Der Unterschied zu den bisher durchgeführten

Untersuchungen ist, dass bei dieser Versuchsreihe nicht die Zerstörung des Wasserstoffperoxids, sondern eine Veränderung im UV-VIS-Spektrum der untersuchten Substanz als Indikator für eine positiv verlaufene Reaktion herangezogen wird.

Bei dieser Versuchsreihe sollten zunächst wieder die Verbindungen untersucht werden, die in Kapitel 3.4 eine Inhibition der Fluoreszenzminderung gezeigt haben. Da Glutathion, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, keine Absorption oberhalb von 250 nm zeigt, wurde auch hier auf die Untersuchung des Thiols verzichtet. Da bei dieser spektral-photometrischen Untersuchung aufgrund der geringeren Empfindlichkeit der Methode im Vergleich zu den fluorimetrischen Bestimmungen in Kapitel 3.2 konzentriertere Lösungen erforderlich waren, wurde auf die Verwendung von Acetonitril verzichtet, um eine Denaturierung der HRP auszuschließen. Daraus folgt, dass auch bei dieser Messreihe auf die Untersuchung des Polyphenols Quercetin, aufgrund der zu geringen Wasserlöslichkeit verzichtet werden musste. Folglich konnten lediglich Gallussäure, Gallussäurepropylester, Harnsäure und Trolox hinsichtlich der Reaktion mit Wasserstoffperoxid mit und ohne HRP untersucht werden. Alle Verbindungen wurden in einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst. Bei den Verbindungen Harnsäure und Trolox war eine moderate Erwärmung der Lösung erforderlich, um eine klare Lösung zu erhalten.

Für jede dieser Verbindungen wurde ein Ansatz vermessen, bei dem ausschließlich Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde und ein Ansatz bei dem die untersuchte Substanz sowohl mit HRP als auch mit Wasserstoffperoxid inkubiert wurde. Um auszuschließen, dass bereits ohne Einwirkung von Wasserstoffperoxid oder HRP eine Veränderung des UV/VIS-Spektrums durch Autoxidation oder ähnliche Vorgänge stattfindet, wurde für jede Substanz ein weiterer Ansatz vermessen, bei dem auf den Zusatz von Wasserstoffperoxid und HRP verzichtet wurde. Diese drei Ansätze wurden bei Raumtemperatur inkubiert und über 30 Minuten in bestimmten Abständen spektralphotometrisch vermessen. Die Lösungen der untersuchten Verbindungen wurden unmittelbar vor der Verwendung hergestellt.

Bevor mit der Vermessung der Substanzen begonnen werden konnte, wurde ein Absorptionsspektrum von Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer, mit und ohne Zusatz von HRP, aufgenommen. Diese Absorptionsspektren zeigten keine Absorption oberhalb von 250 nm. Folglich kann in dieser

3 HRP-Test

Versuchsreihe jede Veränderung des Absorptionsspektrums oberhalb von 250 nm auf eine strukturelle Modifikation der untersuchten Verbindungen zurückgeführt werden. Anhand dieser Veränderung kann ermittelt werden, ob die untersuchte Verbindung direkt mit Wasserstoffperoxid reagiert, oder ob die Reaktion ausschließlich in Anwesenheit der HRP abläuft.

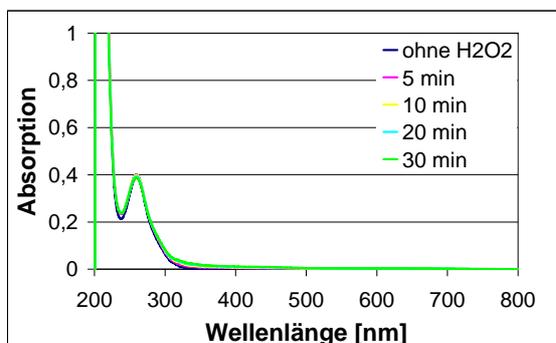


Abbildung 3-24: Gallussäure mit Wasserstoffperoxid

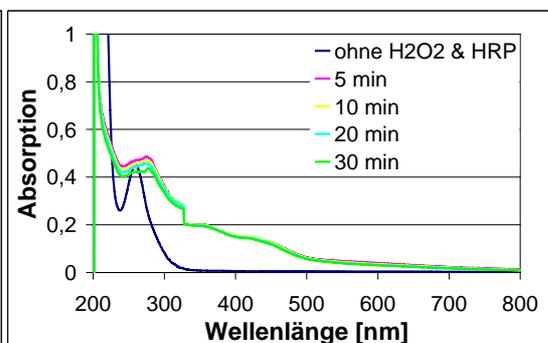


Abbildung 3-25: Gallussäure mit Wasserstoffperoxid und HRP

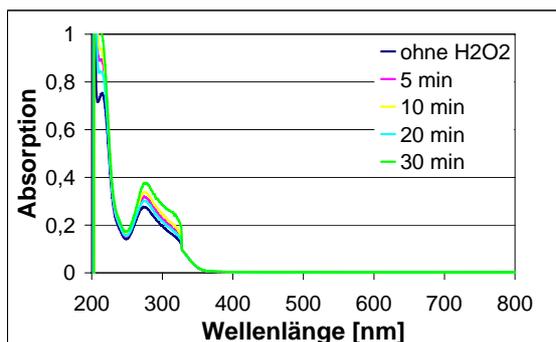


Abbildung 3-26: Gallussäurepropylester mit Wasserstoffperoxid

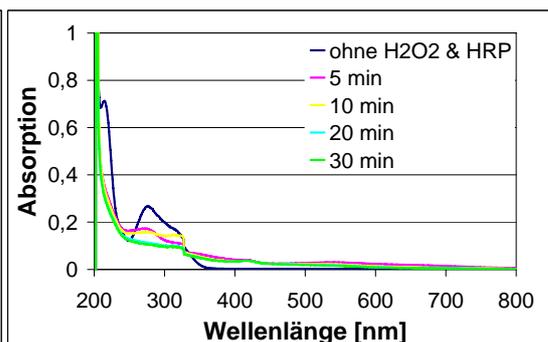


Abbildung 3-27: Gallussäurepropylester mit Wasserstoffperoxid und HRP

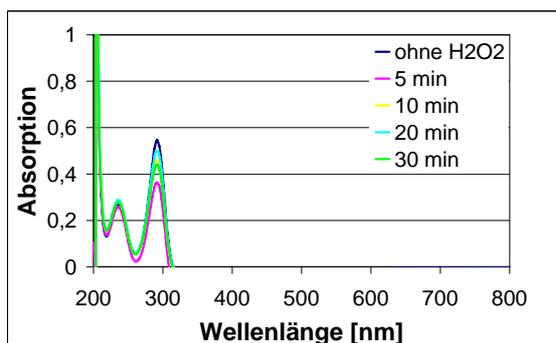


Abbildung 3-28: Harnsäure mit Wasserstoffperoxid

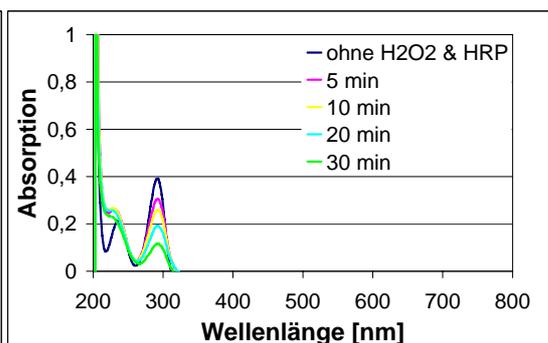


Abbildung 3-29: Harnsäure mit Wasserstoffperoxid und HRP

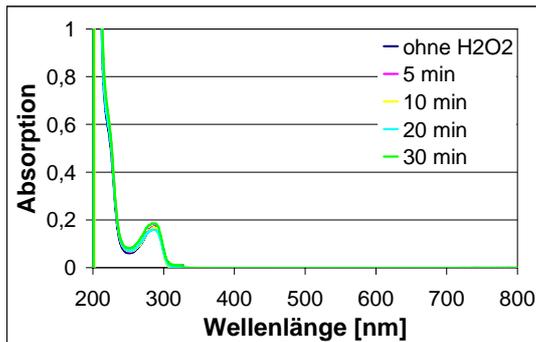


Abbildung 3-30: Trolox mit Wasserstoffperoxid

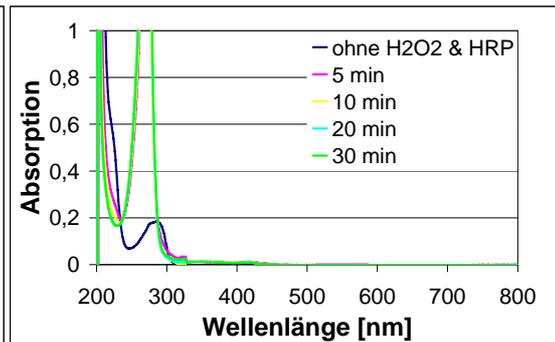


Abbildung 3-31: Trolox mit Wasserstoffperoxid und HRP

Die Absorptionsspektren der Proben, die weder Wasserstoffperoxid noch HRP enthielten werden an dieser Stelle nicht abgebildet, da innerhalb der 30 Minuten bei keiner der Verbindungen eine Veränderung des Spektrums beobachtet werden konnte. Wurde den untersuchten Verbindungen lediglich Wasserstoffperoxid zugesetzt, waren nur geringe Schwankungen in der Absorption feststellbar. An der Lage der Absorptionsbanden änderte sich jedoch nichts. Die Amplitude der beschriebenen Schwankungen war bei den durchgeführten Messungen sehr unterschiedlich. Besonders ausgeprägt konnten diese Schwankungen beim Gallussäurepropylester und bei der Harnsäure beobachtet werden. Bei genauer Betrachtung der Messzeitpunkte bei diesen beiden Verbindungen fällt jedoch auf, dass diese keine zeitlich korrelierende Reihenfolge bilden. Da keine Veränderung des Absorptionsspektrums und keine Verschiebung der Absorptionsbanden beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass die vermessenen Substanzen chemisch nicht verändert wurden. Daraus folgt, dass keine der untersuchten Verbindungen direkt mit Wasserstoffperoxid reagiert hat. Eine mögliche Begründung für die beobachteten Schwankungen in der Amplitude der Absorptionsbanden von Gallussäurepropylester und Harnsäure könnten Schwankungen in der Lampenintensität des Spektralphotometers sein.

Wenn Wasserstoffperoxid und HRP zugesetzt wurden, konnte bei allen Verbindungen eine deutliche Veränderung im Absorptionsspektrum beobachtet werden. Das bedeutet, dass alle Verbindungen chemisch verändert wurden. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich, dass in Anwesenheit der HRP eine Oxidation der Substanzen begünstigt wird, die ohne dieses Enzym nicht stattfindet. Daraus folgt, dass die Substanzen Gallussäure, Gallussäurepropylester, Harnsäure und Trolox Substrate der HRP sind und folglich beim HRP-Test mit dem Scopoletin in

Konkurrenz um das vorhandene Wasserstoffperoxid stehen. Eine direkte Reaktion mit Wasserstoffperoxid in Abwesenheit der HRP findet hingegen nicht statt.

3.8 Diskussion

3.8.1 Diskussion der Methode

Man kann den Ergebnissen der Validierung entnehmen, dass das beschriebene Verfahren eine präzise Bestimmung sehr kleiner Wasserstoffperoxid-Konzentrationen bis in den nM-Bereich ermöglicht. Aufgrund der geringen Substratspezifität der HRP gegenüber dem Detektormolekül Scopoletin muss jedoch bei der Untersuchung heterogener Probelösungen, auf die Anwesenheit möglicher Konkurrenzsubstrate geachtet werden. Diese Verbindungen können anstelle des Scopoletins in einer peroxidasekatalysierten Reaktion durch das vorhandene Wasserstoffperoxid oxidiert werden. Die Folge daraus ist eine Unterschätzung der tatsächlichen Wasserstoffperoxid-Konzentration, da nur der Anteil des vorhandenen Wasserstoffperoxids detektiert wird, der mit dem Scopoletin reagiert. Das Ausmaß der Abweichung von der tatsächlichen Wasserstoffperoxid-Konzentration ist folglich abhängig von der Konzentration des Konkurrenzsubstrats und der Affinität dieser Verbindung zum Enzym.

Aus diesen Gründen, ist das beschriebene Verfahren für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid nicht geeignet. Jede Verbindung, deren antioxidative Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid ermittelt werden soll, müsste zunächst hinsichtlich dieser Interaktion untersucht werden. Das bedeutet, dass jede Substanz zunächst spektralphotometrisch in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und HRP vermessen werden müsste, um festzustellen, ob bei der fluorimetrischen Messung Interaktionen zu erwarten sind. Die spektralphotometrischen Messungen in Kapitel 3.7 haben ergeben, dass vier der ursprünglich zehn untersuchten Substanzen Substrate der HRP sind.

Die spektralphotometrische Untersuchung von Glutathion und Quercetin war nicht möglich. Aufgrund der Ergebnisse, die in Anwesenheit von

Quecksilber(II) ermittelt wurden (Kapitel 3.6.1), muss jedoch auch hier von einer Interaktion ausgegangen werden. Hieraus folgt, dass sechs der zehn Verbindungen die hinsichtlich der antioxidativen Kapazität untersucht werden sollten, mit dem Testverfahren interagieren. Hierbei konnten keine strukturellen Ähnlichkeiten dieser Verbindungen ermittelt werden, die eine Identifizierung von Substraten für die HRP anhand der strukturellen Beschaffenheit ermöglicht. Dies wird vor allem bei einem Vergleich der beiden Flavonoide deutlich. Während Quercetin mit dem Verfahren interagiert, zeigt das strukturell verwandte Naringenin, unabhängig davon ob HRP anwesend ist, keine Reaktion.

Auch die Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma, ein mögliches Verfahren zur Ermittlung des Antioxidantien-Status von Kapillarblut, ist aufgrund dieser Interaktion wenig sinnvoll. Eine Unterscheidung, ob die Fluoreszenzänderung auf einer Reaktion zwischen einem Antioxidans und Wasserstoffperoxid basiert, oder lediglich auf einer Konkurrenzreaktion mit dem Scopoletin ist mit der beschriebenen Methode nicht möglich.

Ein weiteres Problem dieses Verfahrens ist die Vielzahl der eingesetzten Reagenzien. Bei jeder Messung werden zwei Puffer, die Scopoletin-Lösung, die HRP-Lösung, die Wasserstoffperoxid-Lösung und die Lösung der untersuchten Substanz benötigt. Die letzten drei Lösungen wurden an jedem Messtag frisch hergestellt. Neben dem Aufwand, den die Herstellung dieser Reagenzien verursacht, stellt die Zahl der unterschiedlichen Bestandteile des Messansatzes auch eine weitere Quelle möglicher Interaktionen mit den untersuchten Substanzen dar. Um diese Interaktionen auszuschließen, ist für jede Substanz die Durchführung zahlreicher Vorproben unumgänglich. Dennoch bleibt fraglich, ob durch diese Vorproben alle Interaktionen ausgeschlossen werden können.

Die spektralphotometrischen Messungen, die in Kapitel 3.7 beschrieben wurden, bieten eine sinnvolle Methode um abzuschätzen, ob eine Verbindung ein Antioxidans für Wasserstoffperoxid ist. Eine Quantifizierung der antioxidativen Kapazität ist mit diesem Verfahren jedoch nicht möglich.

Obwohl in zahlreichen Literaturstellen auf Interaktionen bei der Verwendung des HRP-Tests hingewiesen wird, wurde das beschriebene Verfahren dennoch in den Artikeln der vergangenen Jahre für die

3 HRP-Test

Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid eingesetzt. Auf eine Überprüfung der untersuchten Substanzen hinsichtlich der beschriebenen Interaktion wurde dabei zum Teil verzichtet [67, 68].

Bei dem Vorhaben die antioxidative Kapazität von nicht-steroidalen Antirheumatika mit Hilfe des HRP-Tests zu bestimmen, kamen van Antwerpen und Mitarbeiter zu dem Ergebnis, dass die zu untersuchenden Verbindungen mit dem Testverfahren interagieren [66]. Aus diesem Grund wurde stattdessen ein anderes interessantes Verfahren verwendet, welches von Miles und Grisham veröffentlicht wurde [81]. Dabei wird das Wasserstoffperoxid, welches während der Inkubation mit der untersuchten Substanz nicht zerstört wurde, mit reduziertem Glutathion in Anwesenheit der Glutathionperoxidase umgesetzt (3-1). Dabei entsteht oxidiertes Glutathion. Das nicht umgesetzte reduzierte Glutathion wird anschließend mit Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure) dem Ellmanns Reagenz versetzt (Abbildung 3-32). Die bei dieser Reaktion entstehende 5-Thio-2-nitro-benzoesäure kann spektralphotometrisch vermessen werden. Je mehr Wasserstoffperoxid durch die untersuchte Substanz zerstört wird, desto weniger Glutathion wird oxidiert. Folglich liegt mehr reduziertes Glutathion vor, welches nach Reaktion mit Ellmanns Reagenz zu einer Steigerung der Absorption führt.

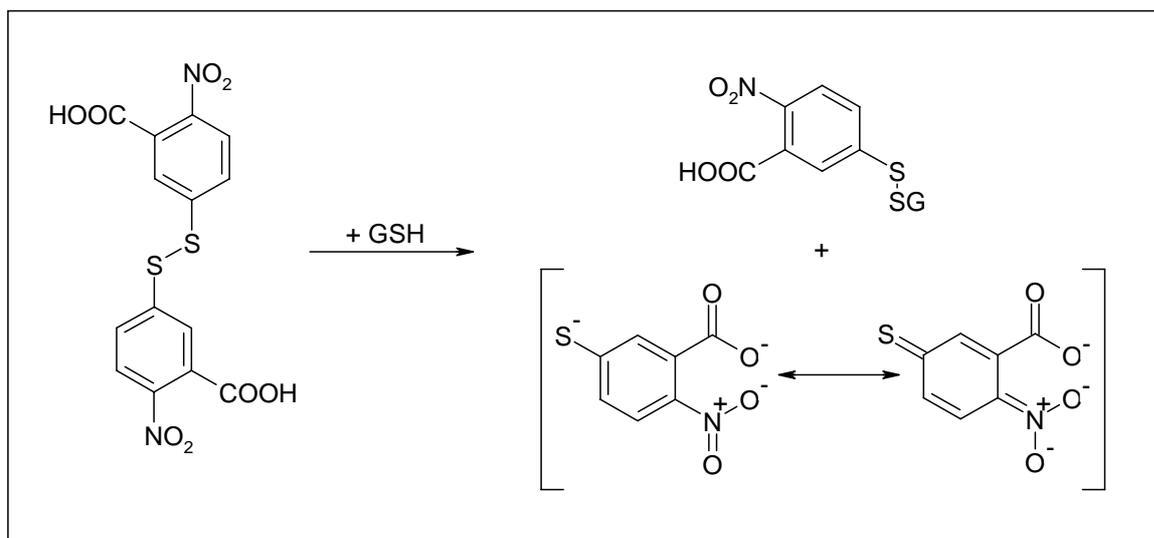


Abbildung 3-32: Reaktion von reduziertem Glutathion mit Ellmanns Reagenz

Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Substratspezifität der Glutathionperoxidase für das Glutathion als Wasserstoffdonator. Es sind andere Peroxide außer Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel möglich, aber oxidiert werden kann bei dieser katalysierten Reaktion ausschließlich Glutathion. Daraus folgt, dass die Interaktion, die sich beim HRP-Test aus der geringen Substratspezifität der HRP für Scopoletin ergeben, mit der Glutathionperoxidase nicht auftreten kann. Dennoch sind auch bei diesem Verfahren zahlreiche Nebenreaktionen denkbar, die ebenfalls zu Interaktionen führen können. Zum Beispiel könnte das oxidierte Glutathion, welches während der Umsetzung mit der Glutathionperoxidase entsteht, in einer direkten Redox-Reaktion mit der untersuchten Verbindung reduziert werden. Diese Reaktion ist denkbar, da viele Antioxidantien reduktive Eigenschaften aufweisen. Die Folge wäre eine Unterschätzung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid. Außerdem ist mit diesem Verfahren eine Untersuchung von Verbindungen mit Thiol-Gruppen unmöglich, da diese direkt mit Ellmanns Reagenz reagieren würden. Auch hier sind aufgrund der Vielzahl der verwendeten Reagenzien zahlreiche Nebenreaktionen möglich, die zu Fehleinschätzungen der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid führen können. Aufgrund dieser Bedenken wird auf eine Verwendung des Verfahrens verzichtet.

3.8.2 Diskussion der untersuchten Verbindungen

Mit Hilfe der Untersuchungen, die in diesem Kapitel durchgeführt wurden, konnte bei keiner der Verbindungen eine antioxidative Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. Nach Durchführung der Versuche in Kapitel 3.4 schienen zunächst die Verbindungen Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure, Quercetin und Trolox Antioxidantien für Wasserstoffperoxid zu sein. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, dass diese positive Reaktion lediglich auf einer Interaktion mit dem Testsystem beruhte. Durch die Untersuchungen in Kapitel 3.6 konnte bei den Verbindungen Glutathion, Harnsäure, Quercetin und Trolox eine direkte Reaktion mit Wasserstoffperoxid ausgeschlossen werden. Zunächst wurde vermutet, dass die beiden Gallussäurederivate geringe antioxidative Eigenschaften gegenüber Wasserstoffperoxid aufweisen. Diese

3 HRP-Test

Vermutung wurde jedoch durch die spektralphotometrischen Bestimmungen in Kapitel 3.7 nicht bestätigt. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass keine der Verbindungen Gallussäure, Gallussäurepropylester, Harnsäure und Trolox direkt mit Wasserstoffperoxid reagiert. In Anwesenheit von HRP und Wasserstoffperoxid konnte jedoch bei allen vier Verbindungen eine Veränderung im Absorptionsspektrum beobachtet werden. Hieraus folgt, dass diese Verbindungen Substrate der HRP sind und folglich nicht mit dem HRP Test vermessen werden können.

Die Untersuchungen in Kapitel 3.4 haben ergeben, dass Ascorbinsäure in wässriger Lösung Wasserstoffperoxid generiert. Dieses Ergebnis bestätigt eine Veröffentlichung von Calcutt aus dem Jahre 1951 [82]. Hier wird eine Freisetzung von Wasserstoffperoxid als Ergebnis der Autoxidation von Ascorbinsäure beschrieben. Scarpa und Mitarbeitern zufolge [83], wird bei der Autoxidation der Ascorbinsäure zunächst Superoxidradikalanion freigesetzt (3-2), welches im Anschluss durch Ascorbat (3-3) oder Monodehydroascorbinsäure (3-4) zum Wasserstoffperoxid reduziert wird:

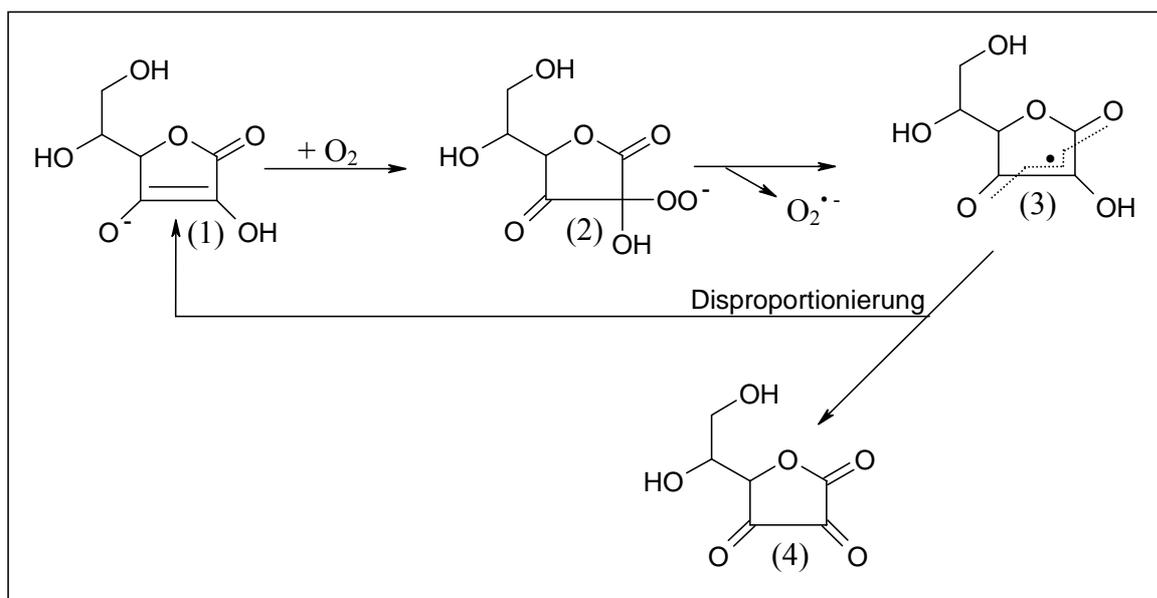


Abbildung 3-33: Autoxidation von Ascorbinsäure

Der Mechanismus der Superoxidradikalanion-Freisetzung (3-2) wurde 1997 durch Miyake und Mitarbeitern aufgeklärt [84]. In dieser Veröffentlichung wird beschrieben, dass Triplett-Sauerstoff in einer Weise mit dem Ascorbat (1) reagieren kann (Abbildung 3-33), die eher für Singulett-Sauerstoff bekannt ist. Diese Reaktion führt zum Peroxyanion der Ascorbinsäure (2), welches unter Superoxidradikalanion-Freisetzung zur Monodehydroascorbinsäure (3) zerfällt. Im Anschluss disproportioniert die Monodehydroascorbinsäure (3) zum Ascorbat (1) und zur Dehydroascorbinsäure (4). Es wird noch ein weiterer Reaktionsweg beschrieben, bei dem das Sauerstoffaddukt der Ascorbinsäure in L-Threonolacton und Oxalsäure zerfällt. Die erstgenannte Reaktion, die mit der Freisetzung von Superoxidradikalanion einhergeht, ist jedoch der Hauptreaktionsweg der Ascorbinsäure-Autoxidation.

4 Titan-Test

4.1 Grundlagen des Messverfahrens

Die Recherche nach weiteren Methoden mit denen die antioxidative Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid ermittelt werden kann, führte zu einem Artikel von Wang und Mitarbeitern [85]. In diesem Artikel wurden unterschiedliche Beerensorten hinsichtlich der antioxidativen Kapazität in Bezug auf die reaktiven Sauerstoffspezies Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal und Singulett-Sauerstoff überprüft. Zusätzlich zu den unterschiedlichen pflanzlichen Proben, wurden verschiedene Antioxidantien untersucht, die laut Verfasser zum Teil Inhaltsstoffe dieser Beeren sind. Dabei wurden unter anderem die Antioxidantien Ascorbinsäure und Glutathion ausgewählt, die auch in dieser Arbeit Verwendung fanden. Außerdem wurde die antioxidative Kapazität von α -Tocopherol ermittelt. Anstelle des α -Tocopherols wurde bei der vorliegenden Arbeit das wasserlösliche Vitamin E - Derivat Trolox untersucht. In dem Artikel wird für jede der vier reaktiven Sauerstoffspezies eine quantitative Bestimmungsmethode beschrieben, mit der der Anteil des jeweiligen Oxidans bestimmt wurde, der während der Inkubationszeit mit dem Pflanzensaft bzw. mit dem Antioxidans nicht zerstört wurde. Interessant für diese Arbeit ist die Methode mit der die antioxidative Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid ermittelt wurde. Diese Methode beruht auf einer einfachen komplexometrischen Reaktion, die in der qualitativen anorganischen Analytik von Titan(IV) Verbindungen Verwendung findet. Bei dieser Reaktion reagieren Wasserstoffperoxid und Titan(IV) in saurer Lösung zum orange-gelben Peroxotitan-Kation (4-1) [86].



Diese Reaktion erschien erstmalig im Zusammenhang einer spektralphotometrischen Wasserstoffperoxid-Bestimmung in den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts [87, 88]. Für die Herstellung des Titan-Reagenz wurde zu dieser Zeit Titandioxid in konzentrierter Schwefelsäure suspendiert und bei 150°C erhitzt. Da mit dieser Methode das Titanoxid

nicht vollständig in Lösung gebracht werden konnte, musste die Lösung vor Gebrauch filtriert werden. Die Herstellung des Titan-Reagenz wurde im Laufe der Jahre weiter modifiziert, so dass in später veröffentlichten Artikeln hauptsächlich Titan-tetrachlorid [85, 89] und Kaliumtitanoxidoalat-Dihydrat [90-92] Verwendung fanden. Außerdem wurden in zahlreichen Artikeln die Einflussfaktoren des Messsystems untersucht. Es wurde überprüft, welche Ionen zu Interaktionen mit dem Messsystem führen. Dabei stellte sich vor allem die Anwesenheit von Fluoridionen als problematisch heraus, da sich in Anwesenheit des Halogenids das stabile Fluorotitanat TiF_6^{2-} bildet [90]. Die beschriebenen Interaktionen sind jedoch für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid nicht von Bedeutung. Neben dem Titan(IV) bilden auch Salze von Vanadium und Chrom Komplexe mit Wasserstoffperoxid [92]. Da Chrom(VI)-peroxid jedoch nicht besonders stabil ist und die photometrische Auswertung des Peroxoprodukt des Vanadiums schwierig ist, wird in der Regel das Titan(IV) zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid verwendet. Aufgrund des relativ kleinen Extinktionsfaktors des Titan(IV)-Wasserstoffperoxid-Komplexes, werden in einigen Veröffentlichungen Verbindungen wie Xylenolorange [90, 93] oder 4-(2-Pyridylazo)resorcinol [94] zugesetzt, um die Empfindlichkeit der Probe zu erhöhen. Außerdem kann durch diese Maßnahme eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums erreicht werden, wenn bei heterogenen Proben weitere Substanzen anwesend sind, die ebenfalls im Bereich des Peroxotitan-Komplexes eine Absorption zeigen. Auf den Zusatz einer solchen Verbindung soll hier verzichtet werden, um mögliche Interaktionen mit den untersuchten Verbindungen auszuschließen. Ein wichtiger Faktor bei der quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid mit dieser Methode ist der pH-Wert der Lösung. Mori und Mitarbeiter haben diesbezüglich umfangreiche Untersuchungen durchgeführt [95] und festgestellt, dass bei steigendem pH-Wert eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet werden kann. Die Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Absorption bei einer festen Wellenlänge von 415 nm führten zu dem Ergebnis, dass mindestens vier unterschiedliche Komplexe ausgebildet werden. Durch den Zusatz von Ethanol wurden diese Komplexe bei den pH-Bereichen <2, 3-6, 7-9 und >10 gefällt und weiter charakterisiert. Alle Präzipitate waren löslich in

4 Titan-Test

Mineralsäuren. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Mori und Mitarbeitern wurden in der Tabelle 4-1 zusammengefasst.

pH	angenommene Struktur	Farbe	Löslichkeit (H ₂ O)	Eigenschaften
<2	[Ti(OH) ₂ (H ₂ O)(H ₂ O ₂)] ²⁺	orange-gelb	leicht löslich	hygroskopisch
3-6	[Ti(OH) ₃ (H ₂ O ₂)] ⁺	gelb	schwer löslich	instabil
7-9	[Ti(OH) ₃ (OOH)]	schwach gelb	unlöslich	stabil
>10	[Ti(OH) ₂ (O ₂) ₂] ²⁻	farblos	leicht löslich	hygroskopisch

Tabelle 4-1: Eigenschaften des mit Ethanol gefällten Präzipitats

Um mit diesem Verfahren die antioxidative Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid zu bestimmen, sollte Wasserstoffperoxid zunächst mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert werden. Nach abgelaufener Inkubationszeit sollte der Probenansatz im sauren Milieu mit dem Titanreagenz versetzt und spektralphotometrisch vermessen werden. Da jedoch möglich ist, dass einige der zu untersuchenden Verbindungen ebenfalls zwischen 410 und 420 nm eine Absorptionsbande aufweisen, wurde ein Verfahren angewendet, welches von Patterson und Mitarbeitern beschrieben wurde [94]. Dabei wird der Titanperoxo-Komplex durch Alkalisierung der Lösung gefällt. Anschließend kann das Präzipitat gewaschen und durch Zusatz von Schwefelsäure wieder in Lösung gebracht werden. Diese Vorgehensweise bietet die Möglichkeit störende Probenbestandteile abzutrennen.

In diesem Kapitel sollten die gleichen Verbindungen wie im vorangegangenen Kapitel hinsichtlich der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid untersucht werden.

4.2 Durchführung

Um sowohl hydrophile als auch lipophile Verbindungen mit diesem Verfahren untersuchen zu können, wurden dem Versuchsansatz, wie in Kapitel 3, Wasser und Acetonitril als Lösungsmittelgemisch zugesetzt. Zunächst sollte Titan-tetrachlorid für die Herstellung des Titanreagenz verwendet werden. Aufgrund der heftigen Reaktion beim Kontakt mit Wasser und der daraus resultierenden starken Wärmeentwicklung wurde

anstelle von Titan-tetrachlorid das Kaliumtitanoxidoxalat als Titanquelle verwendet. Kaliumtitanoxidoxalat wurde durch Zusatz 1 molarer Schwefelsäure in Lösung gebracht.

Für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität wurde die zu untersuchende Substanz zunächst mit Wasserstoffperoxid inkubiert. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril und Wasser verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe mit dem Titanreagenz versetzt und anschließend mit Ammoniak alkalisiert. Die Alkalisierung führte zu einer Fällung des Titanperoxo-Komplexes. Nach Zentrifugation der entstandenen Suspension wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Um störende Bestandteile des Probenansatzes abzutrennen, wurde in Wasser resuspendiert, zentrifugiert und abpipettiert. Dieser Waschschrift wurde anschließend mit Acetonitril anstelle von Wasser wiederholt, um auch lipophile Verbindungen abtrennen zu können. Das noch feuchte Präzipitat wurde mit Hilfe einer beheizbaren, evakuierbaren Zentrifuge zur Trockene eingengt. Der aufgereinigte Rückstand wurde anschließend in halbkonzentrierter Schwefelsäure gelöst und spektral-photometrisch bei dem ermittelten Absorptionsmaximum des Peroxotitan-Komplexes (Kapitel 4.3.1) vermessen. Alle Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Auf den Zusatz von Puffern wurde aufgrund der beabsichtigten starken pH-Verschiebungen bei dieser Versuchsreihe verzichtet.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Bestimmung des Absorptionsmaximums

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum des Peroxotitan-Komplexes aufgenommen, um das Absorptionsmaximum festzulegen. Die Herstellung der Probelösung erfolgte wie in Kapitel 4.2 beschrieben, lediglich auf den Zusatz der zu untersuchenden Substanzen wurde verzichtet. Sobald der Probe, die bereits Wasserstoffperoxid enthielt, das Titanreagenz zugesetzt wurde, färbte sich die Lösung gelb-orange. Unmittelbar nach der Alkalisierung mit Ammoniak bildete sich ein weißer Niederschlag, der mit

4 Titan-Test

einer vollständigen Entfärbung der Lösung einherging. Das getrocknete, weiße bis schwach gelbe Präzipitat, welches nach Durchführung der Waschschriffe gewonnen wurde, löste sich nur langsam in der halbkonzentrierten Schwefelsäure. Die Lösung wurde im Anschluss spektralphotometrisch vermessen. Das Absorptionsmaximum dieser Lösung lag bei 419 nm (Abbildung 4-1).

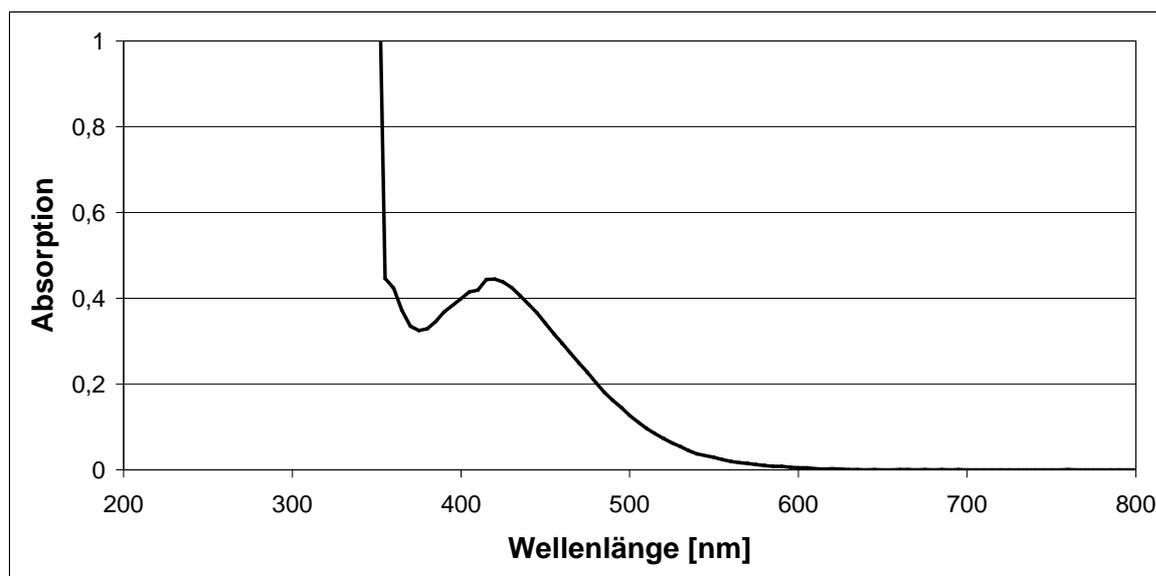


Abbildung 4-1: Absorptionsspektrum des Peroxotitankomplexes

4.3.2 Überprüfung der Linearität

Um zu überprüfen, ob das beschriebene Verfahren trotz der Waschschriffe eine lineare Auswertung der Wasserstoffperoxid-Konzentration ermöglicht, wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe mit acht Konzentrationsniveaus vermessen.

Die Abszisse in Abbildung 4-2 gibt die Wasserstoffperoxid-Konzentration des Probenansatzes an, bevor der Peroxotitankomplex mit Ammoniak gefällt wurde. Somit entspricht die angegebene Konzentration nicht der tatsächlichen Konzentration der Lösung die spektralphotometrisch vermessen wurde. Die vermessene Lösung kann aufgrund der Waschschriffe lediglich einen Anteil des anfänglich zugesetzten Wasserstoffperoxids enthalten. Dies ist jedoch für die hier durchgeführte Versuchsreihe nicht von Bedeutung, solange zwischen der ursprünglichen Wasserstoffperoxid-

4 Titan-Test

Konzentration des Probenansatzes und der gemessenen Absorption eine lineare Beziehung besteht.

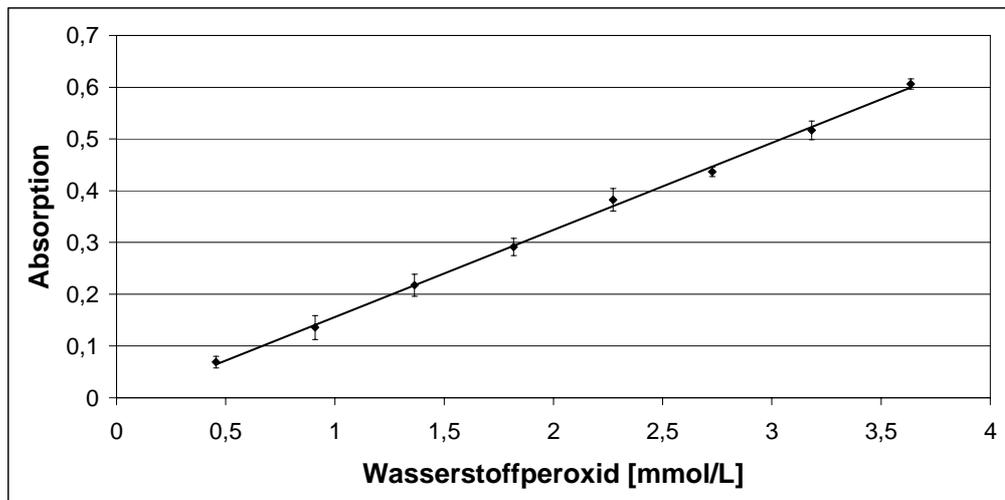


Abbildung 4-2: Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe zur Bestimmung der Linearität

Die Dintest[®]-Auswertung für die lineare Regression, so wie die Ergebnisse des Mandel-Tests befinden sich im experimentellen Teil (Kapitel 11).

Die hier durchgeführten Linearitätsuntersuchungen ergeben einen Korrelationskoeffizienten für eine lineare Korrelation von 0,9992. Dem F-Test nach Mandel zufolge arbeitet das beschriebene Verfahren linear. Folglich führen die Waschschrte zu keiner Beeinflussung der Linearität des Testverfahrens.

4.3.3 Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid

Im Folgenden sollten die Verbindungen Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure, Melatonin, Naringenin, Quercetin, Retinol und Trolox hinsichtlich der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid untersucht werden. Die erste Verbindung, die mit dieser Methode untersucht werden sollte, war das hydrophilere Vitamin E - Derivat Trolox. Dazu wurde Trolox, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit der beiden

4 Titan-Test

Lösungsmittel Acetonitril und Wasser inkubiert und anschließend mit dem Titanreagenz versetzt. Anstelle der erwarteten gelb-orange Färbung der Lösung, die auf die Ausbildung des Peroxotitan-Komplexes hätte schließen lassen, färbte sich die Lösung intensiv rot. Zunächst wurde vermutet, dass Trolox möglicherweise durch die 1 molare Schwefelsäure - das Lösungsmittel des Titanreagenzes - zu einem farbigen Produkt oxidiert wurde. Aufgrund dieser Vermutung wurde fortan Salzsäure anstelle der oxidierenden Schwefelsäure für die Herstellung des Titanreagenzes verwendet. Jedoch zeigte sich auch mit Salzsäure eine intensive Rotfärbung der Probe. Folglich wurde diese Rotfärbung durch eine Reaktion zwischen Kaliumtitanoxid und Trolox hervorgerufen. Anschließend wurde überprüft, ob diese Farbveränderung ausschließlich durch Trolox hervorgerufen wird, oder ob auch andere Substanzen, die hier untersucht werden sollten, diese Reaktion zeigen. Aus diesem Grund wurden die Substanzen Ascorbinsäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure Naringenin, Quercetin und Trolox in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid mit dem Titanreagenz versetzt.



Abbildung 4-3: Farbveränderung bei der Reaktion ausgewählter Verbindungen mit Kaliumtitanoxidoxalat (von links nach rechts: Trolox, Ascorbinsäure, Harnsäure, Naringenin, Glutathion, Quercetin, Gallussäurepropylester, Blindwert)

Man kann der Abbildung 4-3 entnehmen, dass verglichen mit dem Blindwert bei den Proben mit den Verbindungen Trolox, Ascorbinsäure, Naringenin, Quercetin und Gallussäurepropylester eine deutliche Farbveränderung beobachtet werden konnte. Der Blindwert enthielt lediglich das Titanreagenz, sowie die beiden Lösungsmittel Acetonitril und Wasser. Der Zusatz des Titanreagenzes führte bei den Substanzen Harnsäure und Glutathion zu keiner Färbung der Lösung.

Da die beschriebene Farbänderung der Lösung außer bei Trolox noch bei einigen anderen Verbindungen auftrat, muss das Kaliumtitanoxidoalat für die Färbung verantwortlich sein. Da einige der Verbindungen ein reduktives Potenzial aufweisen, ist eine Reduktion des Titan(IV) zum Titan(III) denkbar. Die Reduktion von Titan(IV) zum farbigen Titan(III) wird auch in der qualitativen anorganischen Analytik als Farbnachweis für Titan(IV)-Salze beschrieben. Titan(IV) wird dabei mit elementarem Zink zum Titan(III) umgesetzt und liegt dann in wässriger Lösung als rotvioletter $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ Komplex vor [96].

4.4 Diskussion

In Abwesenheit von Reduktionsmitteln, ist das beschriebene Verfahren eine robuste Methode zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid. Die durchgeführten Versuche haben jedoch ergeben, dass diese Messmethode für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid nicht geeignet ist. Dies liegt darin begründet, dass zahlreiche potentielle Antioxidantien reduktive Eigenschaften aufweisen und deshalb das Titan(IV) zum rotvioletten Titan(III) reduzieren können. Hieraus folgt zum einen, dass nicht mehr ausreichend Titan(IV) für die Komplexbildung mit Wasserstoffperoxid zur Verfügung steht, zum anderen stört der rotviolette Titan(III)-Komplex die spektralphotometrische Quantifizierung des verbliebenen Wasserstoffperoxids. Eine Abtrennung des Titan(III)-Komplexes durch die beiden Waschschrte war nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde auf weitere Untersuchungen mit diesem Verfahren verzichtet.

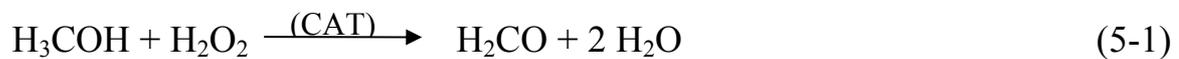
Um die Methode routinemäßig zur Gehaltsbestimmung von unbekanntem Wasserstoffperoxid-Lösungen einzusetzen, muss vor Beginn der Messungen

auf die Anwesenheit von Reduktionsmitteln getestet werden. Außerdem sollte bei der Auswahl der Analysemethode bedacht werden, dass das beschriebene Verfahren aufgrund der spektralphotometrischen Auswertung bei weitem nicht so empfindlich ist, wie zum Beispiel die fluorimetrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid mit Hilfe des HRP-Tests. Während beim HRP-Test Wasserstoffperoxid-Konzentrationen unterhalb von einem μmol pro Liter gemessen wurde, waren bei diesem Verfahren für eine lineare Auswertung Konzentrationen im mmol Bereich erforderlich.

5 Chromotropsäure-Test

5.1 Grundlagen des Messverfahrens

In einem Übersichts-Artikel von Tarpey und Fridovich wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid beschrieben, bei dem ^{14}C -Methanol durch Wasserstoffperoxid katalysiert durch Katalase zu ^{14}C -Formaldehyd oxidiert wird [79]. Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, dass das Enzym Katalase in Anwesenheit geeigneter Substrate, wie zum Beispiel Methanol oder Ethanol, Peroxidase-Eigenschaften aufweist (5-1) [3, 21].



Für die Detektion des ^{14}C -markierten Formaldehyds wäre die dauerhafte Benutzung eines Massenspektrometers unumgänglich. Um diese sehr kostenintensive Methode zu umgehen, wurde nach einer alternativen Möglichkeit gesucht, diese Reaktion auszuwerten, ohne ^{14}C -markiertes Methanol zu verwenden. Ein gängiger Nachweis für Formaldehyd in der qualitativen Analytik ist die Reaktion mit Chromotropsäure in Anwesenheit einer oxidierenden Säure zum rotvioletten Produkt (Abbildung 5-1).

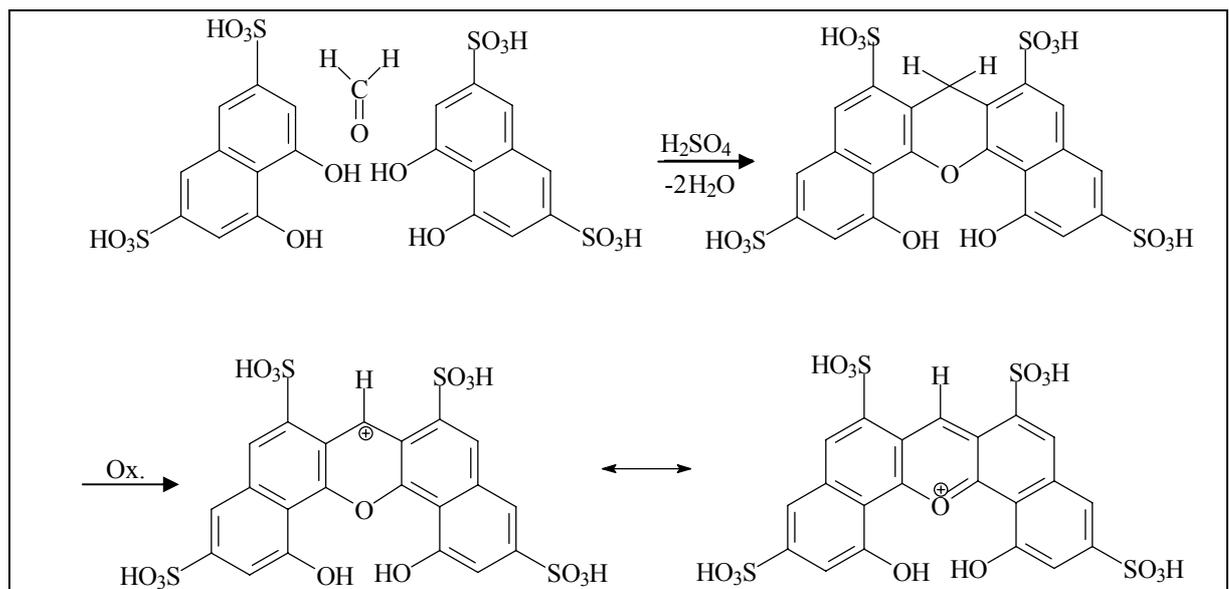


Abbildung 5-1: Nachweis von Formaldehyd mit Chromotropsäure [80]

Die Absorption des bei dieser Reaktion gebildeten 3,4,5,6-Dibenzoxanthylumkations kann spektralphotometrisch verfolgt werden. Vermutlich stellt die Oxidation des Methanols zum Formaldehyd lediglich eine Nebenreaktion dar, während der größte Teil des vorhandenen Wasserstoffperoxids zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt wird. Es reagiert folglich nur ein bestimmter Teil des Wasserstoffperoxids mit Methanol zu Formaldehyd. Wenn die Absorptionsänderung jedoch mit der Ausgangskonzentration der Wasserstoffperoxid-Lösung linear korreliert, ist das Verfahren zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid geeignet. Hieraus folgt, dass aus dieser Methode ein Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid entwickelt werden kann. Um dies zu verwirklichen wurde zunächst überprüft, ob mit dem beschriebenen Verfahren eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe mit ausreichender Linearität vermessen werden kann.

5.2 Durchführung und Ergebnisse

5.2.1 Ermittlung des Absorptionsmaximums

Um zu überprüfen, ob das beschriebene Verfahren für die Quantifizierung unbekannter Wasserstoffperoxid-Konzentrationen verwendet werden kann, sollte eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe hinsichtlich der Linearität untersucht werden. Zuvor war jedoch erforderlich das Absorptionsmaximum des 3,4,5,6-Dibenzoxanthylum-Kations unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu ermitteln. Dazu wurde Methanol in wässriger Lösung mit Wasserstoffperoxid und Katalase versetzt. Während der Durchmischung dieses Probenansatzes konnte eine geringfügige Gasentwicklung beobachtet werden. Die Lösung blieb jedoch klar und farblos. Im Anschluss wurde die Lösung mit Chromotropsäure und konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Während sich die Lösung aufgrund der sauren Reaktion bis zum Sieden aufheizte, wurde eine rotviolette Färbung sichtbar, die sich beim Abkühlen weiter vertiefte. Nach dem vollständigen Abkühlen wurde ein Teil der Lösung in eine Küvette überführt und zwischen 200 und 800 nm photometrisch vermessen. Das

Absorptionsmaximum, welches aus dieser Messung ermittelt wurde liegt bei 575 nm (Abbildung 5-2).

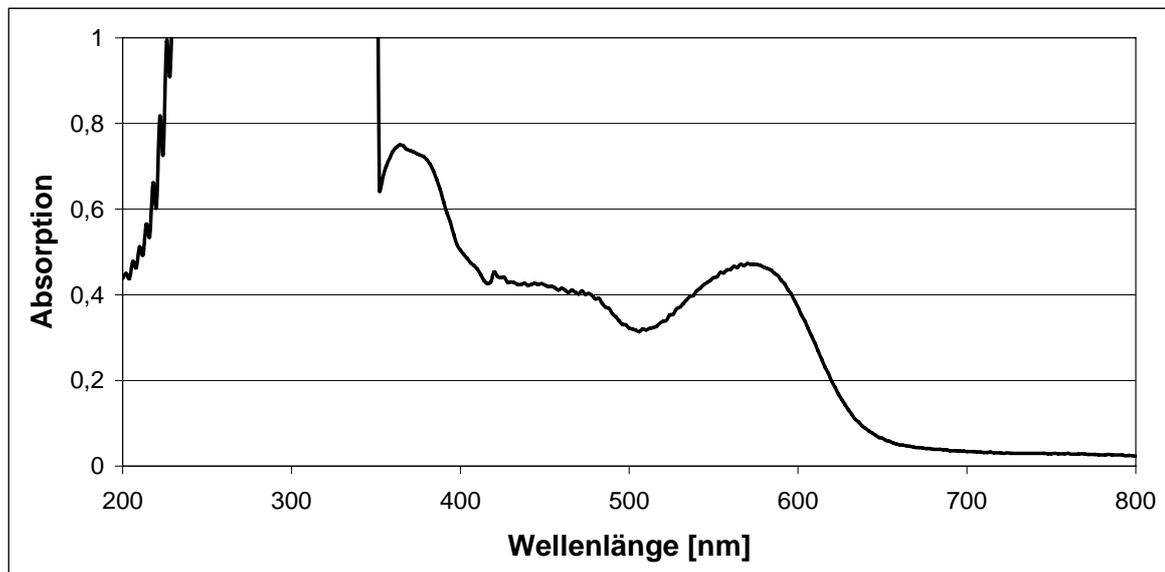


Abbildung 5-2: Absorptionsspektrum des 3,4,5,6-Dibenzoxanthylum-Kations

5.2.2 Linearität einer Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe

Um die Linearität des beschriebenen Verfahrens für den Wasserstoffperoxid-Konzentrationsbereich von 1,25 bis 6,25 mmol pro Liter zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsreihe mit fünf Konzentrationsniveaus vermessen. Für jedes Konzentrationsniveau wurden drei Werte gemessen. Die Durchführung erfolgte wie zuvor für die Ermittlung des Absorptionsmaximums beschrieben. Die Abszisse in Abbildung 5-3 gibt die Wasserstoffperoxid-Konzentration des Probenansatzes an, bevor Chromotropsäure und Schwefelsäure zugesetzt wurden.

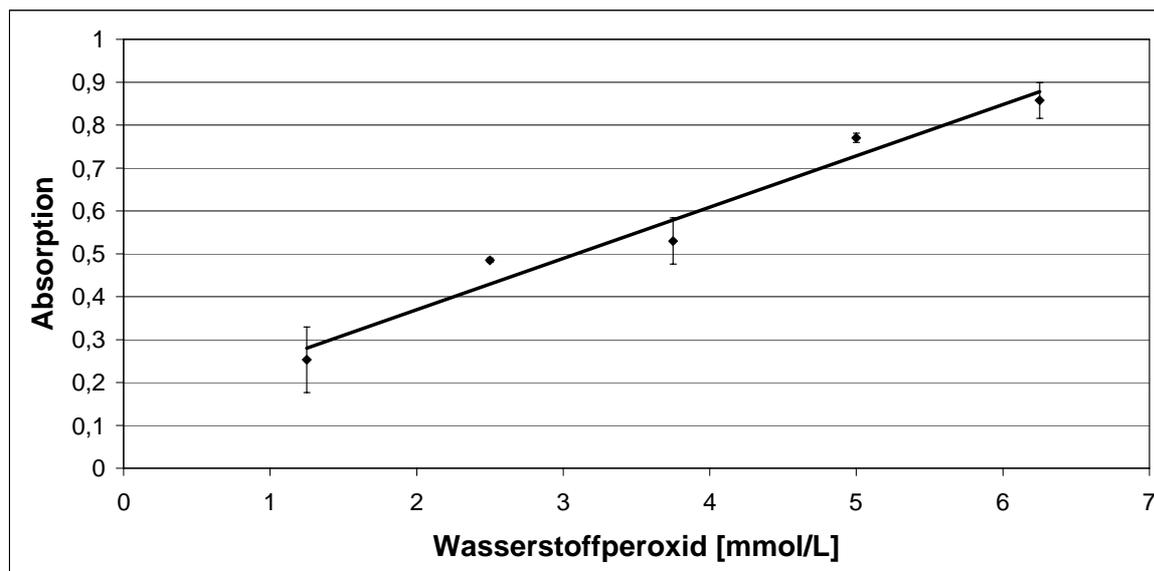


Abbildung 5-3: Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe zur Bestimmung der Linearität

Die Dintest[®]-Auswertung für die lineare Regression, so wie die Ergebnisse des Mandel-Tests befinden sich im experimentellen Teil (Kapitel 11).

Der Mandeltest ergab, dass innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs eine lineare Auswertung der Ergebnisse möglich ist. Dennoch beträgt der Korrelationskoeffizient dieser Konzentrationsreihe lediglich 0,9817. Dieses Ergebnis ist weder für die quantitative Bestimmung reiner Wasserstoffperoxid-Lösungen, noch für die Ermittlung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid zufriedenstellend.

5.3 Diskussion

Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Linearitätsuntersuchung ist das beschriebene Verfahren für die routinemäßige, quantitative Wasserstoffperoxid-Bestimmung nicht geeignet. Ein wesentlicher Nachteil des beschriebenen Verfahrens ist die Erwärmung der Lösung beim Einleiten der Schwefelsäure. Die siedende Lösung muss zunächst abgekühlt werden, bevor sie in die Küvette überführt und spektralphotometrisch vermessen werden kann. Während dieser Zeit wird jedoch eine stetige Farbvertiefung der Lösung beobachtet. Folglich ist die Absorption abhängig von der Zeit, die bis zum Vermessen der Lösung vergeht. Dieses Problem könnte beseitigt

werden, indem festgelegte Zeitabstände zwischen der Herstellung und dem Vermessen der Probe eingehalten werden.

Ein denkbarer Grund für die schlechte Korrelation der Messwerte ist möglicherweise, dass die Oxidation des Methanols zu Formaldehyd lediglich eine Nebenreaktion darstellt, während der größte Teil des zugesetzten Wasserstoffperoxids zu Sauerstoff und Wasser disproportioniert. Hieraus resultiert eine erhebliche Abnahme der Empfindlichkeit.

Hinzu kommt, dass Katalase möglicherweise, ähnlich wie HRP, die Wasserstoffperoxid-abhängige Oxidation der Substanzen, die hinsichtlich der antioxidativen Kapazität untersucht werden sollen, katalysiert. Dadurch würden sich für den Chromotropsäure-Test die gleichen Probleme ergeben, wie für den HRP-Test.

Aufgrund der unbefriedigenden statistischen Daten und der wenig anwenderfreundlichen Handhabung dieses Testverfahrens, wurde auf eine weitere Untersuchung verzichtet.

6 Clark-Elektrode

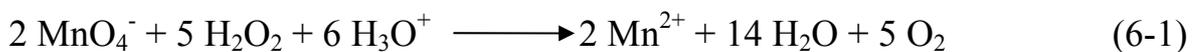
6.1 Grundlagen des Messverfahrens

In der Literatur [3] wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid beschrieben, das die Entstehung von Sauerstoff bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Katalase ausnutzt. Der entstehende Sauerstoff wird in der Lösung mit Hilfe einer Clark-Elektrode vermessen. Die Katalase wird dabei entweder direkt in die Probe injiziert [97] oder auf der Elektrodenmembran immobilisiert [98, 99].

Bei dem beschriebenen Verfahren handelt es sich um eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid ohne großen instrumentellen Aufwand. Dieses Verfahren sollte jedoch in heterogenen Lösungen nicht unkritisch angewendet werden, da die Katalase in Anwesenheit eines geeigneten Substrats Peroxidase-Eigenschaften aufweisen kann [3, 21]. Daraus folgt, dass das vorhandene Wasserstoffperoxid nicht quantitativ in Sauerstoff umgewandelt wird. Ein Teil des Wasserstoffperoxids wird dabei für die katalysierte Oxidation des Substrats verbraucht. Ein weiterer Kritikpunkt bei diesem Verfahren ist, dass in wässrigem Milieu gemessen werden muss, da die Katalase bei großen Anteilen von organischen Lösungsmitteln im Versuchsansatz denaturiert wird. Aus den Gründen ist eine Verwendung dieses Verfahrens zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid nicht sinnvoll.

Dennoch wurde basierend auf der Technologie der Clark-Elektrode ein Verfahren entwickelt, mit dem die antioxidative Kapazität bestimmt werden kann. Bei diesem Verfahren wird zunächst das Wasserstoffperoxid mit der Substanz, die bezüglich ihrer antioxidativen Kapazität untersucht werden soll, über einen festgelegten Zeitraum inkubiert. Anschließend wird das nicht umgesetzte Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff oxidiert. Letzterer wird mit Hilfe der Clark-Elektrode quantitativ erfasst. Je weniger Sauerstoff in der Lösung gefunden wird, desto mehr Wasserstoffperoxid wurde während der Inkubationszeit umgesetzt. Die Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration ist somit ein Indikator für die antioxidative Kapazität der untersuchten Substanz. Aufgrund der bereits erwähnten Probleme bei der Verwendung von Katalase, wurde das Enzym durch das Oxidationsmittel

Kaliumpermanganat ausgetauscht, welches ebenfalls in der Lage ist Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff zu oxidieren. Der Gleichung (6-1) kann entnommen werden, dass zwei Moleküle Kaliumpermanganat fünf Moleküle Wasserstoffperoxid oxidieren. Dennoch sollte darauf geachtet werden, dass das Kaliumpermanganat in einem deutlichen Überschuss in der Lösung vorliegt, um eine schnelle Sauerstofffreisetzung zu gewährleisten. Außerdem sind einige der zu untersuchenden Substanzen Reduktionsmittel, die einen Teil des Kaliumpermanganats reduzieren können. Bei dieser möglichen Nebenreaktion wird die getestete Substanz selbst oxidiert. Dies ist jedoch nicht problematisch, da das Kaliumpermanganat erst nach abgelaufener Inkubationszeit zugesetzt wird.



Um möglichst physiologische Bedingungen einzuhalten, sollte die Reaktion von Antioxidans und Wasserstoffperoxid in neutralem Milieu ablaufen. Aus der Gleichung (6-1) ist jedoch ersichtlich, dass für die Reaktion zu Mangan(II) und Sauerstoff ein saures Milieu erforderlich ist. Deshalb wurde die Lösung nach abgelaufener Inkubationszeit mit Salzsäure angesäuert.

Bei der gleichzeitigen Verwendung von Salzsäure und Kaliumpermanganat, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des in der Lösung vorhandenen Chlorids durch das Kaliumpermanganat zu molekularem Chlor oxidiert wird (6-2).



Dies führt möglicherweise zu einem Verbrauch von Kaliumpermanganat im Reaktionsansatz. Da das Oxidationsmittel jedoch wie bereits beschrieben in einem deutlichen Überschuss vorlag, konnte diese Nebenreaktion vernachlässigt werden.

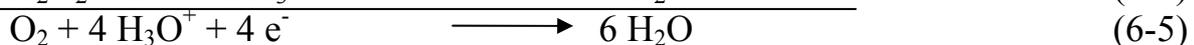
Da die Sauerstoffkonzentration einer Lösung unter anderem von der Temperatur abhängt, muss mit erheblichen Schwankungen der Sauerstoff-Ausgangskonzentration in der Untersuchungslösung vor Zugabe der Kaliumpermanganat-Lösung gerechnet werden. Um hier einen vergleichbaren Ausgangswert zu schaffen, wurde der Sauerstoff in der Lösung vor der Injektion von Kaliumpermanganat durch das Einleiten von

Stickstoff verdrängt. Durch diese Absenkung der Sauerstoff-Konzentration wurden außerdem Sättigungsprozesse vermieden, die die Linearität des Verfahrens beeinflusst hätten.

6.1.1 Die Clark-Elektrode

Die Clark-Elektrode, die in der Literatur häufig Sauerstoffelektrode genannt wird, wurde im Jahre 1954 von Leland Clark entwickelt [100]. Der Sensor besteht aus einer Platinkathode und einer Silberanode die beide in eine Kaliumchloridlösung eintauchen. Die Elektroden sind durch eine sauerstoffdurchlässige Teflonmembran von der Probelösung getrennt. Es wird eine Spannung von -0,6 bis -0,8 Volt angelegt [101]. Der Sauerstoff aus der Probelösung diffundiert in Abhängigkeit von der Differenz des Sauerstoffpartialdrucks zwischen der Probelösung und dem Inneren der Elektrode durch die Membran. Im Inneren der Elektrode wird der Sauerstoff an der Kathode reduziert. Der Strom an den Elektroden entspricht der Menge des reduzierten Sauerstoffs. Folglich verhält sich der gemessene Strom proportional zur Sauerstoffdiffusion durch die Membran und damit zur Sauerstoffkonzentration in der Probelösung. An Kathode und Anode der Clark-Elektrode laufen die folgenden Reaktionen ab (6-3 bis 6-7):

Reaktionen an der Kathode:



Reaktionen an der Anode:



Summe der Gleichungen:



6.1.2 Untersuchung weiterer Antioxidantien

Da die Ergebnisse des HRP-Tests vermuten lassen, dass keines der eingesetzten Antioxidantien eine antioxidative Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid aufweist, wurde in der Literatur nach nicht-enzymatischen Verbindungen gesucht, bei denen eine Reaktion mit Wasserstoffperoxid belegt ist. Dabei fielen die Mangan-Salen-Komplexe EUK-8 und EUK-134 auf (Abbildung 6-1), die katalase-mimetische Eigenschaften aufweisen sollen [102, 103]. Baker und Mitarbeiter postulieren [104], dass EUK-134 die reaktivere Substanz in Bezug auf Wasserstoffperoxid ist. Eine weitere Verbindung, die in der Literatur als Antioxidans für Wasserstoffperoxid beschrieben wird, ist das N-Acetylcystein [65]. Außerdem wurde in dieser Versuchsreihe das Enzym Katalase vermessen, um vergleichen zu können, ob der Ausdruck Katalase-Mimetikum für die Verbindungen EUK-8 und EUK-134 zutreffend ist. Aufgrund der hohen Molekülmasse der Katalase von etwa 240 000 wurde das Enzym im Vergleich mit den anderen untersuchten Substanzen 1 000fach verdünnt eingesetzt. Folglich wurde zusätzlich zu den anderen Substanzen, deren antioxidative Kapazität bereits mit Hilfe des HRP-Tests bestimmt werden sollte, die Verbindungen N-Acetylcystein, EUK-8 und EUK-134 untersucht.

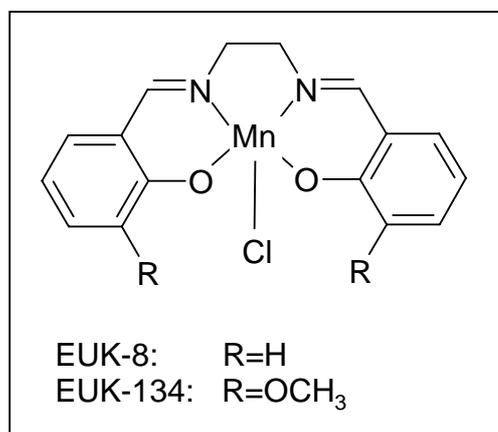


Abbildung 6-1: EUK-8 und EUK-134

6.2 Durchführung

Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, dass Wasserstoffperoxid mit der zu untersuchenden Substanz in äquimolarer Konzentration inkubiert wurde.

6 Clark-Elektrode

Als Lösungsmittel wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die untersuchten Substanzen mit lipophilen Eigenschaften wurden in Acetonitril gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten wurde Salzsäure-Lösung zugesetzt, um in der Probelösung ein ausreichend saures Milieu zu schaffen. Anschließend wurde die Clark-Elektrode in die Probelösung eingetaucht und das Probengefäß dicht verschlossen. Danach wurde für fünf Minuten Stickstoff eingeleitet, um den Sauerstoff aus der Lösung zu verdrängen. Die Auswerteinheit der Clark-Elektrode zeigte dann in der Regel einen Sauerstoffgehalt von 0,0-0,2 mg Sauerstoff pro Liter an. Anschließend wurde die Gaszufuhr geschlossen und die Messung gestartet. 15 Sekunden nach dem Start der Messung wurde die Kaliumpermanganat-Lösung mit Hilfe einer Spritze in die Untersuchungslösung injiziert (Abbildung 6-2).

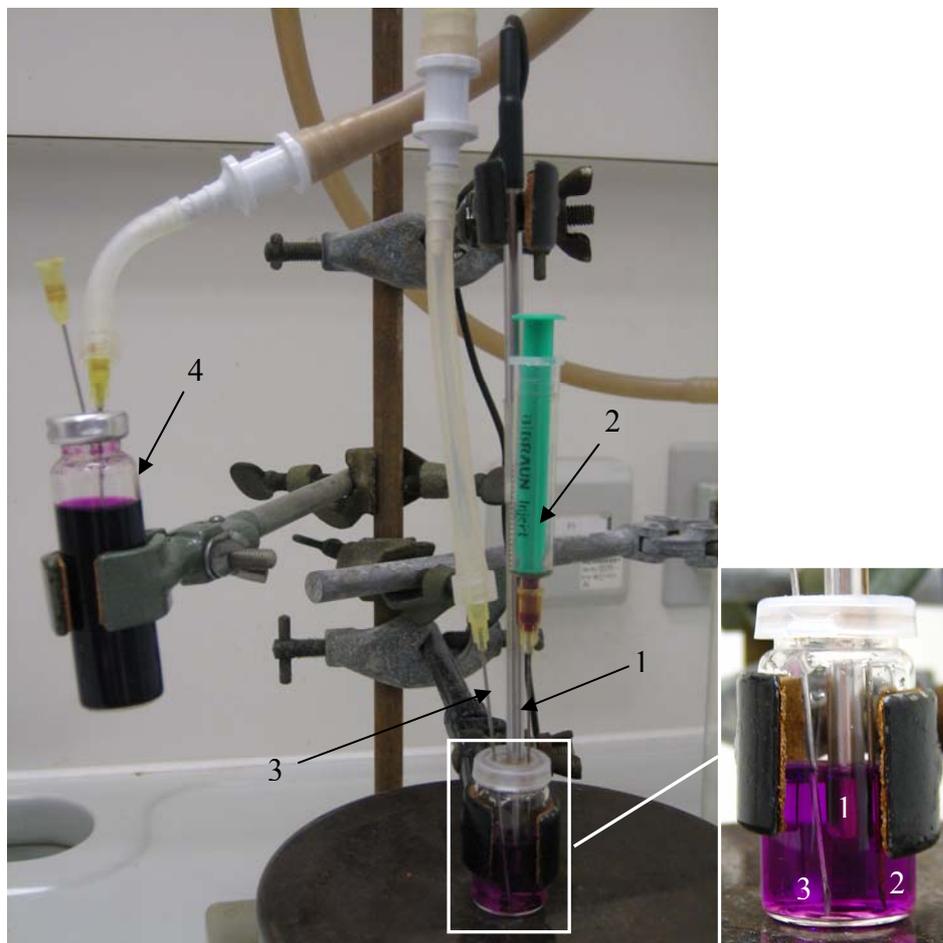


Abbildung 6-2: Versuchsanordnung Clark-Elektrode:

1) Sauerstoff-Elektrode 2) Spritze mit Kaliumpermanganat 3) Kanüle zur Stickstoffbegasung 4) Kaliumpermanganat-Lösung mit Stickstoff begast

Um zu verhindern, dass durch die Injektion der Kaliumpermanganat-Lösung Sauerstoff in die Untersuchungslösung gelangt, wurde auch die Kaliumpermanganat-Lösung vor der Injektion in einem gasdichten Vial mit Stickstoff begast. Auf diese Weise konnte das Einbringen von zusätzlichem Sauerstoff nicht vollständig verhindert, jedoch erheblich reduziert werden.

Es wurde über einen Zeitraum von 3 bis 4 Minuten alle 10 Sekunden ein Messwert gespeichert. Das oben beschriebene Verfahren wurde bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer durchgeführt. Pro Substanz erfolgten drei Messungen. Messung I enthielt sowohl die zu untersuchende Substanz als auch Wasserstoffperoxid, Messung II enthielt ausschließlich die zu untersuchende Substanz und Messung III enthielt nur Wasserstoffperoxid. Ziel der Messung I war festzustellen, ob eine Reaktion zwischen der untersuchten Substanz und Wasserstoffperoxid stattfindet. Messung II wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die untersuchte Substanz einen Einfluss auf den Messablauf hat. Außerdem konnte hierbei beobachtet werden wie viel Luftsauerstoff während der Messung in die Lösung gelangt. Dies war erforderlich, da das Probengefäß nicht vollständig dicht war und das Einbringen von Sauerstoff in das Messsystem durch die Injektion der Kaliumpermanganat-Lösung nicht völlig verhindert werden konnte. Das Ergebnis der Messung III wurde mit dem Messwert der Messung I verglichen. So konnte festgestellt werden, ob während der Inkubation eine Zerstörung des Wasserstoffperoxids stattgefunden hat. Außerdem war die Messung III erforderlich um zu überprüfen, in wie weit das Messsystem fehlerfrei arbeitet. Jede der drei Messungen wurde dreimal wiederholt.

Bei den Substanzen, die sich während der Versuche als Antioxidantien für Wasserstoffperoxid herausgestellt haben, wurde zusätzlich eine Konzentrationsreihe vermessen. Dabei wurde ausschließlich die Konzentration des Antioxidans verändert, während die Wasserstoffperoxid-Konzentration konstant blieb. Außerdem wurden bei diesen Substanzen Versuche zur Reaktionskinetik durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich die Inkubationszeit geändert, während das Konzentrationsverhältnis unverändert blieb.

Abschließend wurde mit diesem Messverfahren Blutplasma hinsichtlich der antioxidativen Kapazität untersucht. Hierzu wurde Kapillarblut entnommen und mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Nach dem Zentrifugieren dieser

Lösung wurde ein Teil des Plasmas abgenommen und dem vorher beschriebenen Versuchsansatz anstelle der Lösungen der zu untersuchenden Substanzen zugesetzt. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurde auch bei der Messung III, die keine Plasmalösung enthielt, isotone Kochsalzlösung verwendet. Bei den Proben, die Plasma enthielten, konnte beim Einleiten von Stickstoff eine beachtliche Schaumentwicklung beobachtet werden. Um diese Schaumentwicklung zu reduzieren, wurden alle Proben mit Octanol versetzt.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Sauerstoff-Freisetzungskurve

Zunächst soll anhand einer Grafik verdeutlicht werden, wie sich die Sauerstoffentwicklung nach Injektion der Kaliumpermanganat-Lösung verhält. Hierbei muss zwischen Sauerstoffentwicklung und der Detektion an der inneren Elektrode des Messensors mit einer zeitlichen Verzögerung gerechnet werden. Der größte Teil dieser Verzögerung resultiert aus der Zeit, die der Sauerstoff benötigt um durch die Teflonmembran zu diffundieren. Die Abbildung 6-3 zeigt die gemittelten Werte der Sauerstofffreisetzung aus drei Messungen, die entsprechend der Messung III durchgeführt wurden.

Man kann der Sauerstofffreisetzungskurve entnehmen, dass die Sauerstoffkonzentration in der Untersuchungslösung nach der Kaliumpermanganat-Injektion schnell ansteigt und danach langsam wieder abfällt. In den folgenden Messreihen wurden die Maximalwerte der gemessenen Sauerstoffkonzentration verglichen. Ein Maximalwert wurde nur dann als solcher gewertet, wenn er für mindestens zwei aufeinanderfolgende Messzeitpunkte bestehen blieb. Der Maximalwert von 5,3 mg Sauerstoff pro Liter in Abbildung 6-3 blieb für drei Messungen bestehen (siehe Kasten).

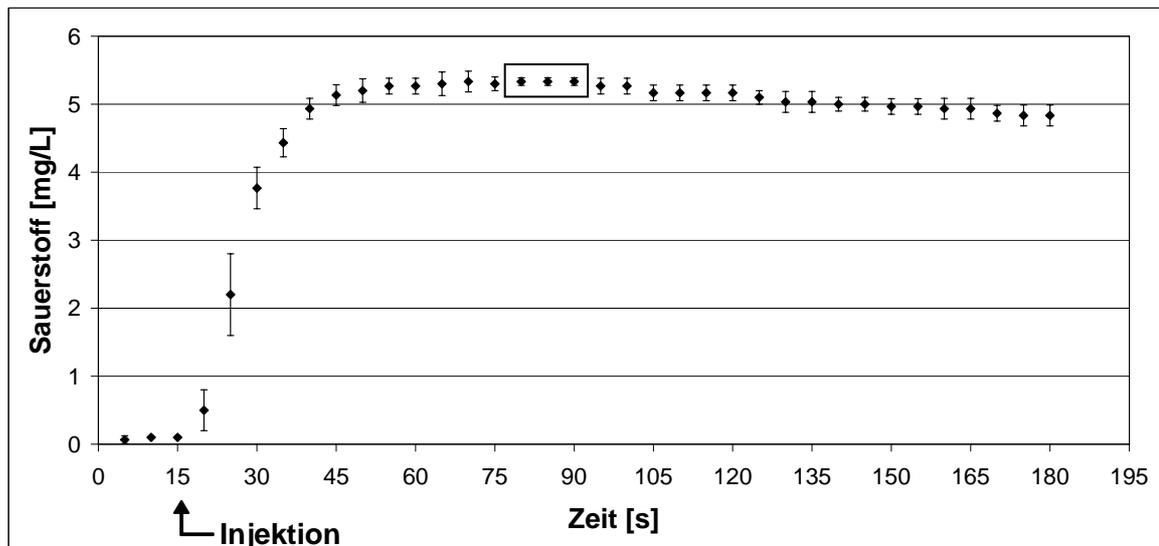


Abbildung 6-3: Sauerstoff-Freisetzungskurve

6.3.2 Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe

Zunächst war erforderlich zu ermitteln, bis zu welcher Wasserstoffperoxid-Konzentration das in Abschnitt 6.2 beschriebene Verfahren linear arbeitet. Aus diesen Gründen wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe vermessen.

Die Überprüfung der Datenreihe in Abbildung 6-4 mit Dintest[®] führte zu einem Korrelationskoeffizienten von 0,9991 für die Lineare Regression. Der F-Test nach Mandel ergab, dass das Verfahren für den hier dargestellten Messbereich linear arbeitet. Folglich ist die quantitative Bestimmung einer unbekanntes Wasserstoffperoxid-Konzentration über den dargestellten Messbereich möglich. Da aber bei den Messungen äquimolare Mengen potentiell reduktiv wirkender Substanzen zugesetzt werden sollten, die ebenfalls Kaliumpermanganat verbrauchen können, konnte die Wasserstoffperoxid-Konzentration bei konstanter Kaliumpermanganat-Konzentration nicht beliebig gesteigert werden.

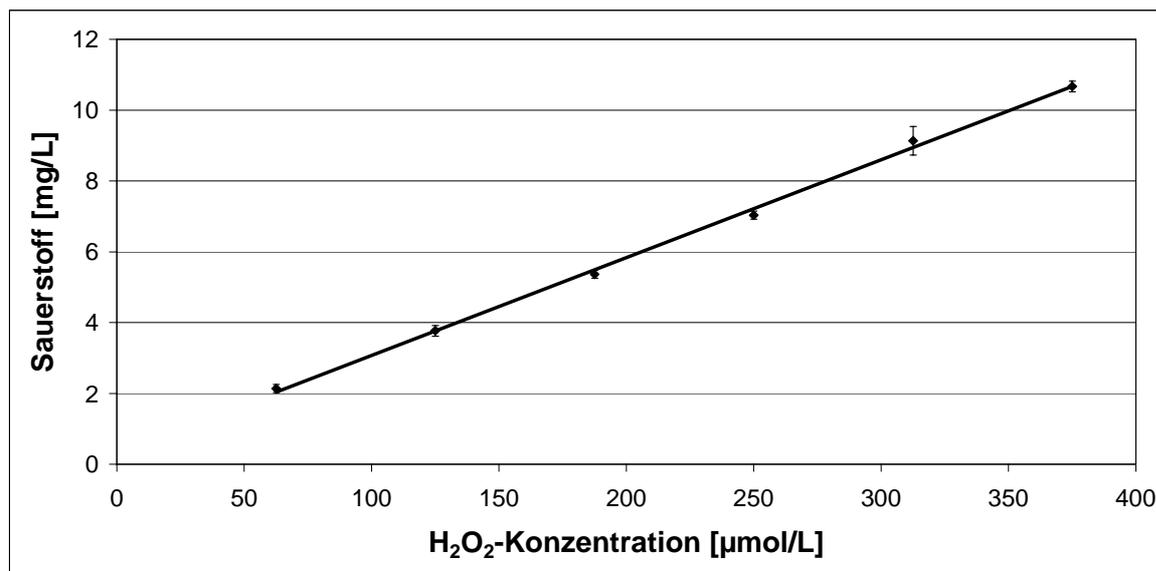


Abbildung 6-4: Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe

Die angegebene Wasserstoffperoxid-Konzentration bezieht sich auf die Konzentration im vollständigen Probenansatz von 4 mL.

Aus diesen Gründen wurde zunächst mit einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 187,5 µM gearbeitet. Unter diesen Bedingungen wurden Glutathion, Harnsäure und Retinol vermessen. Bei den anderen untersuchten Substanzen konnte zum Teil eine rasche Entfärbung der Kaliumpermanganat-Lösung nach der Injektion beobachtet werden. Demnach lag in der Lösung nicht mehr genug Kaliumpermanganat für eine vollständige Oxidation des Wasserstoffperoxids vor, was zu einer erniedrigten Sauerstoff-Freisetzung führte. Folglich wurde in Anwesenheit der untersuchten Substanz weniger Wasserstoffperoxid gemessen, ohne dass eine direkte Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und der Verbindung stattgefunden hat.

Durch eine Steigerung der Kaliumpermanganat-Konzentration wurde versucht, dieses Problem zu lösen. Diese Maßnahme führte jedoch zu einer erheblichen Belastung der Elektrodenmembran. Dies äußerte sich in sichtbaren Ablagerungen und in einem verzögerten Ansprechen der Elektrode. Aus diesen Gründen war es erforderlich die Wasserstoffperoxid-Konzentration und die Konzentrationen der untersuchten Substanzen, auf 125 µM zu verringern. Mit diesem Ansatzverhältnis wurden die Verbindungen Ascorbinsäure, Gallussäurepropylester, Gallussäure, Trolox, Melatonin, N-Acetylcystein, EUK-8 und EUK-134, so wie das Enzym Katalase vermessen. Bei den Flavonoiden Naringenin und Quercetin war

trotz des verringerten Ansatzverhältnisses eine Verdopplung der Kaliumpermanganat-Konzentration erforderlich, da noch immer eine Entfärbung der Lösung beobachtet werden konnte. Die Verdopplung der Kaliumpermanganat-Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Messergebnis der Messung III, die ausschließlich Wasserstoffperoxid enthielt. Folglich ist ein direkter Vergleich der Flavonoide mit den anderen untersuchten Substanzen trotz der Veränderung der Konzentration möglich.

6.3.3 Einfluss von Acetonitril auf das Messverfahren

Auch mit diesem Messverfahren sollten sowohl hydrophile als auch lipophile Substanzen untersucht werden. Da auch hier Acetonitril als Lösungsmittel verwendet wurde, musste zunächst getestet werden, ob Acetonitril einen Einfluss auf das Messergebnis hat. Um dies zu überprüfen wurde die Messung III, wie in Abschnitt 6.2 beschrieben, einmal mit und einmal ohne Zusatz von Acetonitril durchgeführt. Hierbei wurde den Proben die Acetonitril enthielten als Volumenausgleich entsprechend weniger Wasser zugesetzt.

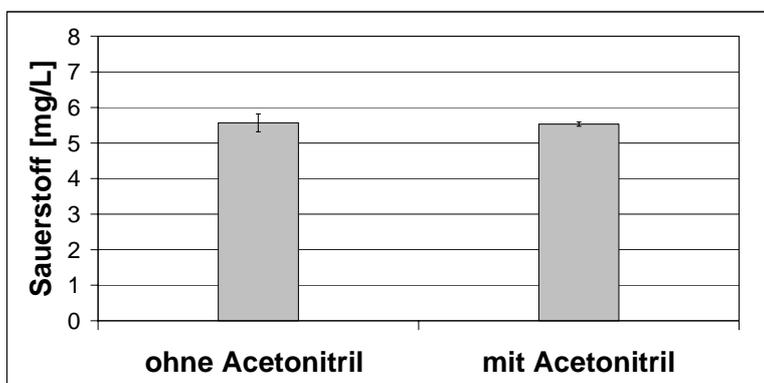


Abbildung 6-5: Einfluss von Acetonitril auf das Messverfahren

Da sich die Mittelwerte der beiden Messreihen in Abbildung 6-5 mit und ohne Acetonitril nicht signifikant unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel für die lipophilen Verbindungen keinen Einfluss auf die Messungen hat.

6.3.4 Einfluss des Messmilieus auf den Zustand der Elektrode

Die aggressiven Bedingungen in der Probelösung führten im Laufe der Messungen zu einer deutlichen Verschlechterung der Messergebnisse. Während zu Beginn der Versuchsreihe der Maximalwert bereits nach ein bis zwei Minuten erreicht war, reichte nach mehreren Messtagen ein Messzeitraum von drei Minuten nicht mehr aus. Es war erforderlich den Messzeitraum auf vier Minuten zu verlängern. Immer häufiger kam es in einer Reihe von gut korrelierenden Messungen zu Ausreißern mit sehr kleinen Messwerten. Dann war es erforderlich, die Elektrode über einen längeren Zeitraum in bidestilliertem Wasser zu spülen und anschließend neu zu kalibrieren. Dass die Elektrode durch die Bedingungen des Messverfahrens stark angegriffen wurde, war auch äußerlich gut sichtbar. Die linke Elektrode in Abbildung 6-6, die für die beschriebenen Messungen verwendet wurde, weist eine trübe und aufgequollene Membran auf. Die Membran der rechts abgebildeten Elektrode ist dagegen noch durchsichtig und eben, obwohl es sich dabei um eine ausrangierte, alte Elektrode handelt. Außerdem kann man in der linken Abbildung erkennen, dass auch das umhüllende Metall des Sensors angegriffen wurde, da sich einer der Schutzbügel teilweise aufgelöst hat.



Abbildung 6-6: Auswirkungen des Messverfahrens auf die Elektrode

linke Elektrode: Verwendete Elektrode mit aufgequollener Membran

rechte Elektrode: alte Vergleichselektrode mit durchsichtiger, ebener Membran

Um die beschriebenen Probleme zu mindern, wurde die Elektrode nach jeder Messung für etwa 10 Minuten in bidestilliertem Wasser gespült. Außerdem wurde die Elektrode nach drei Messungen neu kalibriert. Am Ende eines Messtages wurde die Elektrode in eine Salzsäure-Wasserstoffperoxid-Mischung eingetaucht, um Ablagerungen zu entfernen. Durch diese Maßnahmen konnte die Häufigkeit der extremen Ausreißer wesentlich verringert werden.

6.3.5 Vermessung der Substanzen

Die Vermessung der Substanzen N-Acetylcystein, Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure, EUK-8, EUK-134, Melatonin, Naringenin, Quercetin, Vitamin A, Trolox und des Enzyms Katalase wurden durchgeführt, wie in Kapitel 6.2 beschrieben. Um die Messwerte besser vergleichen zu können, wurden diese prozentual umgerechnet. Das heißt, dass die Werte für die Messungen I und II auf die jeweilige Messung III bezogen wurden, die ausschließlich Wasserstoffperoxid enthielt. So konnten Schwankungen, die beispielsweise durch Temperaturunterschiede entstehen, ausgeglichen werden. Auf diese Weise konnten auch die Ergebnisse der Substanzen Glutathion, Harnsäure und Retinol, die wie zuvor beschrieben bei einem anderen Konzentrationsniveau vermessen wurden, mit den Ergebnissen der übrigen Verbindungen verglichen werden.

Der Abbildung 6-7 kann entnommen werden, dass innerhalb der Inkubationszeit von 25 Minuten neben dem Enzym Katalase nur bei den Substanzen EUK-8 und EUK-134 eine Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration beobachtet werden konnte. Ein statistischer Vergleich der übrigen Substanzen ergab, dass sich die Mittelwerte nicht signifikant von dem Wert für die reine Wasserstoffperoxid-Lösung der Messung III unterscheiden. Diese Verbindungen haben folglich unter den hier gewählten Bedingungen nicht mit Wasserstoffperoxid reagiert.

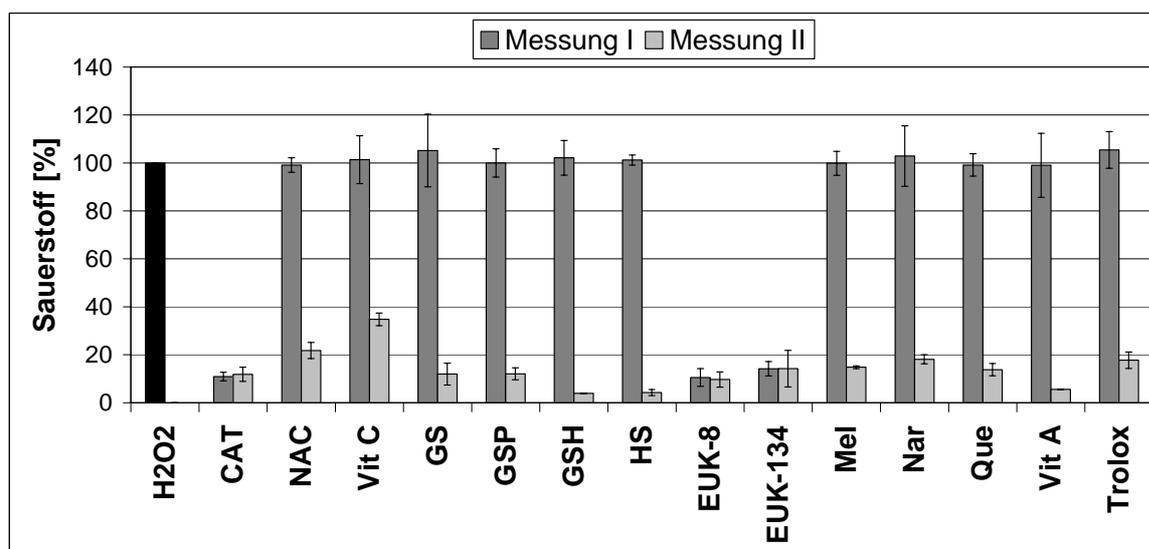


Abbildung 6-7: Untersuchte Substanzen im direkten Vergleich

Schwarzer Balken: Messung III (Wasserstoffperoxid Vergleich = 100%)

CAT = Katalase; NAC = N-Acetylcystein; Vit C = Ascorbinsäure; GS = Gallussäure; GSP = Gallussäurepropylester; GSH = Glutathion; HS = Harnsäure; Mel = Melatonin; Nar = Naringenin; Que = Quercetin; Vit A = Retinol

Vergleicht man bei den Verbindungen EUK-8, EUK-134 und Katalase die Ergebnisse aus den Messungen I und II, so fällt auf, dass hier statistisch kein signifikanter Unterschied vorliegt. Daraus folgt, dass bei diesen Verbindungen das Wasserstoffperoxid innerhalb der Inkubationszeit vollständig zerstört wurde.

6.3.6 Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus Ascorbinsäure

In Kapitel 3 wurde beschrieben, dass Ascorbinsäure in wässriger Lösung durch Autoxidation Wasserstoffperoxid generiert. Auch in Abbildung 6-7 kann für die Messung II bei Ascorbinsäure ein ungewöhnlich hoher Wert abgelesen werden, obwohl kein Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde. Auch mit der hier beschriebenen Methode sollte die Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus einer Ascorbinsäure-Lösung verifiziert werden. Hierzu wurden drei Ascorbinsäure Lösungen entsprechend der Messung II direkt und 300 Minuten nach Herstellung der Lösung vermessen.

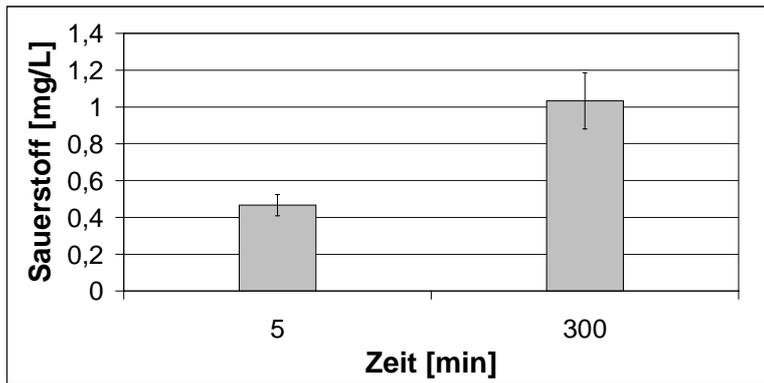


Abbildung 6-8: Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus Ascorbinsäure

Man kann der Abbildung 6-8 entnehmen, dass sich die Sauerstoffkonzentration, die nach Injektion der Kaliumpermanganat-Lösung gemessen wurde, 300 Minuten nach Herstellung der Lösung beinahe verdoppelt hat. Folglich bestätigt auch dieses Testverfahren, dass Ascorbinsäure in wässriger Lösung erhebliche Mengen Wasserstoffperoxid freisetzt.

6.3.7 Konzentrationsreihe der Antioxidantien EUK-8, EUK-134 und Katalase bei konstanter Wasserstoffperoxid-Konzentration

Da die Substanzen EUK-8 und EUK-134, wie in Kapitel 6.3.5 beschrieben, die zugesetzte Menge Wasserstoffperoxid innerhalb der Inkubationszeit vollständig zerstört haben, war eine Differenzierung hinsichtlich der antioxidativen Kapazität mit den bisherigen Ergebnissen nicht möglich. Um herauszufinden in welcher Reihenfolge die Antioxidantien hinsichtlich der antioxidativen Kapazität einzuordnen sind, war es erforderlich die Messbedingungen zu ändern um Unterschiede sichtbar zu machen. Aus diesen Gründen wurde mit den oben aufgeführten Antioxidantien eine Konzentrationsreihe bei konstanter Wasserstoffperoxid-Konzentration vermessen. Um die antioxidative Kapazität der untersuchten Verbindungen einordnen zu können, wurde parallel dazu eine Konzentrationsreihe mit dem Enzym Katalase vermessen.

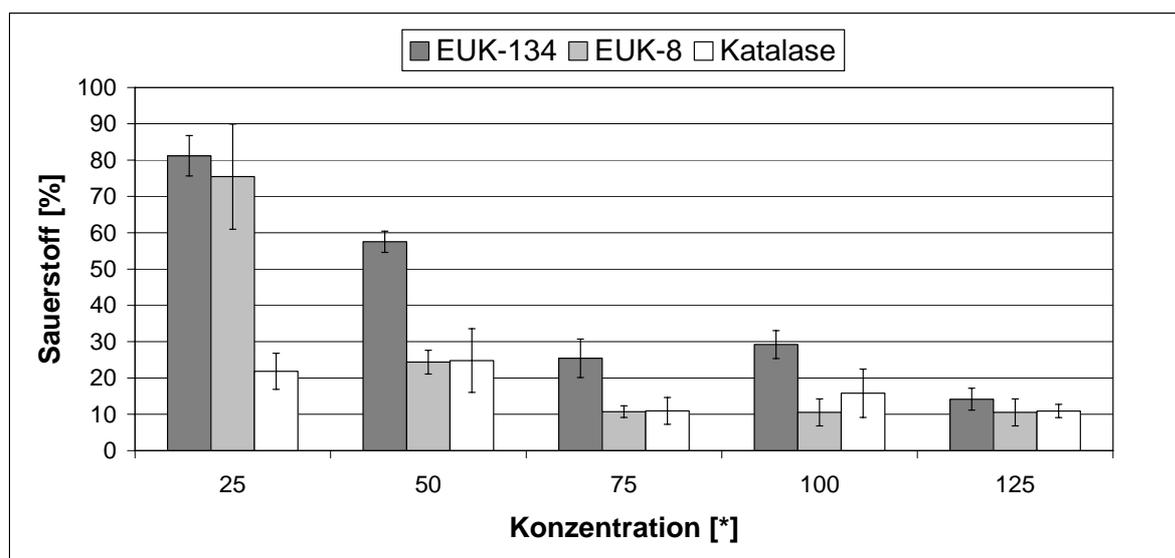


Abbildung 6-9: Konzentrationsreihe EUK-134, EUK-8 und Katalase

* Einheit der Konzentration für EUK-134 und EUK-8: μM ; für die Katalase: nM

Die Ergebnisse in Abbildung 6-9 verdeutlichen, dass das Enzym Katalase das effektivste der drei untersuchten Antioxidantien ist, da das zugesetzte Wasserstoffperoxid bei allen Konzentrationsniveaus zerstört wurde. Für eine vollständige Zerstörung der zugesetzten Wasserstoffperoxid-Menge war im Vergleich zu EUK-8 eine größere Konzentration EUK-134 erforderlich. Folglich scheint EUK-8 unter den gegebenen Messbedingungen das stärkere Antioxidans zu sein. Mit den hier dargestellten Ergebnissen dieser Versuchsreihe ist jedoch lediglich eine Abschätzung der antioxidativen Kapazität möglich. Es ist erforderlich einen Parameter festzulegen, der eine Quantifizierung der antioxidativen Kapazität ermöglicht. Aus diesen Gründen sollte im folgenden Kapitel die Reaktionshalbwertszeit der Zerstörung von Wasserstoffperoxid durch die Verbindungen EUK-8 und EUK-134 bestimmt werden.

6.3.8 Bestimmung der Reaktionshalbwertszeit der Zerstörung von Wasserstoffperoxid durch EUK-8 und EUK-134

Bei der Bestimmung der Reaktionshalbwertszeit mit diesem Verfahren, ergibt sich das Problem, dass immer nur die Wasserstoffperoxid-Konzentration bestimmt werden kann, die zum Zeitpunkt der Kaliumpermanganat Injektion

vorliegt. Folglich musste für jeden einzelnen Untersuchungszeitpunkt ein neuer Probenansatz hergestellt werden.

Die folgende Versuchsreihe basiert auf der Durchführung, die in Kapitel 6.2 beschrieben wird, wobei lediglich die Inkubationszeit verändert wurde. Anstatt eine Inkubationszeit von 25 Minuten einzuhalten, wurde 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten nach dem Vermischen von Antioxidans und Wasserstoffperoxid gemessen.

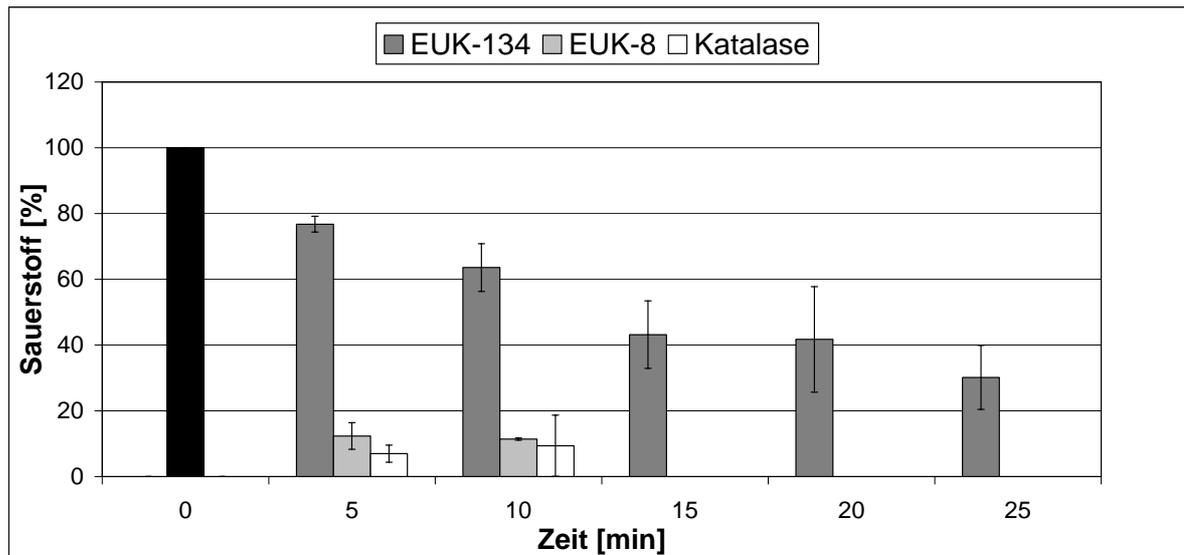


Abbildung 6-10: Veränderung der Inkubationszeit

Der schwarze Balken: steht für den Zeitpunkt 0, also bevor eines der Antioxidantien zugesetzt wurde (100% Wasserstoffperoxid)

Die Abbildung 6-10 zeigt, dass das vorgelegte Wasserstoffperoxid bei Umsetzung mit EUK-134 auch nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten nicht vollständig zerstört wurde, da die Sauerstoffkonzentration nach Injektion der Kaliumpermanganat-Lösung noch relativ hoch ist. Bei der Reaktion mit Katalase und EUK-8 dagegen war bereits nach 5 Minuten kaum noch Sauerstoff messbar. Damit bestätigt sich die Vermutung, dass EUK-8 das stärkere Antioxidans in Bezug auf Wasserstoffperoxid ist als EUK-134.

Aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit bei den Reaktionen von Wasserstoffperoxid mit den beiden Antioxidantien Katalase und EUK-8, ist mit dieser Methode eine Differenzierung hinsichtlich der antioxidativen Kapazität nicht möglich. Die Ergebnisse, die für EUK-8 ermittelt wurden, lassen jedoch vermuten, dass das Antioxidans eine äquimolare Menge Wasserstoffperoxid innerhalb von wenigen Minuten vollständig zerstört.

Um EUK-134 bezüglich der antioxidativen Kapazität einzustufen, sollte die Halbwertszeit ermittelt werden, mit der Wasserstoffperoxid zerstört wird. Um die Halbwertszeit einer Reaktion bestimmen zu können, muss zunächst festgelegt werden, nach welcher Ordnung die untersuchte Reaktion abläuft. Hierzu wurden die Mittelwerte aus den Ergebnissen der Abbildung 6-10 logarithmiert. Da das Resultat dieser Logarithmierung eine Gerade ist (Abbildung 6-11), muss bei der Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und EUK-134 von einer Kinetik erster Ordnung ausgegangen werden.

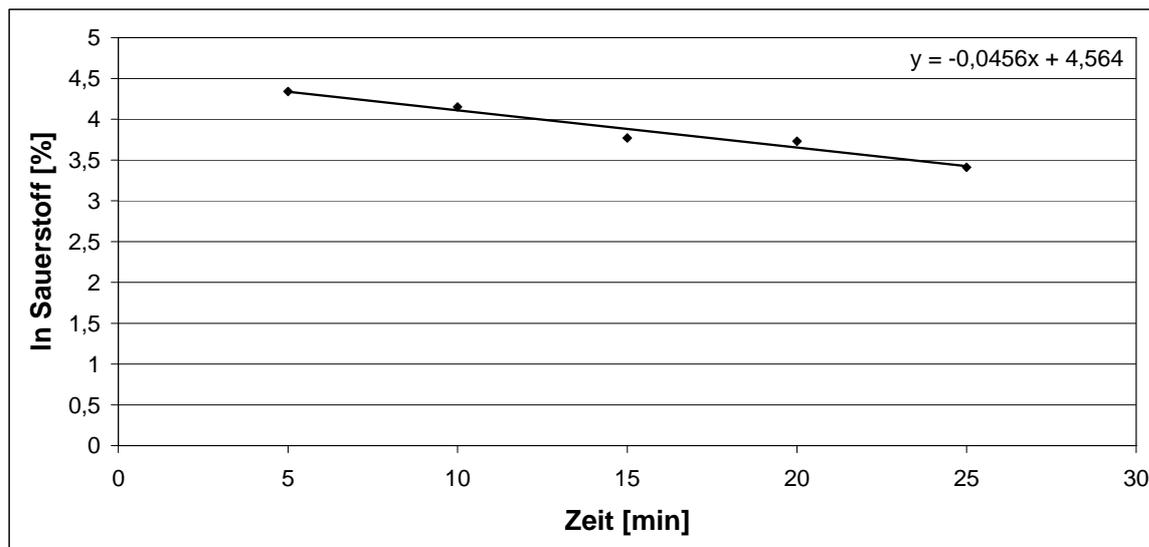


Abbildung 6-11: Die Logarithmierung der Ergebnisse für EUK-134 ergibt eine Gerade

Die Halbwertszeit einer Reaktion erster Ordnung wird mit nachstehender Formel bestimmt.

$$t_{1/2} = \frac{1}{k} \times \ln 2 \quad (6-8)$$

Hierbei kann die Reaktionsgeschwindigkeit k aus der Geradengleichung der logarithmierten Kurve in Abbildung 6-11 ermittelt werden, da die Reaktionsgeschwindigkeit dem Betrag der Steigung dieser Geraden entspricht. Folglich ergibt sich für die Reaktion von EUK-134 mit Wasserstoffperoxid unter den angegebenen Bedingungen eine Halbwertszeit von 912 Sekunden. Dies entspricht etwa 15 Minuten.

6.3.9 Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma

Abschließend wurde Blutplasma hinsichtlich der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid untersucht. In Kapitel 6.2 wurde beschrieben, dass bei den Versuchen mit Blutplasma die Verwendung von isotoner Kochsalzlösung und Octanol unumgänglich ist. Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob diese Veränderung des Messsystems einen Einfluss auf das Messergebnis hat. Dazu wurde dem Versuchsansatz der Messung III sowohl isotone Kochsalzlösung, als auch Octanol zugesetzt. Der Abbildung 6-12 kann entnommen werden, dass die Anwesenheit von isotoner Kochsalzlösung keinen Einfluss auf das Messergebnis hat. In Anwesenheit von Octanol ist jedoch eine signifikante Erhöhung der Messwerte feststellbar. Für diese Beobachtung liegt bislang keine Erklärung vor.

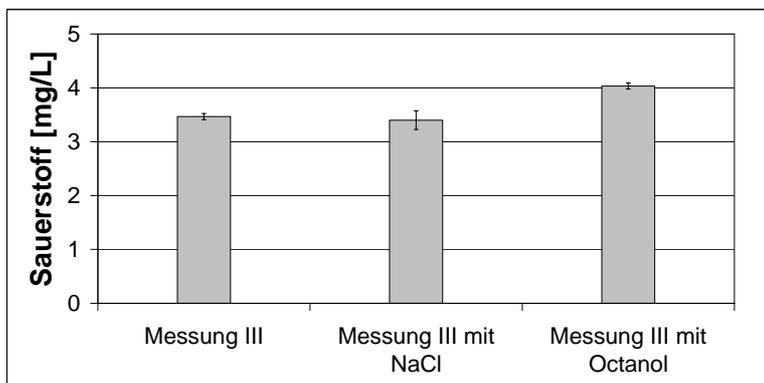


Abbildung 6-12: Einfluss von isotoner Kochsalz-Lösung und Octanol

Aufgrund der Anhebung der Messwerte in Anwesenheit von Octanol, war es erforderlich bei den Messungen I bis III die gleiche Menge Octanol zuzusetzen, um die Messwerte vergleichbar zu machen. Anschließend wurde Blutplasma entsprechend der Durchführungsbeschreibung in Kapitel 6.2 untersucht.

Die Abbildung 6-13 zeigt, dass in Anwesenheit von Blutplasma ein deutlicher Abbau von Wasserstoffperoxid beobachtet werden konnte. Innerhalb von 25 Minuten Inkubationszeit wurden mit der Plasmamenge aus 10 μ L Kapillarblut mehr als die Hälfte der insgesamt vorgelegten 0,5 μ mol Wasserstoffperoxid zerstört. Der Wert der Messung II, bei dem kein Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde, befindet sich auf dem gleichen Niveau wie bei den bisher durchgeführten Versuchen. Daraus folgt, dass mit dieser Methode im Blut des Probanden kein Wasserstoffperoxid nachweisbar war.

Dieses Ergebnis zeigt außerdem, dass durch den Zusatz der Plasmalösung keine Interaktionen mit dem Messverfahren zu erwarten sind.

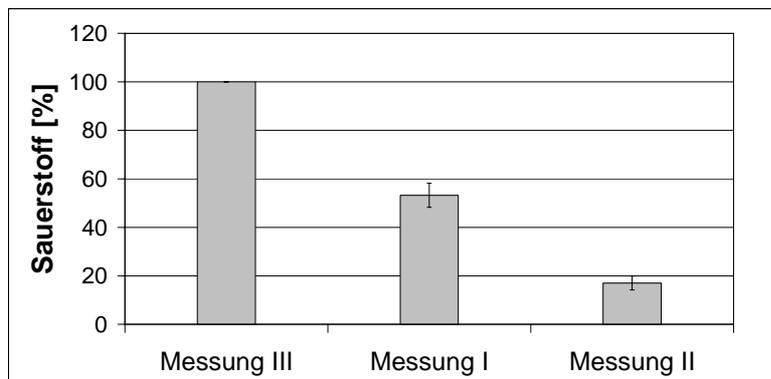


Abbildung 6-13: Antioxidative Kapazität von Blutplasma

6.4 Validierung

6.4.1 Linearität

Um die Linearität des beschriebenen Verfahrens zu bestimmen, wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe mit sechs unterschiedlichen Konzentrationsniveaus vermessen. Für jedes Konzentrationsniveau wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Als höchstes Konzentrationsniveau wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentration von 187,5 μM gewählt, da bei dieser Konzentration Glutathion, Harnsäure und Retinol vermessen wurden. Alle anderen Substanzen wurden bei einer Konzentration von 125 μM vermessen. Diese Konzentration liegt ebenfalls im untersuchten Konzentrationsbereich von 31,25 bis 187,5 μM .

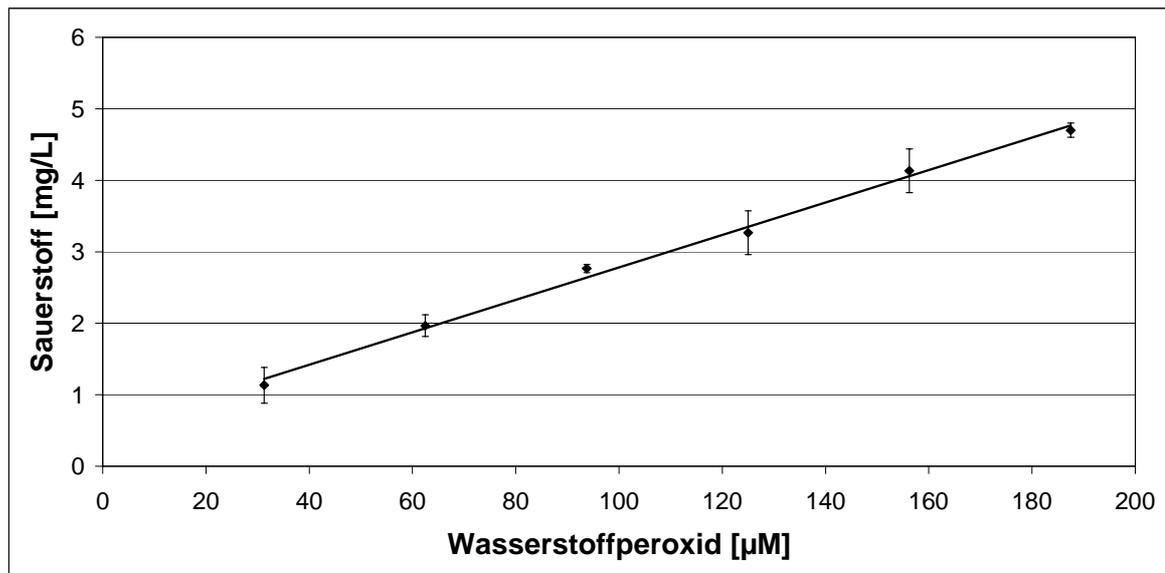


Abbildung 6-14: Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe zur Bestimmung der Linearität

Die Dintest[®]-Auswertung für die lineare Regression, so wie die Ergebnisse des Mandel-Tests befinden sich im experimentellen Teil (Kapitel 11).

Die Dintest[®]-Auswertung führte zu dem Ergebnis, dass die quadratische Regression das optimale Regressionsmodell für diese Datenreihe ist. Der Mandel-Test hat jedoch ergeben, dass zwischen der linearen und der quadratischen Regression kein signifikanter Unterschied nachweisbar ist. Folglich kann das Verfahren linear ausgewertet werden. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression liegt bei 0,9976.

6.4.2 Präzision

Da derselbe Versuchsansatz nach Injektion der Kaliumpermanganat-Lösung nicht noch einmal vermessen werden kann, ist die Bestimmung einer Messpräzision bei diesem Verfahren wenig sinnvoll. Folglich wurde lediglich die Methodenpräzision untersucht.

Hierzu wurden sechs Wasserstoffperoxid-Lösungen mit identischer Konzentration hergestellt und nacheinander vermessen. Da Glutathion, Harnsäure und Retinol bei einem anderen Wasserstoffperoxid-Konzentrationsniveau vermessen wurden als die übrigen untersuchten

6 Clark-Elektrode

Verbindungen, wurde die Präzision für beide Konzentrationsniveaus bestimmt.

H ₂ O ₂ -Lösung	1	2	3	4	5	6
O ₂ [mg/L]	3,0	3,5	3,1	3,4	3,1	3,1

Tabelle 6-1: Bestimmung der Methodenpräzision bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 125 µM

H ₂ O ₂ -Lösung	1	2	3	4	5	6
O ₂ [mg/L]	4,2	4,3	4,5	4,7	4,8	4,2

Tabelle 6-2: Bestimmung der Methodenpräzision bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 187,5 µM

	Präzision 125 µM	Präzision 187,5 µM
Mittelwert [mg/L]	3,20	4,45
Standardabweichung [mg/L]	0,20	0,26
Variationskoeffizient	6,25	5,82
David Test	2,50	2,32

Tabelle 6-3: Ergebnisse der Methodenpräzision

David-Test g_u/g_o (6, P = 99 %): 2,15 / 3,16

Die beiden Messreihen sind normalverteilt, folglich kann die Auswertung mit den üblichen statistischen Methoden erfolgen. Sowohl der Dixon-Test, als auch der Grubbs Test lieferten keinen Hinweis auf Ausreißer. Nimmt man die beiden Wertereihen zusammen, liegt der Variationskoeffizient für die untersuchte Messmethode bei etwa sechs Prozent.

6.5 Diskussion

6.5.1 Diskussion der Methode

Mit dem beschriebenen Messverfahren kann mit geringem, materiellem Aufwand ermittelt werden, ob eine Verbindung ein Antioxidans für Wasserstoffperoxid ist. Auch eine grobe Abschätzung der Reihenfolge, mit der die untersuchten Substanzen hinsichtlich der antioxidativen Kapazität einzustufen sind, war anhand einer Konzentrationsreihe möglich. Um jedoch

zwischen mehreren Antioxidantien hinsichtlich der antioxidativen Kapazität differenzieren zu können, sollte zunächst ein Parameter festgelegt werden, der die antioxidative Kapazität einer Substanz charakterisiert. Ein sinnvoller Parameter für die Charakterisierung der antioxidativen Kapazität ist die Halbwertszeit, mit der Wasserstoffperoxid durch das untersuchte Antioxidans zerstört wird. Die Bestimmung der Halbwertszeit ist mit der hier beschriebenen Methode jedoch problematisch, da der Abbau der Wasserstoffperoxid-Lösung nicht kontinuierlich verfolgt werden kann. Für jeden Messzeitpunkt während der kinetischen Untersuchungen ist ein Abbruch der Reaktion, durch die Zugabe von Salzsäure und Kaliumpermanganat erforderlich. Für den nachfolgenden Messzeitpunkt muss folglich ein neuer Versuchsansatz hergestellt werden.

Bei besonders starken Antioxidantien, wie zum Beispiel EUK-8, die in wenigen Minuten die vorgelegte Wasserstoffperoxid-Menge vollständig abbauen, ist eine Bestimmung der Halbwertszeit mit dieser Methode nicht möglich. Um bei diesen Substanzen eine Kurve zu erhalten, die den Wasserstoffperoxid-Abbau pro Zeit wiedergibt, wäre eine Messung sehr kleiner Zeitintervalle erforderlich. Dabei muss zuvor sichergestellt werden, dass die Reaktion zwischen Antioxidans und Wasserstoffperoxid durch die Zugabe der Salzsäure abgebrochen wird. Andernfalls würde in den fünf Minuten, die benötigt werden, um den Sauerstoff aus der Lösung zu verdrängen, weiter Wasserstoffperoxid abgebaut. Auch eine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit ist aufgrund einer Absenkung des pH-Wertes durch die Salzsäure denkbar.

Zusammenfassend kann das beschriebene Verfahren verwendet werden, um potenzielle Antioxidantien für Wasserstoffperoxid zu ermitteln. Darüber hinaus kann mit dieser Methode differenziert werden, in welcher Reihenfolge die Wirksamkeit der Antioxidantien einzustufen ist. Bei besonders reaktiven Verbindungen ist jedoch eine eindeutige Differenzierung problematisch.

Des Weiteren kann das beschriebene Verfahren zur Bestimmung unbekannter Konzentrationen von Wasserstoffperoxid im μM -Bereich verwendet werden. Dazu sollte für den Bereich in dem die unbekannte Wasserstoffperoxid-Konzentration erwartet wird eine Kalibriergerade erstellt werden. Sollte dieses Messverfahren im Routinegebrauch eingesetzt werden, ist jedoch eine Modifikation der Elektrode erforderlich, da die

Reaktionsbedingungen die Elektrodenmembran mit der Zeit schädigen. Durch den Verschleiß der Elektrode ist auf Dauer mit einer erheblichen Beeinflussung der Messergebnisse zu rechnen. Eine denkbare Modifikation wäre eine sauerstoffdurchlässige Versiegelung der Membran mit einem Überzug der zum einen inert gegen die Bedingungen im Probengefäß ist und zum anderen eine Ablagerung von Reaktionsprodukten reduziert. Zusätzlich sollte ein Reinigungsverfahren etabliert werden, mit dem Ablagerungen von Reaktionsprodukten beseitigt werden können, ohne die Membran zu schädigen.

Die Validierungsergebnisse belegen, dass das Messverfahren in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear arbeitet. Der Korrelationskoeffizient von 0,9976, der sich aus der linearen Regression ergibt, ist zufriedenstellend. Interessant ist, dass der zu Beginn der Messreihe ermittelte Korrelationskoeffizient des Konzentrationsbereichs von 62,5 bis 375 μmol pro Liter bei 0,9991 lag. Die Präzision mit einem Variationskoeffizienten von etwa sechs Prozent ist dagegen eher enttäuschend. Die relativ große Streuung der Ergebnisse, so wie die Verschlechterung des Korrelationskoeffizienten bei der Linearitätsbestimmung sind vermutlich auf die schadhafte Elektrodenmembran zurückzuführen, da die Validierungsparameter gegen Ende der Versuchsreihe bestimmt wurden. Zu Beginn der Versuchsreihe war die Streuung der Ergebnisse noch erheblich kleiner.

6.5.2 Diskussion der Antioxidantien

Die Ergebnisse dieser Messmethode bestätigen die Vermutung aus Kapitel 3, dass keine der dort untersuchten Verbindungen eine Reaktion mit Wasserstoffperoxid eingeht. Folglich sind weder die hydrophilen Verbindungen Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion und Harnsäure, noch die lipophilen Substanzen Melatonin, Naringenin, Quercetin und Trolox Antioxidantien für Wasserstoffperoxid, obwohl einige dieser Verbindungen ein deutlich reduktives Potential bei der Entfärbung von Kaliumpermanganat gezeigt haben.

Auch das N-Acetylcystein, welches nach Aruoma und Mitarbeitern [65] direkt mit Wasserstoffperoxid reagieren soll, zeigte in dieser Versuchsreihe keine antioxidative Kapazität. Lediglich die Verbindungen EUK-8 und

EUK-134, die in der Literatur als Katalase-Mimetika beschrieben werden, waren in Bezug auf Wasserstoffperoxid eindeutig antioxidativ wirksam. Wie bereits erwähnt, stuften Baker und Mitarbeiter [104] die Verbindung EUK-134, im Vergleich zu EUK-8, als das wesentlich effektivere Katalase-Mimetikum ein. Die hier durchgeführten Messungen ergaben jedoch, dass EUK-134 in Bezug auf Wasserstoffperoxid wesentlich schwächer antioxidativ wirksam ist, als der Komplex EUK-8. Für EUK-134 wurde eine Halbwertszeit von etwa 15 Minuten für die Zerstörung von Wasserstoffperoxid bei äquimolarer Konzentration ermittelt, während bei EUK-8 innerhalb von 5 Minuten bereits kein Wasserstoffperoxid mehr gefunden werden konnte.

Des Weiteren wurde hier die Beobachtung aus Kapitel 3 bestätigt, dass Ascorbinsäure in wässriger Lösung Wasserstoffperoxid freisetzt. Eine Abschätzung über die Kinetik mit der diese Freisetzung erfolgt, ist mit dieser Methode schwierig, da eine kontinuierliche Überprüfung der Wasserstoffperoxid-Konzentration nicht möglich ist.

Die Plasmauntersuchungen haben ergeben, dass innerhalb der Inkubationszeit von 25 Minuten mit der Plasmamenge aus 10 μL Kapillarblut mehr als die Hälfte der vorgelegten 0,5 μmol Wasserstoffperoxid zerstört wurden. Ein direkter Vergleich mit den untersuchten Antioxidantien ist jedoch nicht möglich, da die Ergebnisse lediglich auf das entnommene Plasmavolumen bezogen werden können und nicht auf eine konkrete Stoffmenge eines antioxidativ wirksamen Plasmabestandteils. Außerdem kann mit diesem Verfahren nicht differenziert werden, welche Spezies für die Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration verantwortlich sind.

Aus diesen Gründen können mit diesem Verfahren ausschließlich Plasmaproben untereinander verglichen werden. Dennoch gibt es für Plasmauntersuchungen mit dieser Methode zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten. Untersucht werden könnte beispielsweise, ob die Einnahme von Antioxidantien oder die Induktion von oxidativem Stress einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität einer Plasmaprobe hat.

7 Wasserstoffperoxidelektrode

7.1 Grundlagen des Messverfahrens

Ein weiteres interessantes Verfahren zur Bestimmung kleiner Wasserstoffperoxid-Konzentrationen in heterogenen Medien wie zum Beispiel Zellkulturen wird von der Firma WPI (World Precision Instruments) angeboten. Hierbei handelt es sich um eine Elektrode, die in ihrem Aufbau der Clark-Elektrode ähnlich ist. Der Wasserstoffperoxid-Sensor der Firma WPI besteht aus einer Anode und einer Kathode, die über einen Elektrolyten in Verbindung stehen. Die beiden Elektroden stehen mit der Probe über eine Membran in Kontakt, die laut Hersteller für Wasserstoffperoxid selektiv permeabel sein soll. Über die Beschaffenheit dieser Membran und das Prinzip der Selektion wurden seitens des Herstellers aus Patentgründen keine weiteren Angaben gemacht. Zwischen Kathode und Anode wird eine Spannung von 400 mV angelegt und gleichzeitig der Diffusionsgrenzstrom gemessen. Durch diese Zellspannung wird vermutlich an der Anode Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff oxidiert (7.1).



Auch über die parallel ablaufende Reduktionsreaktion an der Kathode, wurden aus den oben genannten Gründen vom Hersteller keine weiteren Informationen zur Verfügung gestellt. Da aber das Normalpotential der Reaktion (7.1) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Elektrolytlösung zwischen -0,6 V und -0,7 V liegt, könnte das Normalpotential der Reduktionsreaktion zwischen 0,2 V und 0,3 V liegen, um die angelegte Zersetzungsspannung von 400 mV zu rechtfertigen. Für die Reduktion von Silberchlorid zu elementarem Silber wird in der Literatur [105] ein Normalpotential von 0,22 V angegeben. Somit ist die Reaktion (7.2) eine mögliche Reaktion, die an der Kathode ablaufen könnte.



Die gemessene Stromstärke zwischen Anode und Kathode ist abhängig von der Wasserstoffperoxid-Menge, die durch die Elektroden-Membran zur Anode diffundiert und damit von der Wasserstoffperoxid-Konzentration in der Probe.

Ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass der Probenlösung keine weiteren Reagenzien zugesetzt werden müssen, da die Wasserstoffperoxid-Konzentration direkt durch die Elektrode bestimmt werden kann. Folglich können Interaktionen durch unbekannte Nebenreaktionen ausgeschlossen werden. Die einzige denkbare Interaktion bei diesem Verfahren ergibt sich, wenn andere Substanzen als Wasserstoffperoxid fähig sind durch die Membran des Sensors zu permeieren. Dann könnten diese Substanzen in das Innere des Sensors gelangen und die Reaktionen an den Elektroden beeinflussen.

Ein weiterer großer Vorteil dieses Sensors ist, dass die Edelstahlhülse, auf die die wasserstoffperoxidselektive Membran aufgezogen ist, im Falle einer Verschmutzung oder Beschädigung der Membran, problemlos ausgetauscht werden kann (Abbildung 7-1).

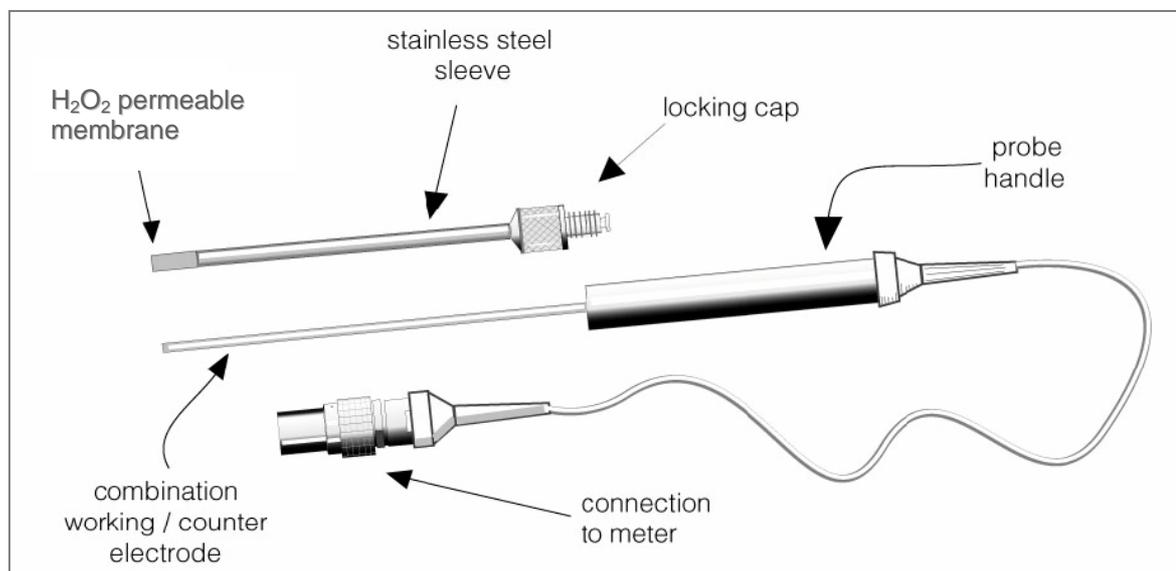


Abbildung 7-1: Aufbau der Wasserstoffperoxidelektrode [106]

Die Edelstahlhülse hat neben dem Schutz der inneren Elektrode vor Beschädigung die Funktion eines Faradayschen Käfigs. Diese Abschirmung ist wichtig, da die gemessene Stromstärke im Bereich weniger Nanoampere liegt. Ohne diese Isolation sind erhebliche Interferenzen zu erwarten. Interferenzen, die trotz der Abschirmung durch die Edelstahlhülse zu

Störungen führen, können mit Hilfe des angeschlossenen Messgerätes durch Filter unterschiedlicher Frequenzen reduziert werden.

Aufgrund des geringen Sensor-Durchmessers von zwei Millimetern ist die Untersuchung relativ kleiner Volumina möglich. Die Datenverarbeitung erfolgt über ein mitgeliefertes Computerprogramm.

Wie in Kapitel 6, wird auch bei diesem Messverfahren Wasserstoffperoxid mit den Substanzen, die bezüglich ihrer antioxidativen Kapazität untersucht werden sollen, über einen festgelegten Zeitraum inkubiert. Anschließend wird das nicht umgesetzte Wasserstoffperoxid mit Hilfe der Wasserstoffperoxidelektrode quantitativ erfasst. Die Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration ist somit ein Indikator für die antioxidative Kapazität der untersuchten Substanzen.

Um die Ergebnisse aus Kapitel 6 zu verifizieren, wurden mit der Wasserstoffperoxidelektrode die gleichen Verbindungen untersucht, wie mit der Clark-Elektrode. Dies erleichtert den Vergleich der beiden Verfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit.

7.2 Durchführung

Zunächst soll an dieser Stelle der Aufbau des Messsystems kurz beschrieben werden. Die Wasserstoffperoxidelektrode wurde mit einem Messgerät verbunden, das die übermittelten Daten weiter verarbeitet. Hier wurde auch die erforderliche Zersetzungsspannung eingestellt. Die gemessenen Stromstärkeänderungen, wurden von dem Messgerät in Spannungsdifferenzen umgerechnet und an einen Computer zur Datenverarbeitung weitergeleitet. Die Spannungsdifferenzen die am Computer ausgewertet wurden, verhielten sich folglich zu den Stromstärkeänderungen an der Elektrode proportional. Die Datenauswertung erfolgte über ein Programm, mit dem die übertragenen Spannungsdifferenzen in Abhängigkeit von der Zeit analysiert werden konnten.

Bei dieser Versuchsreihe wurde insgesamt ähnlich verfahren wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Auch hier wurden pro Substanz drei Messungen durchgeführt. Messung I enthielt sowohl die zu untersuchende Substanz als auch Wasserstoffperoxid, Messung II enthielt ausschließlich die zu untersuchende Substanz und Messung III enthielt nur Wasserstoffperoxid.

Alle verwendeten Lösungen, mit Ausnahme der Katalase-Lösung, wurden im Vergleich zu Wasserstoffperoxid in einem äquimolaren Ansatzverhältnis eingesetzt. Die Inkubationszeit für die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und der untersuchten Substanz wurde auf 30 Minuten festgelegt.

Mit diesem Messverfahren sollten die gleichen Substanzen wie in Kapitel 6 untersucht werden, um zum einen die Ergebnisse hinsichtlich der Antioxidantien und zum anderen die Messverfahren untereinander vergleichen zu können. Dazu wäre es auch hier erforderlich gewesen, die lipophilen Substanzen in einem wassermischbaren organischen Lösungsmittel zu lösen und dem Versuchsansatz zuzusetzen. In der Bedienungsanleitung des Messgerätes wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Elektrode nicht in organischen Lösungsmitteln verwendet werden darf. Eine Befragung des Herstellers diesbezüglich ergab, dass Lösungsmittel wie Acetonitril nur in einer Konzentration bis zu einem mmol pro Liter in der untersuchten Lösung vorliegen dürfen. Aufgrund dessen konnten mit dieser Methode keine lipophilen Antioxidantien untersucht werden. Demzufolge musste auf eine Untersuchung der Substanzen Melatonin, Naringenin, Quercetin und Retinol verzichtet werden. Trolox, welches in der Literatur häufig als wasserlösliches Vitamin E bezeichnet wird, konnte durch moderates Erhitzen in Wasser gelöst und mit dieser Versuchsanordnung vermessen werden.

Für die Substanzen, die sich im vorherigen Kapitel als Antioxidantien für Wasserstoffperoxid erwiesen haben, wurde die Wasserstoffperoxid-Konzentration während der gesamten Inkubationszeit aufgezeichnet. Bei der Messung I wurden Wasser und Antioxidans-Lösung vorgelegt und zwei Minuten nach Beginn der Aufzeichnung Wasserstoffperoxid injiziert. Bei Messung II wurden Antioxidans und Wasser gemischt und danach die Aufzeichnung gestartet. Diese Messung wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass die Substanz nicht selbst Wasserstoffperoxid freisetzt, oder anderweitig die Messung beeinflusst. Messung III wurde so durchgeführt, dass die Elektrode zunächst nur in Wasser eintauchte und zwei Minuten nach Beginn der Aufzeichnung Wasserstoffperoxid injiziert wurde.

Bei den Substanzen, die bisher keine Reaktion mit Wasserstoffperoxid gezeigt haben, wurde nach dem Mischen des vollständigen Versuchsansatzes die Inkubationszeit gestartet. Nach 20 Minuten wurde die Elektrode in die Probe eingetaucht, und nach Ablauf der 30 Minuten Inkubationszeit der Wert

der Wasserstoffperoxid-Konzentration abgelesen. Es war erforderlich, die Elektrode bereits 10 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit mit der Probelösung in Kontakt zu bringen, um eine Einstellung des Wasserstoffperoxid-Gleichgewichts zwischen der Probe und dem Inneren der Elektrode zu ermöglichen. Durch die hier beschriebene Vorgehensweise konnte eine größere Probenmenge pro Zeiteinheit bewältigt werden, da auf diese Weise mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden konnten. So wurde mit den Messungen I bis III verfahren, die pro Substanz je dreimal vermessen wurden.

Die Aufzeichnung und Auswertung der Messwerte soll an dieser Stelle kurz beschrieben werden. Zunächst wurde die Elektrode in bidestilliertes Wasser eingetaucht und bis zur Stabilisierung der Spannung gewartet. Anschließend wurde die Spannung am Messgerät auf null Volt korrigiert. Wenn keine weitere Veränderung beobachtet werden konnte, wurde die Messung gestartet. Die Elektrode wurde zunächst für 10 Minuten in bidestilliertem Wasser belassen, um einen Nullwert zu ermitteln, mit dem die Messwerte verglichen werden konnten. Aus diesem Vorgehen ergibt sich das erste Plateau in Abbildung 7-2, welches mit dem Buchstaben A gekennzeichnet wurde.

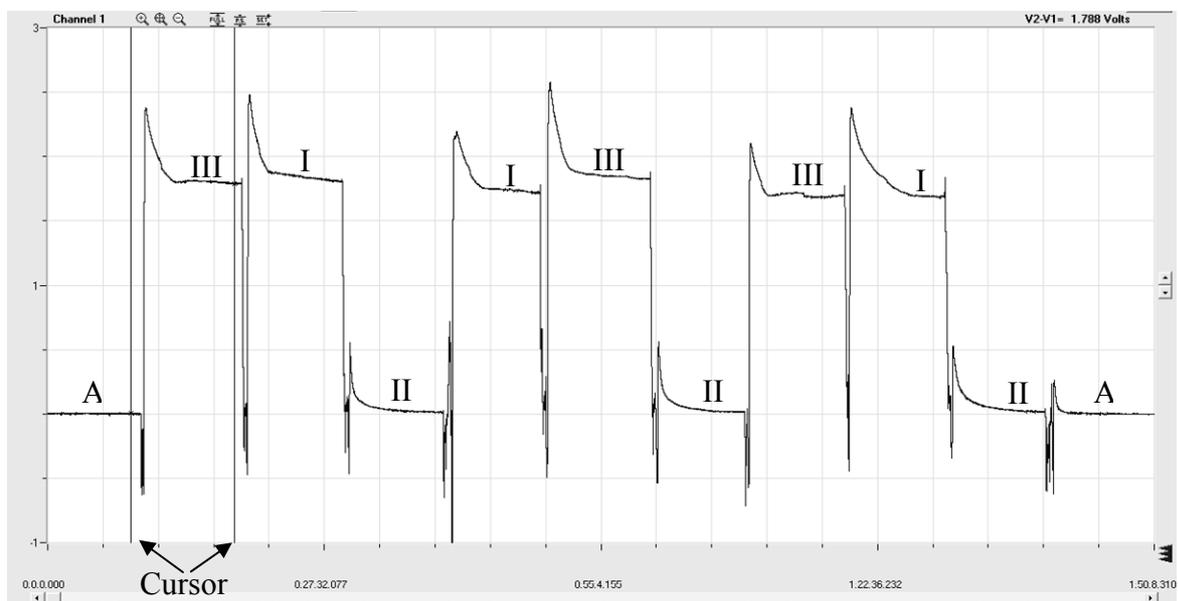


Abbildung 7-2: Auswertung mit dem Messprogramm Data-Trax®

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Messreihe die für N-Acetylcystein aufgenommen wurde. (A) bidestilliertes Wasser, (I-III) Messungen I bis III

Nach 10 Minuten wurde die erste Probe, deren Inkubationszeit 20 Minuten zuvor gestartet worden war, mit der Elektrode in Kontakt gebracht. So wurden in Abständen von 10 Minuten die Proben I bis III nacheinander vermessen. Bei jedem Probenwechsel wurde die Elektrode mit bidestilliertem Wasser gespült.

Für die Auswertung der Messungen stehen bei dem Messprogramm zwei Markierungslinien (Cursor) zu Verfügung, deren Differenz rechts oberhalb der aufgezeichneten Kurve dargestellt wird. Für die Ermittlung der Messwerte der Messungen I bis III, wurde eine Markierungslinie auf das Plateau A eingestellt, während die andere auf dem Plateau der jeweiligen Probe platziert wurde (Abbildung 7-2).

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Auswirkungen des Wasserstoffperoxid-Verbrauchs durch die Oxidation an der Anode

Wie in Kapitel 7.1 beschrieben, beruht das Verfahren auf der Messung der Stromstärke, die sich aus der Oxidation von Wasserstoffperoxid an der Anode ergibt. Daraus folgt, dass so lange die Elektrode in die Probelösung eintaucht, Wasserstoffperoxid verbraucht wird. Deshalb war es erforderlich zu überprüfen, ob bei längeren Messungen eine Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration festgestellt werden kann. Hierzu wurde die Elektrode in bidestilliertes Wasser eingetaucht und nach zwei Minuten Wasserstoffperoxid injiziert. Der Spannungsverlauf dieser Lösung wurde für 30 Minuten aufgezeichnet. Die Kurve in Abbildung 7-3 wurde aus den Mittelwerten von drei Messreihen erstellt.

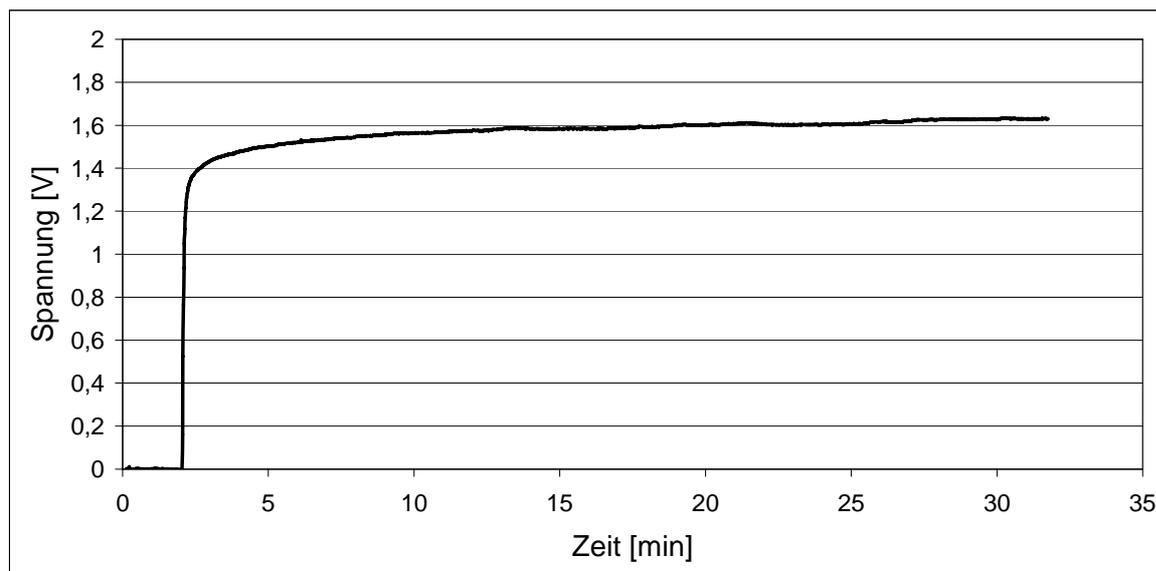


Abbildung 7-3: Wasserstoffperoxid-Lösung über 30 Minuten beobachtet

Die Wasserstoffperoxid-Lösung wurde nach 2 min injiziert.

Anstelle der erwarteten Abnahme der Spannung innerhalb der 30 Minuten, konnte ein geringfügiger Anstieg der Messwerte beobachtet werden. Dieser Anstieg beruht vermutlich darauf, dass nach einer Konzentrationsänderung die Einstellung des Gleichgewichts zwischen der Diffusion durch die Membran und der Oxidation des Wasserstoffperoxids an der Anode langsam verläuft. Das bedeutet, dass bei der untersuchten Wasserstoffperoxid-Konzentration für eine vollständige Stabilisierung des Messwertes über 30 Minuten erforderlich wären. Da dieser Zeitraum für die Messroutine viel zu lang ist, wurde als Konventionsmethode bei allen Substanzen, die bisher keine antioxidative Kapazität gezeigt haben, ein Zeitraum von 10 Minuten für die Gleichgewichtseinstellung eingehalten.

Die Vermutung, dass der Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Oxidationsreaktion an der Anode einen Einfluss auf die Auswertung der Ergebnisse hat, wurde nicht bestätigt.

7.3.2 Vermessung der Substanzen N-Acetylcystein, Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure und Trolox

Zunächst wurden die Substanzen untersucht, die in den vorangegangenen Kapiteln keine antioxidative Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid gezeigt haben.

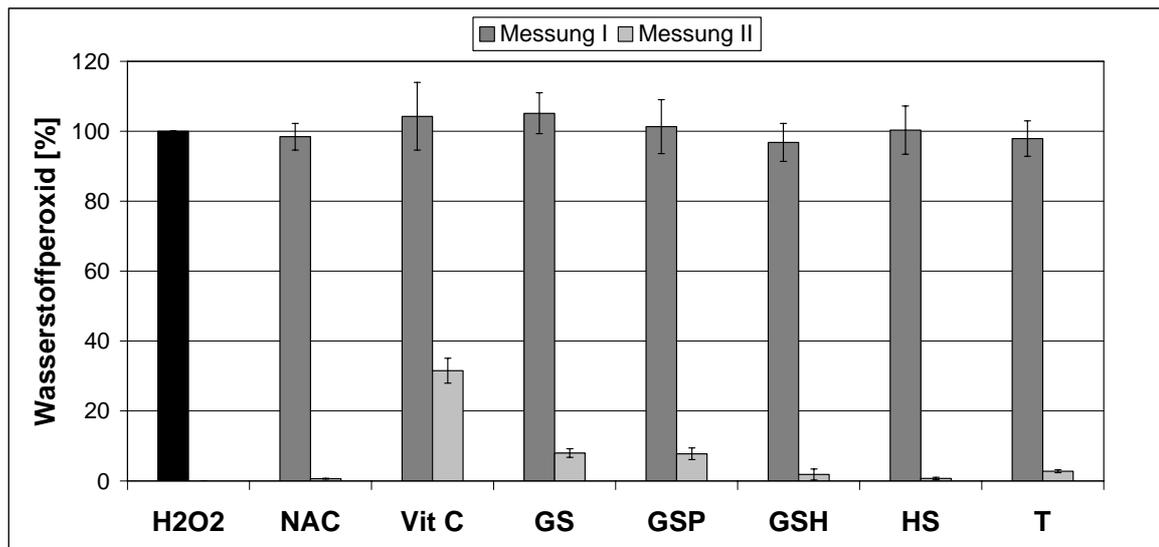


Abbildung 7-4: Untersuchte Substanzen im direkten Vergleich

Schwarzer Balken: Messung III (Wasserstoffperoxid-Vergleich = 100%)

NAC = N-Acetylcystein; Vit C = Ascorbinsäure; GS = Gallussäure; GSP = Gallussäurepropylester; GSH = Glutathion; HS = Harnsäure; T = Trolox

Der Abbildung 7-4 kann entnommen werden, dass auch bei dieser Versuchsreihe keine der untersuchten Substanzen eine Reaktion mit Wasserstoffperoxid gezeigt hat, da nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten keine Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration beobachtet werden konnte (Messung III). Obwohl Messung II nur mit den jeweiligen untersuchten Verbindungen und bidestilliertem Wasser in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid durchgeführt wurde, war der prozentuale Wasserstoffperoxidgehalt nicht gleich Null. Diese Beobachtungen werden im folgenden Kapitel erörtert.

7.3.3 Mögliche Interaktionen mit dem Messsystem

Der Messwert der Messung II zeigte bei Ascorbinsäure einen relativ hohen Wert, obwohl dieser Probe kein Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde. Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, beruht diese Beobachtung auf der Freisetzung von Wasserstoffperoxid durch Autoxidation der Ascorbinsäure. Für die Messung II wurde bei den übrigen Verbindungen erwartet, dass kein Wasserstoffperoxid detektiert werden kann. Dennoch waren alle Messwerte größer null. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Elektrode zuvor in eine Probe eintauchte, die Wasserstoffperoxid enthielt. Aus diesen Gründen befand sich beim Umhängen der Elektrode in das nächste Probengefäß wahrscheinlich noch Wasserstoffperoxid im Inneren der Elektrode. Für eine vollständige Diffusion aus dem Inneren der Elektrode in die Lösung war der Messzeitraum von 10 Minuten vermutlich zu kurz. Folglich wird in der Elektrode weiter Wasserstoffperoxid verbraucht und damit ein Strom zwischen Anode und Kathode erzeugt, der bei der Auswertung registriert wird, obwohl der Probe kein Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde. Die Messwerte für die Messung II liegen jedoch bei dieser Versuchsreihe mit Ausnahme des Wertes für Ascorbinsäure unter zehn Prozent. Auffällig ist hier, dass die beiden Gallussäure-Derivate Gallussäure und Gallussäurepropylester im Vergleich zu den anderen Substanzen relativ hohe Werte aufweisen. Eine mathematische Untersuchung hat ergeben, dass sich die Werte der Gallussäurederivate signifikant von den anderen gemessenen Werten unterscheiden. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass auch bei den beiden Gallussäure-Derivaten in wässriger Lösung Wasserstoffperoxid entstanden sein könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden sowohl die Lösungen der Gallussäure-Derivate als auch die Ascorbinsäure-Lösung nach einer Standzeit von mehreren Stunden erneut vermessen. Hierzu wurde die Elektrode in bidestilliertes Wasser eingetaucht und nach Stabilisierung des Messsignals die jeweilige Lösung injiziert. Ein spontaner Anstieg der Messwerte hätte zur Folge, dass in der Lösung Wasserstoffperoxid entstanden ist, während eine langsame Zunahme der Spannung vermutlich auf eine Interaktion der untersuchten Substanz mit dem Messsystem zurück zu führen ist.

Aus Abbildung 7-5 wird ersichtlich, dass im Falle der Ascorbinsäure direkt nach Injektion ein deutlicher Anstieg des Messwertes detektiert werden

konnte. Demzufolge beruht der verhältnismäßig hohe Wert, der bei Ascorbinsäure in Abbildung 7-4 für die Messung II gefunden wurde, auf einer Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus der Ascorbinsäure. Bei den Gallussäure-Derivaten hingegen konnte anstelle eines spontanen Anstiegs eine sehr langsame Zunahme der Messwerte beobachtet werden. Diese Beobachtung schließt eine Freisetzung von Wasserstoffperoxid durch die Gallussäure-Derivate aus. Ein Grund für diese Interaktion konnte im Rahmen dieser Messreihe nicht ermittelt werden. Möglicherweise durchdringen auch die Gallussäure-Derivate langsam die Elektrodemembran, obwohl die Membran für Wasserstoffperoxid selektiv sein soll. In diesem Fall wäre eine Reaktion an den inneren Elektroden denkbar, die zu einem Stromfluß und damit zu einem Signal bei der Versuchsauswertung führt.

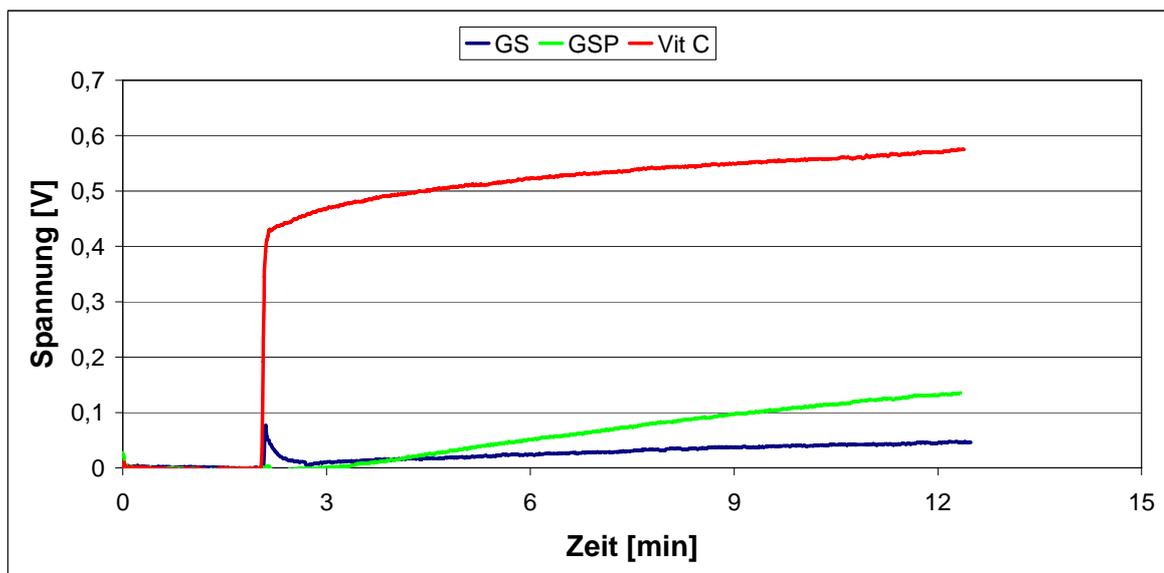


Abbildung 7-5: Vergleich von Gallussäure Gallussäurepropylester und Ascorbinsäure ohne den Zusatz von Wasserstoffperoxid.

7.3.4 Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus Ascorbinsäure

Da mit dieser Versuchsanordnung eine unterbrechungsfreie Aufzeichnung der Wasserstoffperoxid-Konzentration möglich ist, sollte mit dieser Methode die Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus einer Ascorbinsäure-Lösung untersucht werden. Hierzu wurde die Elektrode in bidestilliertes Wasser eingetaucht und die Messung nach Stabilisierung der Spannung gestartet.

Anschließend wurde die Ascorbinsäure-Lösung hergestellt und sofort injiziert. Die Wasserstoffperoxid-Entwicklung dieser Lösung wurde über einen Zeitraum von 11 Stunden verfolgt (Abbildung 7-6).

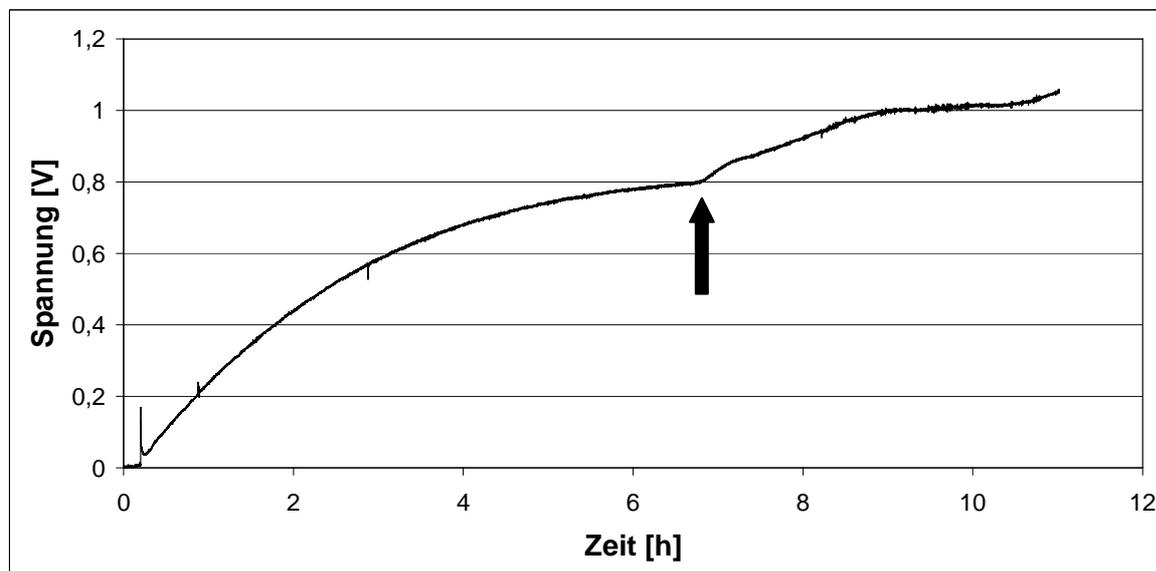


Abbildung 7-6: Freisetzung von Wasserstoffperoxid aus einer Ascorbinsäure-Lösung

Man kann der Abbildung entnehmen, dass innerhalb des Messzeitraums von 11 Stunden die gemessene Spannung von 0 Volt auf über 1 Volt angestiegen ist. Da die hier beschriebene Messung am selben Tag durchgeführt wurde, wie die Linearitätsuntersuchungen, kann die Geradengleichung der linearen Regression (7.3) zur Ermittlung der absoluten Wasserstoffperoxid-Freisetzung herangezogen werden. Hierbei steht Y für die Spannung und X für die Wasserstoffperoxid-Konzentration in μmol pro Liter.

$$Y = 0,0053X - 0,0258 \quad (7.3)$$

Umgeformt ergibt sich daraus die Formel (7.4), mit der direkt die Wasserstoffperoxid-Konzentration aus der Spannung berechnet werden kann.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{Y + 0,0258}{0,0053} \quad (7.4)$$

7 Wasserstoffperoxidelektrode

Hieraus ergeben sich die folgenden absoluten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen, die aus einer Ascorbinsäure-Lösung mit einer Konzentration von 0,333 mmol/L pro Stunde freigesetzt wurden.

Stunden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$\mu\text{mol/L}$	49	38	28	18	12	7	10	17	14	3	8

Insgesamt wurden in dem Untersuchungszeitraum von 11 Stunden 204 $\mu\text{mol/L}$ Wasserstoffperoxid freigesetzt. Vor allem in den ersten Stunden nach Herstellung der Ascorbinsäure Lösung, wurde besonders viel Wasserstoffperoxid generiert, während die Freisetzungsgeschwindigkeit danach wieder abnahm. In der ersten Stunde wurden 49 $\mu\text{mol/L}$ freigesetzt. Umgerechnet bedeutet das, dass aus einem Mol gelöster Ascorbinsäure in der ersten Stunde 147 Millimol Wasserstoffperoxid freigesetzt werden. Dies entspricht etwa 15 %.

Auffällig bei der Betrachtung der Wasserstoffperoxid-Freisetzungskurve ist der plötzliche Anstieg der Kurve nach etwa 7 Stunden (schwarzer Pfeil). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Reaktionen die für die Freisetzung von Wasserstoffperoxid verantwortlich sind, in Gegenwart von Licht und Wärme beschleunigt werden [107]. Da die Reaktion über Nacht durchgeführt wurde, war der Versuchsansatz zunächst keiner Lichtquelle ausgesetzt. In den Morgenstunden jedoch wurden die Raumlampen angeschaltet und die Reaktion wurde möglicherweise beschleunigt, was zu einer erneuten Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit zu einem Anstieg der Wasserstoffperoxid-Freisetzung geführt haben könnte. Aufgrund der offensichtlichen Steigerung der Freisetzungsgeschwindigkeit nach 7 Stunden Reaktionszeit, ist eine Auswertung der Kurve mit einem der gängigen kinetischen Modelle nicht möglich

7.3.5 Untersuchung der Antioxidantien EUK-8 und EUK-134 im Vergleich mit Katalase

Wie in Kapitel 7.2 beschrieben, wurden die Verbindungen EUK-8 und EUK-134, die im vorherigen Kapitel eine antioxidative Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid gezeigt haben, mit der Wasserstoffperoxidelektrode untersucht. Parallel wurde eine Katalase-Lösung vermessen. Wie im vorherigen Kapitel wurden die Antioxidantien EUK-8 und EUK-134 wie die übrigen Substanzen in einer Konzentration von 1 Millimol pro Liter eingesetzt, während die Katalase Lösung aufgrund der hohen Molekülmasse in einer Konzentration von 1 Mikromol pro Liter verwendet wurde. Der große Vorteil bei diesem Verfahren ist, dass im Gegensatz zu den Untersuchungen mit der Clark Elektrode eine unterbrechungsfreie Aufzeichnung der Wasserstoffperoxid-Konzentration möglich ist. Das heißt, nach Injektion von Wasserstoffperoxid, kann der Abbau mit bis zu 200 Datenpunkten pro Sekunde verfolgt werden. Eine derartige Datendichte ist jedoch für diese Versuchsreihe nicht empfehlenswert, da das Tabellenkalkulationsprogramm Excel nicht beliebig viele Datenpunkte verarbeiten kann. Die Software, die für die Aufnahme und Auswertung der Daten verwendet wurde, verfügt jedoch über die Möglichkeit auch nach Aufnahme der Daten die Datenmenge zu reduzieren.

Die Abbildungen 7-7 bis 7-9 zeigen die Messungen I bis III, die für die Antioxidantien EUK-8, EUK-134 und Katalase durchgeführt wurden. Jede Kurve wurde aus den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung berechnet.

7 Wasserstoffperoxidelektrode

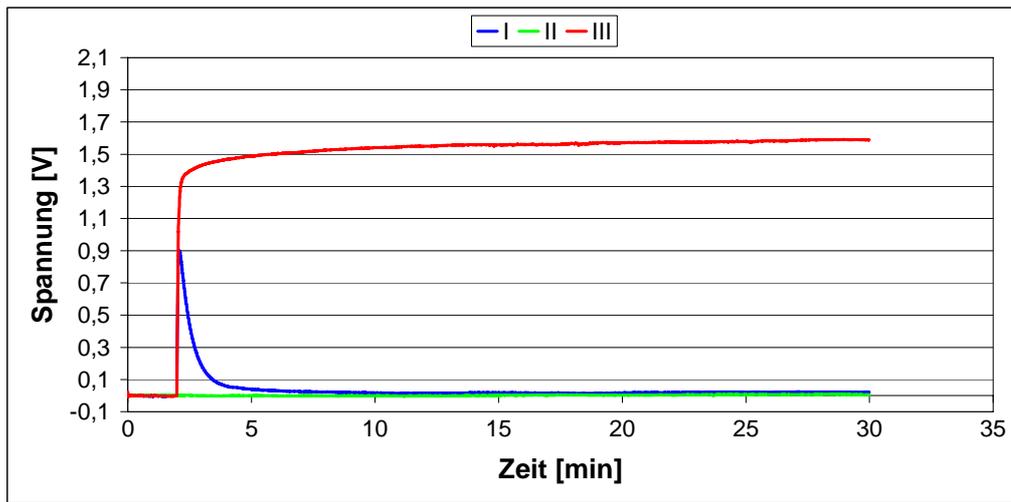


Abbildung 7-7: Zusammenfassung EUK-8

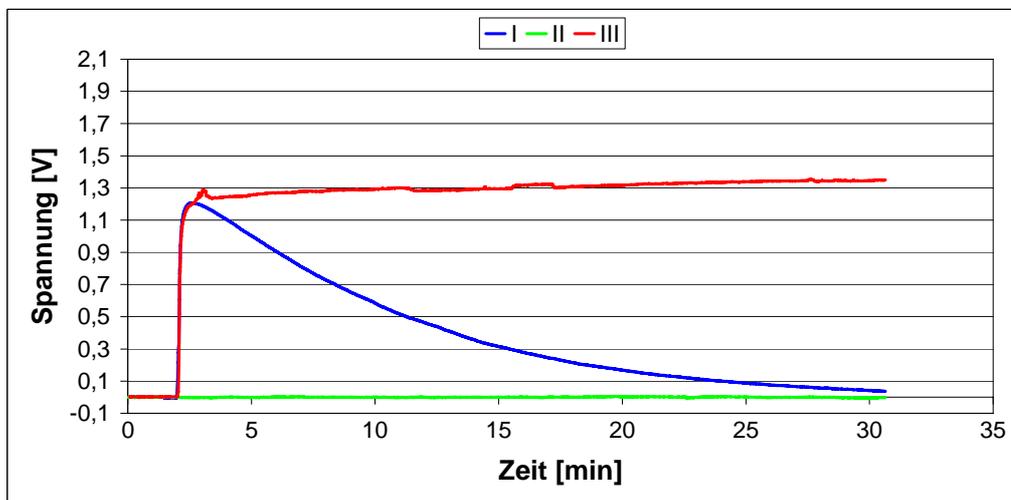


Abbildung 7-8: Zusammenfassung EUK-134

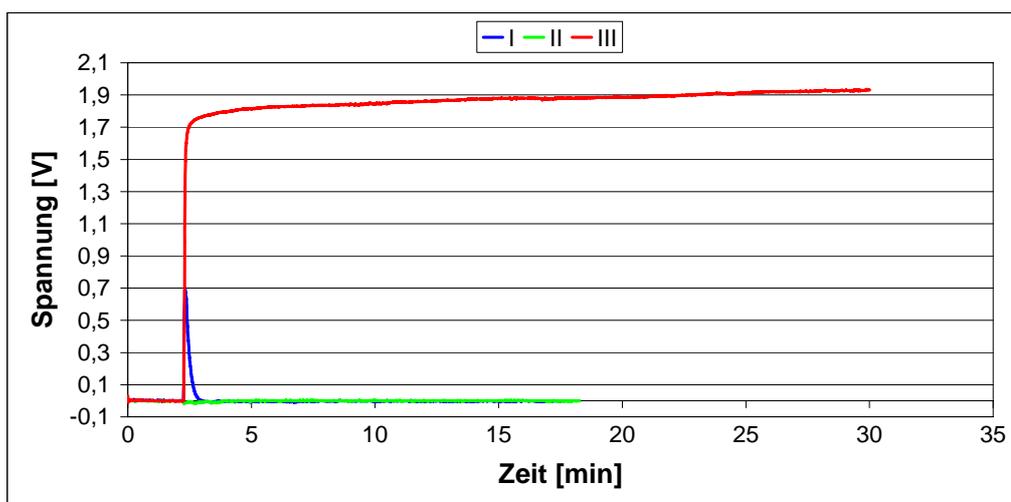


Abbildung 7-9: Zusammenfassung Katalase

Die hier abgebildeten Ergebnisse ermöglichen eine eindeutige Einteilung der Antioxidantien hinsichtlich der antioxidativen Kapazität gegenüber Wasserstoffperoxid. Während das Enzym Katalase, welches im Gegensatz zu den beiden anderen Antioxidantien 1000fach verdünnt vorlag, innerhalb einer Minute die injizierte Menge Wasserstoffperoxid vollständig zerstörte, benötigte die Verbindung EUK-8 dafür etwas über fünf Minuten. Bei der Verbindung EUK-134 dagegen war auch nach 30 Minuten noch Wasserstoffperoxid nachweisbar. Folglich ist EUK-8 im Vergleich zu EUK-134 das wesentlich potentere Antioxidans. Dennoch wird die antioxidative Kapazität der Katalase von beiden Antioxidantien nicht erreicht. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen aus Kapitel 6, in dem diese Reihenfolge bereits vermutet wurde.

7.3.6 Bestimmung der Halbwertszeit von Wasserstoffperoxid bei der Reaktion mit den Antioxidantien EUK-8 und EUK-134

Um die antioxidative Kapazität quantifizieren zu können, soll auch hier die Halbwertszeit von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit der Antioxidantien EUK-8 und EUK-134 bestimmt werden. Bei der Verbindung EUK-134 ist dies möglich, indem die Werte der Messung I , die nach der Injektion der Wasserstoffperoxid-Lösung gemessen wurden logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen werden. Daraus ergibt sich die Kurve in Abbildung 7-10.

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Reaktion von EUK-134 mit Wasserstoffperoxid wird die Steigung der Geraden aus der logarithmierten Kurve in die Formel 6-8 eingesetzt. Daraus ergibt sich eine Halbwertszeit von 334 Sekunden. Dies entspricht etwa $5\frac{1}{2}$ Minuten. In Kapitel 6 wurde eine fast dreifach längere Halbwertszeit gefunden. Dabei muss bedacht werden, dass die Halbwertszeit in Kapitel 6 aus sechs Werten ermittelt wurde, während die Halbwertszeit bei der hier beschriebenen Versuchsreihe aus einer kontinuierlichen Messung der Wasserstoffperoxid-Konzentration errechnet wurde. Aufgrund der geringeren Störanfälligkeit der hier beschriebenen Versuchsanordnung, muss davon ausgegangen werden, dass dieses Verfahren die zuverlässigeren Ergebnisse liefert.

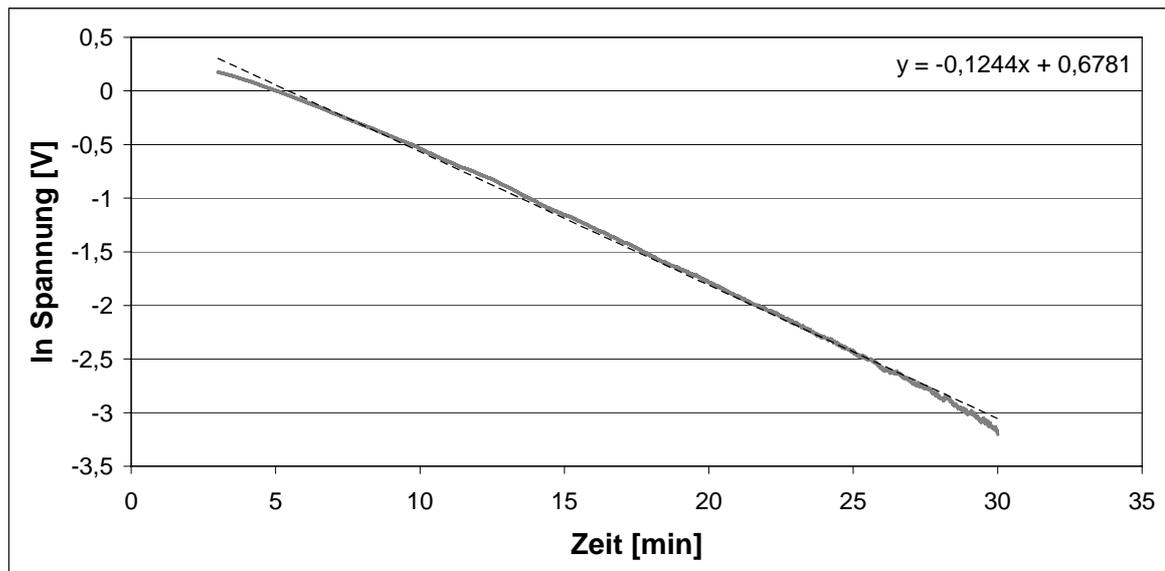


Abbildung 7-10: Die Logarithmierung der Ergebnisse für EUK-134 ergibt eine Gerade

Anschließend sollte die Halbwertszeit der Reaktion von EUK-8 mit Wasserstoffperoxid bestimmt werden. Folglich wurden auch hier die Messwerte der Messung I logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen. Dieser Rechenschritt führte jedoch nicht wie bei der Verbindung EUK-134 zu einer Geraden. Aufgrund dessen kann diese Messreihe nicht mit der Formel (6-8), die für die Bestimmung der Halbwertszeit einer Reaktion erster Ordnung angegeben wurde, ausgewertet werden.

Diese Beobachtung kann durch die hohe Reaktionsgeschwindigkeit erklärt werden, mit der EUK-8 das Wasserstoffperoxid zerstört. Es muss davon ausgegangen werden, dass sich nach Injektion des Wasserstoffperoxids zwei gegenläufige Prozesse im Probengefäß überlagern: An der Membran der Wasserstoffperoxidelektrode stellt sich das Gleichgewicht ein, das für eine Messung der Konzentration erforderlich ist. Folglich steigt die gemessene Spannung an, bis dieses Gleichgewicht erreicht wird. Gleichzeitig jedoch wird aufgrund der erwähnten hohen Reaktionsgeschwindigkeit bereits Wasserstoffperoxid zerstört, was zu einer Abnahme der gemessenen Spannung führt. Daraus folgt, dass zum Zeitpunkt des Ansprechens der Elektrode auf die Konzentrationsänderung bereits ein großer Teil des Analyten durch das EUK-8 zerstört wurde. Dieser gegenläufige Prozess ist ebenfalls bei EUK-134 zu erwarten, jedoch ohne wesentlichen Einfluss auf die Messung, da hier die Zerstörung des Wasserstoffperoxids wesentlich langsamer abläuft als die Gleichgewichtseinstellung an der Elektrode.

Dennoch soll anhand der Grafik die Halbwertszeit der Reaktion von EUK-8 mit Wasserstoffperoxid abgeschätzt werden. Dazu wird zum Zeitpunkt der Injektion der maximale Wert für die Wasserstoffperoxid-Konzentration angenommen, der aus den Kurven der Messungen III bestimmt wurde. Dann wird aus der Kurve der Messung I die Zeit ermittelt, in der die Hälfte der angenommenen Ausgangskonzentration zerstört wurde. Daraus ergibt sich eine Halbwertszeit für die Reaktion von EUK-8 mit Wasserstoffperoxid von etwa 10 bis 20 Sekunden.

7.3.7 Permeabilitätsverlust der Elektrodenmembran

Ein Problem bei dieser Versuchsanordnung wird ersichtlich, wenn man die Ergebnisse der Messung III in den Abbildungen 7-7 bis 7-9 vergleicht. Obwohl die Wasserstoffperoxid-Konzentration bei jeder dieser Messungen gleich war, unterscheiden sich die gemessenen Spannungen erheblich.

Die gemessene Stromstärke bzw. die aufgezeichnete Spannung nahm von Tag zu Tag immer weiter ab. Aufgrund der Vermutung, dass die Abnahme der Messwerte auf einen zunehmenden Permeabilitätsverlust der Elektrodenmembran zurückzuführen ist, wurde die Membran durch eine neue ersetzt. Diese Maßnahme führte zu einer Steigerung des gemessenen Potentials auf den ursprünglichen Wert. Vermutlich liegt der Grund für diese Beobachtung in einer Adhäsion der untersuchten Substanzen an der Elektrodenmembran, was zu einem sukzessiven Permeabilitätsverlust führt. Aber auch mit einer neuen Membran konnte trotz intensiven Spülens mit bidestilliertem Wasser, von Tag zu Tag eine Abnahme der Messwerte beobachtet werden.

Besonders problematisch waren vor allem die Messungen die in Anwesenheit der Katalase durchgeführt wurden. Auch durch intensives Spülen mit bidestilliertem Wasser konnte das Enzym nicht vollständig von der Elektrodenmembran entfernt werden. Wurde eine Messung in Anwesenheit von Katalase durchgeführt, konnte bei den nachfolgenden Messungen reiner Wasserstoffperoxid-Lösungen ein deutlicher Abbau des Analyten durch das anhaftende Enzym festgestellt werden. Im Falle der Katalase war nach mehreren Versuchen die Elektrode mit verdünnten Säuren zu reinigen, ein Wechsel der Elektrodenmembran erforderlich. Insgesamt

wurden in einem Messzeitraum von zwei Wochen vier Membranen verbraucht.

Trotz der beschriebenen Abnahme der Messwerte im Laufe der Versuchstage, war innerhalb der einzelnen Versuchsreihen kein Trend der Ergebnisse wahrnehmbar. Auch ein Vergleich der Ergebnisse, die an unterschiedlichen Tagen ermittelt wurden, war möglich, da die Messungen jeweils auf die Messwerte der Messung III bezogen wurden, die ausschließlich Wasserstoffperoxid enthielt. Ein Vergleich der absoluten Werte wäre hier aufgrund der erwarteten Schwankungen nicht sinnvoll gewesen.

7.4 Validierung

7.4.1 Linearität

Um die Linearität des beschriebenen Verfahrens zu bestimmen, wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe mit fünf Konzentrationsniveaus vermessen. Für jedes Konzentrationsniveau wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

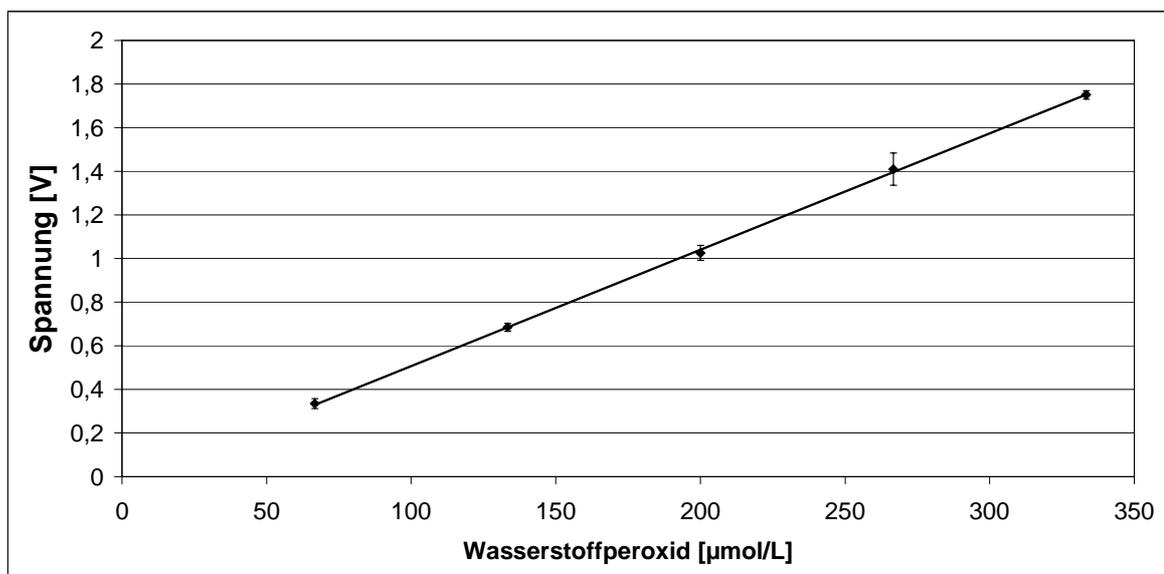


Abbildung 7-11: Wasserstoffperoxid-Konzentrationsreihe zur Bestimmung der Linearität

Die Dintest[®]-Auswertung für die lineare Regression, so wie die Ergebnisse des Mandel-Tests befinden sich im experimentellen Teil (Kapitel 11).

Bei der durchgeführten Linearitätsuntersuchung konnte für die lineare Regression ein Korrelationskoeffizient von 0,9998 ermittelt werden. Die Prüfung auf Normalverteilung der Residuen, ergab bei Dintest[®] jedoch sowohl für die lineare als auch für die quadratische Funktion keine Normalverteilung. Eine daraufhin selbst durchgeführte Untersuchung der Normalverteilung der Residuen für die lineare Regression mit Hilfe des David-Tests bestätigte das Ergebniss der Dintest[®]-Auswertung nicht. Ungeachtet dieser unterschiedlichen Ergebnisse, kann das Verfahren aufgrund des bemerkenswerten Korrelationskoeffizienten von 0,9998 linear ausgewertet werden.

7.4.2 Präzision

Messpräzision

Es wurde eine Probe hergestellt, die der Messung III aus Kapitel 7.2 entsprach (siehe auch Kapitel 11; Experimenteller Teil). Nach dem Nullabgleich mit bidestilliertes Wasser, wurde die Probe 6mal hintereinander für etwa 10 Minuten vermessen. Zwischen den Messungen wurde der Sensor mit bidestilliertem Wasser gespült, um die Bedingungen einzuhalten, die auch während den Messungen vorlagen.

Messung	1	2	3	4	5	6
Spannung [V]	1,752	1,790	1,817	1,830	1,825	1,816

Tabelle 7-1: Bestimmung der Messpräzision

Methodenpräzision

Für die Bestimmung der Methodenpräzision wurden sechs Wasserstoffperoxid Lösungen der Konzentration 0,1 mmol pro Liter hergestellt. Jede dieser Lösungen wurde weiter verdünnt, sodass sechs Proben mit der Zusammensetzung der Messung III entstanden. Die Proben wurden nach

einem Nullabgleich der Elektrode nacheinander für 10 Minuten vermessen. Auch hier wurde bei jedem Probenwechsel die Elektrode kurz gespült.

Messung	1	2	3	4	5	6
Spannung [V]	1,669	1,630	1,693	1,659	1,634	1,619

Tabelle 7-2: Bestimmung der Methodenpräzision

	Messpräzision	Methodenpräzision
Mittelwert [V]	1,805	1,651
Standardabweichung [V]	0,029	0,028
Variationskoeffizient	1,629	1,693
David Test	2,652	2,648

Tabelle 7-3: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung

David-Test g_u/g_o (6, P = 99 %): 2,15 / 3,16

Da die beiden Messreihen normalverteilt sind, kann die Auswertung mit den üblichen statistischen Methoden erfolgen. Sowohl der Dixon-Test als auch der Grubbs Test lieferten keinen Hinweis auf Ausreißer. Bei der Betrachtung der Variationskoeffizienten von Mess- und Methodenpräzision fällt auf, dass sich die beiden Werte kaum unterscheiden. Daraus folgt, dass die Streuung, die durch das Verdünnen der Wasserstoffperoxid-Lösung und durch die Herstellung der Proben entsteht, so gering ist, dass sie nahezu keinen Einfluss auf das Messverfahren hat. Die Präzision dieses Verfahrens kann insgesamt als akzeptabel eingestuft werden.

7.5 Diskussion

7.5.1 Diskussion der Methode

Die beschriebene Methode bietet ein unkompliziertes Verfahren um potenzielle Antioxidantien für Wasserstoffperoxid zu ermitteln und diese anschließend durch die Bestimmung der Reaktionshalbwertszeit gemäß ihrer antioxidativen Kapazität einzustufen. Dabei kann der Wasserstoffperoxidabbau direkt verfolgt werden, ohne dass weitere Reagenzien zugesetzt

werden müssen. Ein Eingriff in das Messsystem ist folglich nicht erforderlich. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass Nebenreaktionen durch weitere Bestandteile der Probelösung ausgeschlossen werden können. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass eine Untersuchung lipophiler Substanzen nicht möglich ist, da der Sensor laut Hersteller organische Lösungsmittel nur bis zu einer Konzentration von 1 mmol/L toleriert. Folglich konnten einige der Verbindungen, die in Kapitel 6 untersucht wurden nicht vermessen werden.

Kritisch betrachtet werden muss auch die Dauer, die der Sensor für die Gleichgewichtseinstellung nach einer Konzentrationsänderung benötigt. Dies fällt besonders bei den Verbindungen auf, die besonders schnell mit Wasserstoffperoxid reagieren, wie zum Beispiel EUK-8 oder Katalase. Nach Injektion der Wasserstoffperoxid-Lösung wird bereits ein großer Teil des Analyten durch die zugesetzten Antioxidantien zerstört, bevor der Sensor die Konzentrationsänderung detektiert hat. Aufgrund dessen kann jeweils nur ein Teil der Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und dem Antioxidans aufgezeichnet werden. Je schneller diese Reaktion abläuft, desto schwieriger ist die Auswertung der Reaktionskinetik mit diesem Verfahren. Dieses Problem kann auch dadurch nicht behoben werden, dass eine Wasserstoffperoxid-Lösung vorgelegt und anschließend das Antioxidans zugesetzt wird, da die Injektion des Antioxidans zu einer Verdünnung der Probelösung führt. Daraus folgt, dass auch hier zunächst wieder eine Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Inneren der Elektrode und der Probelösung erfolgen muss, bevor die tatsächliche Wasserstoffperoxid-Konzentration angezeigt werden kann. Die Verwendung von konzentrierteren Antioxidans-Lösungen um den Verdünnungseffekt zu minimieren ist nicht möglich, da einige der untersuchten Substanzen keine ausreichende Löslichkeit aufweisen.

Ein weiterer Kritikpunkt bezüglich des Wasserstoffperoxidsensors ist, dass seitens des Herstellers keine Informationen über das Selektionsprinzip der Elektrodenmembran veröffentlicht werden. Wäre dieser Mechanismus bekannt, könnten möglicherweise Interaktionen vermieden werden, die sich aus einer mangelnden Selektivität der Membran ergeben. Diese Interaktion scheint bei den Verbindungen Gallussäure und Gallussäurepropylester aufzutreten, da bei den beiden Gallussäurederivaten ein Anstieg des

Messsignals beobachtet werden konnte, obwohl kein Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde.

Um mit der beschriebenen Versuchsanordnung routinemäßig Verbindungen hinsichtlich der Reaktivität gegenüber Wasserstoffperoxid untersuchen zu können, ist die Entwicklung eines Reinigungskonzeptes für die Elektrodenmembran erforderlich, da der Verschleiß der Austauschmembranen ansonsten erhebliche Kosten hervorruft.

Trotz der beschriebenen Probleme, die sich bei der Anwendung ergeben haben, ist dieses Messverfahren das anwenderfreundlichste der bisher untersuchten Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid. Zusammenfassend sind die großen Vorteile dieses Messverfahrens, dass außer Wasserstoffperoxid und der zu untersuchenden Substanz keine weiteren Chemikalien benötigt werden und dass die Wasserstoffperoxid-Konzentration ununterbrochen verfolgt werden kann.

7.5.2 Diskussion der Antioxidantien

Auch in dieser Versuchsreihe bestätigt sich, dass keine der Verbindungen N-Acetylcystein, Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure und Trolox Antioxidantien in Bezug auf Wasserstoffperoxid darstellen. Die Verbindungen EUK-8 und EUK-134 hingegen, die in der Literatur als Katalase-Mimetika bezeichnet werden, zeigen eine deutliche Aktivität gegenüber Wasserstoffperoxid. Die beiden Antioxidantien unterscheiden sich jedoch wesentlich in ihrer antioxidativen Kapazität. Während die Halbwertszeit der Reaktion zwischen EUK-8 und Wasserstoffperoxid im Bereich weniger Sekunden liegt, weist sie bei EUK-134 mehr als 5 Minuten auf. Die Halbwertszeit bei der Katalase liegt dagegen noch wesentlich niedriger. Eine Bestimmung der exakten Halbwertszeit der Katalase ist hier nicht sinnvoll, da sie vom Typ und vom Reinheitsgrad des verwendeten Enzyms abhängig ist. Die Katalase wird in dieser Versuchsreihe nur als Vergleich eingesetzt, um die Verbindungen EUK-8 und EUK-134 hinsichtlich ihrer antioxidativen Kapazität einstufen zu können. Hierbei muss bedacht werden, dass sich die zugrunde liegende Reaktionskinetik der Verbindungen EUK-8 und EUK-134 im Vergleich mit

Katalase grundlegend unterscheiden. Während bei den beiden Mangan-Salen-Komplexen von einer Reaktion 1. Ordnung ausgegangen werden muss, beruht die Reaktionskinetik des Enzyms auf der Michaelis-Menten-Theorie. Trotz der unterschiedlichen kinetischen Modelle haben die durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass das Antioxidans EUK-8 aufgrund der niedrigen Halbwertszeit als Katalase-Mimetikum bezeichnet werden kann, auch wenn die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms Katalase nicht erreicht wird. Es hat sich gezeigt, dass bei der Verbindung EUK-8 die Einführung von zwei Methoxy-Gruppen die zu der Verbindung EUK-134 führt, keinen positiven Einfluss auf die Reaktion mit Wasserstoffperoxid hat. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten, die von Baker und Mitarbeitern [104] publiziert wurden.

Mit der hier beschriebenen Versuchsanordnung war eine unterbrechungsfreie Verfolgung der Wasserstoffperoxid-Freisetzung aus einer Ascorbinsäure-Lösung möglich. Die aufgezeichnete Freisetzungskurve konnte jedoch mit keinem der gängigen Modelle zur Bestimmung der Reaktionskinetik ausgewertet werden. Licht und Temperatur scheinen einen erheblichen Einfluss auf die Geschwindigkeit zu haben, mit der die Autoxidation der Ascorbinsäure und letztlich die Freisetzung von Wasserstoffperoxid abläuft. Ungeachtet der Schwierigkeiten die Ergebnisse mathematisch auszuwerten, wird bei dieser Versuchsreihe deutlich, dass eine wässrige Ascorbinsäure Lösung abhängig von der Zeit erhebliche Mengen Wasserstoffperoxid freisetzt. Folglich sollte darauf geachtet werden, dass wässrige Ascorbinsäure-Lösungen direkt nach der Herstellung vermessen werden. Ist eine direkte Vermessung der Ascorbinsäure-Lösung nicht möglich, ist ein kühler und dunkler Lagerort zu empfehlen. Wenn möglich sollte die Aufbewahrung unter Sauerstoffausschluss erfolgen.

8 Abschlussdiskussion und Ausblick

Insgesamt wurden fünf Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid untersucht. Die Gemeinsamkeit dieser Verfahren besteht darin, dass Wasserstoffperoxid mit einem potentiellen Antioxidans über einen festgelegten Zeitraum inkubiert und anschließend quantifiziert wird. Als sinnvoll haben sich dabei die beiden elektrochemischen Verfahren unter Verwendung der Clark-Elektrode und der Wasserstoffperoxid-Elektrode erwiesen. Während mit Hilfe der Clark-Elektrode lediglich eine Abschätzung der antioxidativen Kapazität möglich ist, kann mit der Wasserstoffperoxid-Elektrode der Abbau von Wasserstoffperoxid genau verfolgt und statistisch ausgewertet werden. Ein Nachteil der Wasserstoffperoxid-Elektrode ist jedoch, dass die Elektrodenmembran organische Lösungsmittel wie Acetonitril nur bis zu einer Konzentration von 1 mmol/L toleriert und folglich ausschließlich wasserlösliche Verbindungen vermessen werden können. Mit der Clark-Elektrode können hingegen sowohl wasser- als auch lipidlösliche Verbindungen untersucht werden. Bezüglich der Handhabung und Auswertbarkeit ist das Messsystem der Wasserstoffperoxid-Elektrode dem Verfahren mit der Clark-Elektrode vorzuziehen. Jedoch ist letzteres Verfahren, das deutlich kostengünstigere.

Wie bereits in Kapitel 1.5.2 erwähnt, wäre es wünschenswert eine einfach durchführbare Testserie zu entwickeln, mit deren Hilfe die antioxidative Kapazität in Bezug auf die wichtigsten ROS bestimmt werden kann. Für dieses Vorhaben stehen bei der Firma WPI neben der Wasserstoffperoxid-Elektrode noch weitere Elektroden zur Quantifizierung reaktiver Spezies zur Verfügung. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem die Superoxidradikalanion-Elektrode, die mit dem Messsystem der Wasserstoffperoxid-Elektrode kompatibel ist.

Außerdem könnte die Sauerstoffelektrode, die ebenfalls für das beschriebene Messsystem erhältlich ist, für die Durchführung des TRAP-Verfahrens verwendet werden. Mit diesem Verfahren kann die antioxidative Kapazität einer Verbindung bei einer simulierten Lipidperoxidationskettenreaktion bestimmt werden. Diese Vorgehensweise ist sinnvoller als die alleinige Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf die einzelnen Spezies

wie Peroxylradikale, Alkoxylradikale und Hydroperoxide, die an der Lipidperoxidation beteiligt sind.

Auf diese Weise wäre die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid, Superoxidradikalanion und die reaktiven Spezies der Lipidperoxidation mit nur einem Messsystem möglich.

9 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid. Insgesamt wurden fünf Verfahren vorgestellt, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass Wasserstoffperoxid mit einem potentiellen Antioxidans über einen festgelegten Zeitraum inkubiert und anschließend quantifiziert wird. Die Verfahren unterscheiden sich vor allem in der Methode, die für die Quantifizierung des Wasserstoffperoxids verwendet wird.

Zunächst wurde ein Verfahren untersucht, welches häufig zur Quantifizierung von sehr kleinen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen bis in den nM-Bereich verwendet wird. Bei dieser Methode wird das fluoreszierende Cumarinderivat Scopoletin in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid zum Orthochinon oxidiert. Die Oxidation des Scopoletins führt zu einem Verlust der Fluoreszenz. Die Fluoreszenzminderung verhält sich dabei proportional zur vorhandenen Wasserstoffperoxid-Konzentration. Wird nun ein Antioxidans für Wasserstoffperoxid zugesetzt, liegt weniger Wasserstoffperoxid in der Lösung vor, was zu einer geringeren Fluoreszenzabnahme führt. Einige der mit dieser Methode untersuchten Verbindungen stellten sich jedoch ebenfalls als Substrate der Meerrettichperoxidase heraus. Die Folge ist, dass diese Verbindungen anstelle des Scopoletins in einer peroxidasekatalysierten Reaktion durch das Wasserstoffperoxid oxidiert werden, obwohl keine direkte Reaktion zwischen der untersuchten Substanz und dem Wasserstoffperoxid stattgefunden hat. Aufgrund der geringen Substratspezifität der Meerrettichperoxidase ist dieses Verfahren für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid nicht geeignet.

Des Weiteren wurde ein Verfahren überprüft, welches auf einer einfachen komplexometrischen Reaktion beruht, die in der qualitativen anorganischen Analytik von Titan(IV)-Salzen Verwendung findet. Bei dieser Reaktion reagieren Wasserstoffperoxid und Titan(IV) in saurer Lösung zum orangegelben Peroxotitan-Kation, welches photometrisch vermessen werden kann. Die Absorption dieser Lösung verhält sich direkt proportional zur Wasserstoffperoxid-Konzentration. Bei dem Versuch diese Reaktion in Anwesenheit potentieller Antioxidantien durchzuführen, konnte bei einigen

der untersuchten Substanzen eine intensive Rotfärbung der Lösung beobachtet werden. Diese Färbung beruht auf der Reduktion von Titan(IV) zum roten Titan(III) in Anwesenheit von Verbindungen mit reduktivem Potential. Da viele Antioxidantien Reduktionsmittel sind, ist auch dieses Verfahren nicht für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid geeignet.

Bei dem dritten Verfahren, welches untersucht wurde, wird Methanol in einer Katalase-katalysierten Reaktion durch Wasserstoffperoxid zu Formaldehyd oxidiert. Diese Reaktion beruht auf der besonderen Eigenschaft der Katalase in Anwesenheit geeigneter Substrate als Peroxidase reagieren zu können. Der entstandene Formaldehyd reagiert im Anschluss mit Chromotropsäure und Schwefelsäure zu einem rotvioletten Produkt, welches photometrisch vermessen werden kann. Aufgrund der unbefriedigenden statistischen Daten und der wenig anwenderfreundlichen Handhabung dieses Testverfahrens, wurde auf weitere Versuche in Anwesenheit von Antioxidantien verzichtet.

Bei dem vierten Verfahren, welches für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid verwendet wurde, wird das nicht durch Antioxidantien umgesetzte Wasserstoffperoxid in saurem Milieu mit Kaliumpermanganat-Lösung zu molekularem Sauerstoff oxidiert. Die dabei entstehende Gasmenge verhält sich proportional zur ursprünglichen Wasserstoffperoxid-Konzentration und kann mit Hilfe einer Clark-Elektrode quantifiziert werden. Dieses Verfahren ist geeignet um Verbindungen hinsichtlich der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid einzustufen. Da die Wasserstoffperoxid-Konzentration nicht kontinuierlich gemessen werden kann, ist die Bestimmung der Halbwertszeit mit der das Wasserstoffperoxid abgebaut wird schwierig.

Bei der fünften Methode kann die Wasserstoffperoxid-Konzentration während der Umsetzung mit dem Antioxidans direkt mit Hilfe einer Wasserstoffperoxidelektrode verfolgt werden, ohne dass weitere Reagenzien zugesetzt werden müssen. Diese Methode eignet sich im Vergleich mit den anderen hier vorgestellten Verfahren am Besten für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid und ermöglicht die Bestimmung der Halbwertszeit mit der das Wasserstoffperoxid abgebaut wird.

Mit den beiden letztgenannten Verfahren, wurden die folgenden Verbindungen untersucht: N-Acetylcystein, Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure, Melatonin, Naringenin, Quercetin, Retinol, Trolox, EUK-8 und EUK-134. Mit Ausnahme der Mangan-Salen-Komplexe EUK-8 und EUK-134, die in der Literatur als Katalase-Mimetika beschrieben werden, konnte bei keiner der genannten Verbindungen eine antioxidative Kapazität in Bezug auf Wasserstoffperoxid gemessen werden.

10 Summary

The aim of this work was to develop and establish various methods to analyse the antioxidative capacity of several substances in regard to hydrogen peroxide. Five methods were presented, which have in common, that hydrogen peroxide is incubated with a potential antioxidant for a defined space of time, before it is quantified. The methods differ in the procedure which is used for quantifying hydrogen peroxide.

First, a method was examined, that is often used to quantify very low hydrogen peroxide concentrations down to the nM-range. In this assay, scopoletin, a fluorescent coumarin-derivative, is oxidized to an orthoquinone in presence of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. The oxidation of scopoletin causes a loss of fluorescence. The decay of fluorescence is proportional to the present concentration of hydrogen peroxide. If an antioxidant is added to a solution containing hydrogen peroxide, it leads to a decrease in the concentration of the peroxide. This results in a decline in the loss of fluorescence. However, some of the chemical substances that were examined by this method, turned out to be substrates of the horseradish peroxidase themselves. Hence, instead of Scopoletin, these substances are oxidized by hydrogen peroxide in a peroxidase catalyzed reaction, although no direct reaction between the examined substance and hydrogen peroxide occurs. Due to the modest substrate specificity of the horseradish peroxidase, this assay is not suitable for determining the antioxidant capacity in regard to hydrogen peroxide.

The next method that was tested, is based on a simple complexometric reaction, which is used in qualitative anorganic analysis of titanium(IV)-salts. Hydrogen peroxide and titanium(IV) form the orange-yellow coloured peroxotitanium cation in acidic solution, which can be determined spectrophotometrically. The absorption of this solution is directly proportional to the concentration of hydrogen peroxide. When this reaction was carried out in the presence of potential antioxidants, the solution turned deep red with some of the tested substances. The reason for this staining is a reduction of titanium(IV) to red Titanium(III) by chemical compounds with reductive potential. Since many antioxidants are reducing agents, this

method is not suitable for the determination of the antioxidant capacity in regard to hydrogen peroxide either.

In the third method, that was developed, hydrogen peroxide oxidizes methanol to formaldehyde in a reaction which is catalyzed by the enzyme catalase. This reaction is based on a special property of catalase to react as a peroxidase in the presence of suitable substrates. The generated formaldehyde reacts subsequently with added chromotropic acid and sulphuric acid to a red-purple product which can be quantified spectrophotometrically. Due to the unsatisfying statistic data and the poor practicability, this method was not tested in the presence of antioxidants.

The fourth method, which was developed to determine the antioxidant capacity in regard to hydrogen peroxide uses potassium permanganate to oxidize hydrogen peroxide to molecular oxygen in acidic solution. The amount of generated oxygen is proportional to the concentration of hydrogen peroxide and can be quantified by a Clark electrode. This method is suitable for classifying chemical compounds concerning their antioxidative capacity. Since the concentration of hydrogen peroxide can not be measured continuously, it is difficult to specify the half-life in which hydrogen peroxide is decomposed.

The fifth method utilizes a hydrogen peroxide electrode for directly following the hydrogen peroxide concentration during incubation with an antioxidant. There is no need for any additional reagent. In comparison to the other presented methods, the hydrogen peroxide electrode is the most suitable technique to analyze the antioxidant capacity in regard to hydrogen peroxide. This method allows determining the half-life in which hydrogen peroxide gets decomposed.

The latter two methods were used to examine the following chemical compounds: N-acetylcysteine, ascorbic acid, gallic acid, propyl gallate, glutathione, uric acid, melatonin, naringenin, quercetin, retinol, trolox, EUK-8 and EUK-134. None of the mentioned compounds, except the two manganese-salen complexes EUK-8 and EUK-134, showed an antioxidant capacity in regard to hydrogen peroxide. In literature EUK-8 and EUK-134 are described as catalase mimetics.

11 Experimenteller Teil

Zu Kapitel 3: HRP-Test

Lösungen:

- Wasserstoffperoxid-Lösung (0,1 mM):
100 µL Wasserstoffperoxid-Stammlösung mit einer Konzentration von 31,0 % werden in 100,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst. 981,0 µL dieser Lösung werden zu 100,0 mL mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.
- Lösungen der untersuchten Substanzen:
Alle untersuchten Substanzen werden in einer Konzentration von 1/30 mmol pro Liter eingesetzt. Als Lösungsmittel werden abhängig von der Löslichkeit der Verbindungen bidestilliertes Wasser oder Acetonitril verwendet. Für die photometrischen Untersuchungen in den Kapiteln 3.6.3 und 3.7 werden die Substanzen in dem hier aufgeführten Phosphat-Puffer gelöst.
- HRP-Lösung (18,1 U/mL):
1 000 µg HRP werden in 10,0 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Scopoletin-Lösung (12,5 µM):
600 µg Scopoletin werden in 250,0 mL bidestilliertem Wasser suspendiert und durch Rühren bei etwa 50°C in Lösung gebracht.
- Borat-Puffer (0,15 M, pH 10):
9,275 g Borsäure werden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird mit gesättigter Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 10 eingestellt.

11 Experimenteller Teil

- Phosphat-Puffer (1/15 mM, pH 7,4):
Lösung A: 9,073 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst.
Lösung B: 11,87 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat werden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst.
197 mL Lösung A werden mit 803 mL Lösung B gemischt und mit Phosphorsäure oder verdünnter Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt.
- Katalase-Lösung:
5 mg Katalase mit einer Aktivität von 2297 U/mg werden in 10,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Quecksilberacetat-Lösung (0,961 mM):
7,65 mg Quecksilberacetat werden in 25,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Quecksilberacetat-Lösung (1,922 mM):
15,3 mg Quecksilberacetat werden in 25,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

Verwendete Geräte und Einstellungen:

- Spektrofluorimeter:
FP-750
Firma: Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Deutschland

Response	Sensitivity	Slit für Emission und Excitation	Excitationswellenlänge	Emissionswellenlänge
1 sec	Medium	5 nm	395 nm	470 nm

Einstellungen des Fluorimeters

Der Emissions-Shutter bleibt immer geöffnet, während der Excitations-Shutter nur zur Messung geöffnet wird.

- Spektralphotometer
Lambda 40
Firma: Perkin Elmer, USA

Experimente:

Die im Folgenden beschriebene Durchführung gilt für alle nachfolgenden fluorimetrischen Messungen (Kapitel 3.3.1 bis 3.6.2). Gegebenenfalls wurden weitere Reagenzien zugesetzt. Die genauen Volumina der verwendeten Reagenzien werden im Anschluss an die allgemeine Durchführungsbeschreibung für die einzelnen Versuche in Tabellenform aufgelistet. Alle numerischen Tabelleninhalte haben die Einheit μL . Mit „Borat“ bzw. „Phosph.“ sind in den Tabellen die jeweiligen Puffer gemeint.

Allgemeine Durchführung:

Alle Reaktionen wurden in Probenröhrchen mit einem Volumen von ca. 6 mL durchgeführt. Phosphat-Puffer, Wasser, Acetonitril, Scopoletin-Lösung und HRP-Lösung werden im Probenröhrchen vermischt. Im Anschluss werden gegebenenfalls weitere Reagenzien, so wie die Substanzen, die bezüglich der antioxidativen Kapazität untersucht werden sollen, zugesetzt. Nach ausreichender Durchmischung, wird die Reaktion durch Zugabe der Wasserstoffperoxid-Lösung gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten wird die Reaktion durch den Borat-Puffer gestoppt. Die Lösung wird in eine Fluorimetrie-Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt. Die Küvette wird im Küvettenschacht platziert und für 3 Minuten im Dunklen belassen, bevor die Messung durch das Öffnen des Emissions-Shutters gestartet wird.

Kapitel 3.3.1:**Festlegung des optimalen Puffers für die Oxidation des Scopoletins:**

Probe	Puffer	Scop.	H ₂ O	Acetonitril	HRP	H ₂ O ₂	Borat
1	1500 ¹	500	350	300	250	-	2500
2	1500 ²	500	350	300	250	-	2500
3	1500 ³	500	350	300	250	-	2500
4	1500 ⁴	500	350	300	250	-	2500
5	1500 ¹	500	600	300	-	-	2500
6	1500 ²	500	600	300	-	-	2500
7	1500 ³	500	600	300	-	-	2500
8	1500 ⁴	500	600	300	-	-	2500
9	1500 ¹	500	300	300	250	50	2500
10	1500 ²	500	300	300	250	50	2500
11	1500 ³	500	300	300	250	50	2500
12	1500 ⁴	500	300	300	250	50	2500

1 Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 2,5 - 50 mM

2 Acetat-Puffer pH 5,0 - 50 mM

3 Phosphat-Puffer pH 7,4 - 66,6 mM

4 Borat-Puffer pH 10,0 - 50 mM

Der Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	Puffer	pH
1	1500	500	350	300	250	2500 ¹	9-10
2	1500	500	600	300	-	2500 ¹	9-10
3	1500	500	350	300	250	2500 ²	7
4	1500	500	600	300	-	2500 ²	7

¹Borat-Puffer pH 10

²Phosphat-Puffer pH 7,4

Kapitel 3.3.2:

Einfluss von Ethanol auf das Messverfahren:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	EtOH [*]	EtOH ^{**}	HRP	CAT.	Borat
1	1500	500	500	300	-	250	-	2500
2	1500	500	500	-	300	250	-	2500
3	1500	500	750	-	300	-	-	2500
4	1500	500	0	-	#	250	#	2500

600 µL Ethanol** und 1000 µL Katalase-Lösung werden vorgemischt. Nach einer Reaktionszeit von 5 min. werden 800 µL dieser Mischung dem Reaktionsansatz zugesetzt. Folglich enthält der Reaktionsansatz 300 µL Ethanol** und 500 µL Katalase-Lösung.

* frisch destilliert

** vor 6 Monaten destilliert

Einfluss von Acetonitril auf das Messverfahren:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	Borat
1	1500	500	350	300	250	2500
2	1500	500	650	-	250	2500
3	1500	500	600	300	-	2500
4	1500	500	900	-	-	2500

Kapitel 3.4:

Nullabgleich:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	AO	H ₂ O ₂	Borat
O-Abg.	1500	-	850	300	250	-	-	2500

Hydrophile Verbindungen:

Vorversuche:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	AO	H ₂ O ₂	Borat
A	1500	500	350	300	250	-	-	2500
B	1500	500	600	300	-	-	-	2500
C	1500	500	300	300	250	-	50	2500
D	1500	500	50	300	250	300	-	2500
E	1500	500	300	300	-	300	-	2500

Messreihe:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	AO	H ₂ O ₂	Borat
1	1500	500	275	300	250	25	50	2500
2	1500	500	250	300	250	50	50	2500
3	1500	500	225	300	250	75	50	2500
4	1500	500	200	300	250	100	50	2500
5	1500	500	175	300	250	125	50	2500
6	1500	500	150	300	250	150	50	2500
7	1500	500	125	300	250	175	50	2500
8	1500	500	100	300	250	200	50	2500
9	1500	500	75	300	250	225	50	2500
10	1500	500	50	300	250	250	50	2500
11	1500	500	25	300	250	275	50	2500
12	1500	500	-	300	250	300	50	2500

Lipophile Verbindungen:

Vorversuche:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	AO	H ₂ O ₂	Borat
A	1500	500	350	300	250	-	-	2500
B	1500	500	600	300	-	-	-	2500
C	1500	500	300	300	250	-	50	2500
D	1500	500	350	-	250	300	-	2500
E	1500	500	600	-	-	300	-	2500

Messreihe:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	AO	H ₂ O ₂	Borat
1	1500	500	300	275	250	25	50	2500
2	1500	500	300	250	250	50	50	2500
3	1500	500	300	225	250	75	50	2500
4	1500	500	300	200	250	100	50	2500
5	1500	500	300	175	250	125	50	2500
6	1500	500	300	150	250	150	50	2500
7	1500	500	300	125	250	175	50	2500
8	1500	500	300	100	250	200	50	2500
9	1500	500	300	75	250	225	50	2500
10	1500	500	300	50	250	250	50	2500
11	1500	500	300	25	250	275	50	2500
12	1500	500	300	-	250	300	50	2500

Für Ascorbinsäure werden zusätzlich folgende Messungen durchgeführt:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	Vit C	CAT.	H ₂ O ₂	Borat
1	1500	500	800	300	250	-	-	-	2500
2	1500	500	1050	300	-	-	-	-	2500
3	1500	500	750	300	250	-	-	50	2500
4	1500	500	500	300	250	300	-	-	2500
5	1500	500	750	300	-	300	-	-	2500
6	1500	500	0	300	250	*	*	-	2500

* 600 µL Ascorbinsäure-Lösung und 1000 µL Katalase-Lösung werden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vorgemischt. Nach 5 min Reaktionszeit werden dem Reaktionsansatz 800 µL dieser Lösung zugesetzt.

Kapitel 3.4.1:

Das Kapillarblut wird nach Desinfektion der Einstichstelle mit 70 %iger 2-Propanol-Lösung, mit einer Einmalstechhilfe aus der Fingerkuppe entnommen. 100 µL Blut werden mit 700 µL isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die so gewonnene Lösung wird sofort 3 Minuten mit 1400 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Der klare Plasmaüberstand wird direkt für die Reaktionen verwendet.

Vorversuche:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	NaCl	ACN	HRP	Plasmalsg.	H ₂ O ₂	Borat
A	1500	500	150	200	300	250	-	-	2500
B	1500	500	400	200	300	-	-	-	2500
C	1500	500	100	200	300	250	-	50	2500
D	1500	500	150	-	300	250	200	-	2500
E	1500	500	400	-	300	-	200	-	2500

11 Experimenteller Teil

Messreihe:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	NaCl	ACN	HRP	Plasmalsg.	H ₂ O ₂	Borat
1	1500	500	100	175	300	250	25	50	2500
2	1500	500	100	150	300	250	50	50	2500
3	1500	500	100	125	300	250	75	50	2500
4	1500	500	100	100	300	250	100	50	2500
5	1500	500	100	75	300	250	125	50	2500
6	1500	500	100	50	300	250	150	50	2500
7	1500	500	100	-	300	250	200	50	2500

Kapitel 3.5.1:

Konzentrationsniveau	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	H ₂ O ₂	Borat
185,2 nmol/L	1500	500	340	300	250	10	2500
370,4 nmol/L	1500	500	330	300	250	20	2500
555,6 nmol/L	1500	500	320	300	250	30	2500
740,7 nmol/L	1500	500	310	300	250	40	2500
925,9 nmol/L	1500	500	300	300	250	50	2500

Dintest[®]-Ergebnisse der linearen Regression:

Steigung a:	-0,364
Ordinatenabschnitt b:	587,293
Korrelationskoeffizient r:	0,9990
X-Mittelwert:	555,555
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%):	Nein
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%):	Nein
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%):	Nein
Reststandardabweichung s_y :	5,599
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	-15,378
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} :	2,768

Ergebnisse des F-Test nach Mandel:

Varianzdifferenz DS2:	91,529
Prüfwert PW:	72,706
F(P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 2$):	98,5

Kapitel 3.5.2:

Methodenpräzision:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	H ₂ O ₂	Borat
1-6	1500	500	300	300	250	50	2500

Messpräzision:

Ohne Wasserstoffperoxid

Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	H ₂ O ₂	Borat
6000	2000	1400	1200	1000	-	10000

Mit Wasserstoffperoxid

Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	H ₂ O ₂	Borat
6000	2000	1200	1200	1000	200	10000

Stabilität der Lösungen:

Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	H ₂ O ₂	Borat
1500	500	300	300	250	50	2500

Kapitel 3.6.1:

Auswirkungen von Quecksilberacetat auf das Messsystem:

Diese Vorversuche wurden sowohl mit der 0,961 mM, als auch mit der 1,922 mM Quecksilberacetat-Lösung durchgeführt.

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	vorg. Lösung	Borat
1	1500	500	400	100	250	-	2500
2	1500	500	-	-	250	500 ¹	2500
3	1500	500	-	-	250	500 ²	2500
4	1500	500	-	-	250	500 ³	2500

Vorgemischte Lösung:

vorg. Lösung	Wasser	ACN	H ₂ O ₂	HgAc ₂
1	700	200	100	-
2	300	200	-	500
3	200	200	100	500

Messungen, die mit den Verbindungen Gallussäure, Gallussäurepropylester, Glutathion, Harnsäure und Quercetin durchgeführt wurden:

Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	vorg. Lösung	Borat
1500	500	-	-	250	500	2500

Die Zusammensetzung der vorgemischten Lösungen variierte in Abhängigkeit vom eingesetzten Antioxidans und ist den folgenden Tabellen zu entnehmen. Für diese Messreihe wird die 0,961 mM Quecksilberacetat-Lösung verwendet.

Gallussäure (in Wasser):

	H ₂ O	ACN	AO	H ₂ O ₂	HgAc ₂
ohne Hg	575	200	125	100	-
Mit Hg	75	200	125	100	500

Gallussäurepropylester (in Wasser):

	H ₂ O	ACN	AO	H ₂ O ₂	HgAc ₂
ohne Hg	600	200	100	100	-
mit Hg	100	200	100	100	500

Glutathion (in Wasser):

	H ₂ O	ACN	AO	H ₂ O ₂	HgAc ₂
ohne Hg	500	200	200	100	-
mit Hg	-	200	200	100	500

Harnsäure (in Wasser):

	H ₂ O	ACN	AO	H ₂ O ₂	HgAc ₂
ohne Hg	550	200	150	100	-
mit Hg	50	200	150	100	500

Trolox (in Acetonitril):

	H ₂ O	ACN	AO	H ₂ O ₂	HgAc ₂
ohne Hg	700	-	200	100	-
mit Hg	200	-	200	100	500

11 Experimenteller Teil

Quercetin (in Acetonitril):

	H ₂ O	ACN	AO	H ₂ O ₂	HgAc ₂
ohne Hg	700	150	50	100	-
mit Hg	200	150	50	100	500

Im Anschluss an diese Messreihe wurden die Messungen mit den Verbindungen Gallussäure und Gallussäurepropylester unter Verwendung der 1,922 mM Quecksilberacetat-Lösung wiederholt.

Quecksilberacetat-Konzentrationsreihe:

Probe	Phosph.	Scop.	H ₂ O	ACN	HRP	vorg. Lösung	Borat
1	1500	500	400	100	250	-	2500
2	1500	500	-	-	250	500 ¹⁻⁹	2500

vorg. Lösung	Wasser	ACN	Trolox	H ₂ O ₂	HgAc ₂ *
1	700	200	-	100	-
2	700	-	200	100	-
3	658,4	-	200	100	41,6
4	616,8	-	200	100	83,2
5	575,2	-	200	100	124,8
6	533,6	-	200	100	166,4
7	492,0	-	200	100	208,0
8	408,8	-	200	100	291,2
9	200,0	-	200	100	500,0

* 0,961 mM Quecksilberacetat-Lösung

Kapitel 3.6.2:

Das Kapillarblut wird nach Desinfektion der Einstichstelle mit 70 %iger 2-Propanol-Lösung, mit einer Einmalstechhilfe aus der Fingerkuppe entnommen. 100 µL Blut werden mit 300 µL isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die so gewonnene Lösung wird sofort 3 Minuten mit 1400 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Der klare Plasmaüberstand wird direkt für die Reaktionen verwendet.

11 Experimenteller Teil

Phosph.	Scop.	H ₂ O	NaCl	ACN	HRP	Plasmalsg.	vorg. Lsg.	Borat
1500	500	350	50	100	250	-	-	2500
1500	500	350	-	100	250	50	-	2500
1500	500	-	-	100	250	-	400 ¹⁻⁶	2500

vorg. Lösung	Wasser	Plasmalsg.	NaCl	H ₂ O ₂	HgAc ₂ *
1	200	100	-	-	500
2	200	-	100	-	500
3	600	-	100	100	-
4	100	-	100	100	500
5	600	100	-	100	-
6	100	100	-	100	500

* 0,961 mM Quecksilberacetat-Lösung

Kapitel 3.6.3:

Absorptionsspektrum Quecksilberacetat:

2,5 mL Phosphat-Puffer, 0,5 mL 0,961 mM Quecksilberacetatlösung und 0,25 mL Wasser werden gemischt und spektralphotometrisch vermessen.

Untersuchte Verbindung ohne Quecksilberacetat-Zusatz:

2,5 mL 1/30 mM Lösung der untersuchten Substanz in Phosphatpuffer werden mit 0,75 mL Wasser gemischt und spektralphotometrisch vermessen.

Untersuchte Verbindung mit Quecksilberacetat-Zusatz:

2,5 mL 1/30 mM Lösung der untersuchten Substanz in Phosphatpuffer werden mit 0,5 mL 0,961 mM Quecksilberacetatlösung und 0,25 mL Wasser gemischt und spektralphotometrisch vermessen.

Kapitel 3.7:

Absorptionsspektrum Puffer und Wasserstoffperoxid:

2,0 mL Phosphatpuffer werden mit 0,5 mL 0,1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung und 0,25 mL bidestilliertem Wasser gemischt und spektralphotometrisch vermessen.

Absorptionsspektrum Puffer, Wasserstoffperoxid und HRP:

2,0 mL Phosphatpuffer werden mit 0,5 mL 0,1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung und 0,25 mL HRP-Lösung gemischt und spektralphotometrisch vermessen.

Absorptionsspektrum der untersuchten Substanz:

2,0 mL 1/30 mM Lösung der untersuchten Substanz in Phosphatpuffer werden mit 0,75 mL bidestilliertem Wasser gemischt und spektralphotometrisch vermessen. Die Küvette verbleibt im Küvettenschacht und wird nach 15 und 30 Minuten noch einmal vermessen.

Absorptionsspektrum der untersuchten Substanz mit Wasserstoffperoxid:

2,0 mL 1/30 mM Lösung der untersuchten Substanz in Phosphatpuffer werden mit 0,5 mL 0,1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung und 0,25 mL bidestilliertem Wasser gemischt und nach 5, 10, 20 und 30 Minuten spektralphotometrisch vermessen.

Spektrum der untersuchten Substanz mit Wasserstoffperoxid und HRP:

2,0 mL 1/30 mM Lösung der untersuchten Substanz in Phosphatpuffer werden mit 0,5 mL 0,1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung und 0,25 mL HRP-Lösung gemischt und nach 5, 10, 20 und 30 Minuten spektralphotometrisch vermessen.

Zu Kapitel 4: Titan-Test

Lösungen:

- Wasserstoffperoxid-Lösung 20 mM:
98,05 μL Wasserstoffperoxid-Stammlösung mit einer Konzentration von 31,0 % werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Titan-Lösung:
In Schwefelsäure: 3,5 g Kaliumtitanoxidoxalat-Dihydrat werden in 25,0 mL 1 M Schwefelsäure suspendiert und unter Sieden gelöst.
In Salzsäure: 3,5 g Kaliumtitanoxidoxalat-Dihydrat werden in 25,0 mL 1 M Salzsäure suspendiert und unter Sieden gelöst.
- Lösungen der untersuchten Substanzen:
Alle untersuchten Substanzen werden in einer Konzentration von 30 mmol pro Liter eingesetzt. Lipophile Verbindungen werden in Acetonitril gelöst, hydrophile in Wasser.

Verwendete Geräte:

- Spektralphotometer
UV Visible recording spectrophotometer UV-160
Firma: Shimadzu Deutschland GmbH
- Zentrifuge:
Concentrator 5301
Firma: Eppendorf AG, Deutschland

Experimente:**Kapitel 4.3.1:**

In einem 2 mL Eppendorf Kunststoffgefäß werden 250 μL Wasser, 200 μL Acetonitril, 150 μL Wasserstoffperoxid-Lösung und 500 μL Titanreagenz gemischt und anschließend mit 300 μL konzentrierter Ammoniak-Lösung alkalisiert. Als Lösungsmittel für das Titanreagenz wird Schwefelsäure verwendet. Das Präzipitat wird zentrifugiert, bis der klare Überstand mit einer Pipette abgenommen werden kann. Der Überstand wird verworfen. Das feuchte Präzipitat wird in 1,0 mL Acetonitril suspendiert. Anschließend wird zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Dann wird in 1,0 mL Wasser suspendiert und nach dem Zentrifugieren abpipettiert. Der Rückstand wird mit einer evakuierbaren Zentrifuge bei Raumtemperatur zur Trockene eingeengt. Das vollständig trockene Präzipitat wird in 1,8 mL 50%iger (V/V) Schwefelsäure suspendiert und mit Hilfe von Ultraschall bei moderater Wärmeeinwirkung in Lösung gebracht. Die Lösung wird mit Hilfe eines Zweistrahl-Photometers vermessen. Im 2. Strahlengang befindet sich eine Küvette die 50%ige Schwefelsäure enthält. Der Nullabgleich wurde zuvor ebenfalls mit 50%iger Schwefelsäure durchgeführt.

Kapitel 4.3.2:

Dieser Versuch wird entsprechend der Durchführungsbeschreibung in Kapitel 4.3.1 durchgeführt, wobei lediglich die eingesetzten Volumina von Wasserstoffperoxid und Wasser bei den 8 Konzentrationsniveaus verändert werden. Die Volumina für Wasserstoffperoxid und Wasser können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Die Lösung wird spektralphotometrisch bei 419 nm vermessen.

Konzentrationsniveau	Wasser	Wasserstoffperoxid
0,455 mmol/L	375 μL	25 μL
0,909 mmol/L	350 μL	50 μL
1,364 mmol/L	325 μL	75 μL
1,818 mmol/L	300 μL	100 μL
2,273 mmol/L	275 μL	125 μL
2,727 mmol/L	250 μL	150 μL
3,182 mmol/L	225 μL	175 μL
3,636 mmol/L	200 μL	200 μL

Dintest[®]-Ergebnisse der linearen Regression:

Steigung a:	0,168
Ordinatenabschnitt b:	-0,012
Korrelationskoeffizient r:	0,9992
X-Mittelwert:	2,045
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%):	ja
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%):	nein
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%):	nein
Reststandardabweichung s_y :	0,008
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,048
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} :	2,347

Ergebnisse des F-Test nach Mandel:

Varianzdifferenz DS2:	$-2,1 \times 10^{-5}$
Prüfwert PW:	-0,259
F(P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 5$):	16,26

Kapitel 4.3.3:

Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Trolox:

200 μL Trolox-Lösung in Acetonitril werden mit 150 μL Wasserstoffperoxid-Lösung und 350 μL Wasser über 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden 500 μL Titan-Reagenz zugesetzt.

Die Messung sollte zunächst fortgesetzt werden, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Aufgrund der unerwarteten intensiven Rotfärbung der Lösung nach der Zugabe des Titan-Reagenzes, wurde der Versuch abgebrochen. Das Titanreagenz für diesen Versuch wurde einmal mit Salzsäure und einmal mit Schwefelsäure hergestellt.

Überprüfung der übrigen Verbindungen hinsichtlich dieser Interaktion:

200 μL der Lösungen der untersuchten Substanzen werden mit Wasser und Acetonitril versetzt, wobei die Lösungsmittel-Volumina in Abhängigkeit vom verwendetet Lösungsmittel der untersuchten Substanz angepasst werden (siehe nachstehende Tabelle). Nach dem Zusatz von 500 μL Titanreagenz wird die Färbung der Lösung beobachtet. Als Lösungsmittel für das Titan-Reagenz wird Salzsäure verwendet.

	Wasser	Acetonitril
hydrophile Substanzen	150	200
lipophile Substanzen	350	0

Zu Kapitel 5: Chromotropsäure-Test

Lösungen:

- Wasserstoffperoxid-Lösung 20 mM:
98,05 μL Wasserstoffperoxid-Stammlösung mit einer Konzentration von 31,0 % werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Katalase-Lösung:
1,0 mg Katalase mit einer Aktivität von 2297 U/mg wird in 10,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Chromotropsäure-Lösung:
0,15 g Chromotropsäure-Dihydrat werden in 10,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst

Verwendete Geräte

- Spektralphotometer
UV Visible recording spectrophotometer UV-160
Firma: Shimadzu Deutschland GmbH

Experimente:**Kapitel 5.2.1:**

250 μL Katalase-Lösung, 50 μL Methanol und 350 μL Wasser werden in einem Probenröhrchen gemischt und mit 150 μL Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Nach 5 Minuten Reaktionszeit werden 250 μL Chromotropsäure-Lösung und 2 500 μL konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben. Nach dem Abkühlen, wird ein Teil der Lösung in eine Quarzküvette überführt und spektralphotometrisch vermessen.

Kapitel 5.2.2:

Dieser Versuch wird entsprechend der Durchführungsbeschreibung in Kapitel 5.2.1 durchgeführt, wobei lediglich die eingesetzten Volumina von Wasserstoffperoxid und Wasser bei den 5 Konzentrationsniveaus verändert werden. Die Volumina für Wasserstoffperoxid und Wasser können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Die Lösung wird bei 575 nm spektralphotometrisch vermessen

Konzentrationsniveau	Wasser	Wasserstoffperoxid
1,25 mmol/L	450 μL	50 μL
2,5 mmol/L	400 μL	100 μL
3,75 mmol/L	350 μL	150 μL
5,0 mmol/L	300 μL	200 μL
6,25 mmol/L	250 μL	250 μL

Dintest[®]-Ergebnisse der linearen Regression:

Steigung a:	0,120
Ordinatenabschnitt b:	0,131
Korrelationskoeffizient r:	0,9817
X-Mittelwert:	3,75
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%):	Ja
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%):	Nein
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%):	Nein
Reststandardabweichung s_y :	0,053
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0,443
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} :	11,813

Ergebnisse des F-Test nach Mandel:

Varianzdifferenz DS2:	$7,4 \times 10^{-4}$
Prüfwert PW:	0,192
F(P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 2$):	98,5

Zu Kapitel 6: Clark-Elektrode

Lösungen:

- Wasserstoffperoxid-Lösung 1 mM:
500 μ L Wasserstoffperoxid-Stammlösung mit einer Konzentration von 31,5 % werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst. 964,0 μ L dieser Lösung werden in 100,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Kaliumpermanganat-Lösung 10 mM:
79,0 mg Kaliumpermanganat werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Kaliumpermanganat-Lösung 20 mM:
158,0 mg Kaliumpermanganat werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Lösungen der untersuchten Substanzen:
Alle untersuchten Substanzen werden in einer Konzentration von 1 mmol pro Liter eingesetzt. Als Lösungsmittel werden abhängig von der Löslichkeit der Verbindungen bidestilliertes Wasser oder Acetonitril verwendet. Bei den Verbindungen EUK-8 und EUK-134 wird aufgrund der relativ schlechten Wasserlöslichkeit das doppelte Volumen einer 0,5 mM Lösung eingesetzt. Um das überschüssige Volumen auszugleichen wird dem Versuchsansatz entsprechend weniger Wasser als Lösungsmittel zugesetzt.

- Katalase-Lösung:

12,0 mg Katalase mit einer Aktivität von 2297 U/mg werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Bei einer angenommenen Molekülmasse von etwa 240 000 g/mol ergibt sich eine Konzentration von etwa 1 μmol pro Liter.

Verwendete Geräte und Einstellungen:

- Sauerstoff-Sensor:

OxyScan Graphik mit Edelstahlsensor
Firma: UMS GmbH, Deutschland
eingestellter Messabstand: 5 bis 10 sec.

Experimente:

Allgemeine Versuchsbeschreibung:

Die in den nachfolgenden Abschnitten hergestellten Proben werden in ein Schnappdeckelglas pipettiert, welches mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt wird. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten werden 0,5 mL einer 0,5 N Salzsäurelösung zugesetzt. Das Gefäß wird mit einem Kunststoffdeckel verschlossen. Der Kunststoffdeckel wurde zuvor mit einer Bohrung versehen, durch die der Sauerstoffsensoren in das Probengefäß eingeführt werden kann. Die Elektrode wird so in der Probe platziert, dass sie etwa einen halben Zentimeter eintaucht. Danach wird sowohl die Probe als auch die Kaliumpermanganat-Lösung für 5 Minuten mit Stickstoff begast. Im Anschluss wird die Messung der Sauerstoff-Konzentration gestartet. 15 Sekunden nach dem Start der Messung werden 0,5 mL der zuvor mit Stickstoff begasten 10 mM Kaliumpermanganat-Lösung mit einer Spritze in die Probe injiziert. Nach 3-4 Minuten wird die Messung gestoppt.

Kapitel 6.3.1:

Die Probe, bestehend aus 2,25 mL Wasser und 0,75 mL Wasserstoffperoxid, wird entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen. Auf die Inkubationszeit wird verzichtet.

Kapitel 6.3.2:

Die Proben in der nachfolgenden Tabelle werden entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen. Auf die Inkubationszeit wird verzichtet.

Konzentrationsniveau	Wasser	Wasserstoffperoxid
62,5 µmol/L	2,75 mL	0,25 mL
125,0 µmol/L	2,5 mL	0,5 mL
187,5 µmol/L	2,25 mL	0,75 mL
250,0 µmol/L	2,0 mL	1 mL
312,5 µmol/L	1,75 mL	1,25 mL
375,0 µmol/L	1,5 mL	1,5 mL

Dintest[®]-Ergebnisse der linearen Regression:

Steigung a:	0,028
Ordinatenabschnitt b:	0,307
Korrelationskoeffizient r:	0,9991
X-Mittelwert:	218,75
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%):	Ja
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%):	Nein
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%):	Nein
Reststandardabweichung s_y :	0,153
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	5,555
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} :	2,539

Ergebnisse des F-Test nach Mandel:

Varianzdifferenz DS^2 :	$2,61 \times 10^{-2}$
Prüfwert PW:	1,162
$F(P = 99 \%, f_1 = 1, f_2 = 3)$:	34,12

Kapitel 6.3.3:

Die Proben in der nachfolgenden Tabelle werden entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen.

Probe	Wasser	Wasserstoffperoxid	Acetonitril
ohne Acetonitril	2,25 mL	0,75 mL	0 mL
mit Acetonitril	1,5 mL	0,75 mL	0,75 mL

Kapitel 6.3.5:

Die in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten Messungen I-III werden für die untersuchten Substanzen entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung durchgeführt:

Messung I:

Probe	Wasser	Wasserstoffperoxid	untersuchte Substanz
N-Acetylcystein	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ¹
Ascorbinsäure	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ¹
Gallussäure	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ¹
Gallussäurepropylester	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ¹
Glutathion	1,5 mL	0,75 mL	0,75 mL ¹
Harnsäure	1,5 mL	0,75 mL	0,75 mL ¹
Melatonin	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ²
Naringenin [#]	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ²
Quercetin [#]	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ²
Retinol	1,5 mL	0,75 mL	0,75 mL ²
Trolox	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL ²
EUK-8	1,5 mL	0,5 mL	1,0 mL ^{1*}
EUK-134	1,5 mL	0,5 mL	1,0 mL ^{1*}
Katalase	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL

1 in bidestilliertem Wasser gelöst

2 in Acetonitril gelöst

* 0,5 mM Lösung

Kaliumpermanganat-Lösung 20 mM wurde verwendet

11 Experimenteller Teil

Messung II:

Probe	Wasser	untersuchte Substanz
N-Acetylcystein	2,5 mL	0,5 mL ¹
Ascorbinsäure	2,5 mL	0,5 mL ¹
Gallussäure	2,5 mL	0,5 mL ¹
Gallussäurepropylester	2,5 mL	0,5 mL ¹
Glutathion	2,25 mL	0,75 mL ¹
Harnsäure	2,25 mL	0,75 mL ¹
Melatonin	2,5 mL	0,5 mL ²
Naringenin [#]	2,5 mL	0,5 mL ²
Quercetin [#]	2,5 mL	0,5 mL ²
Retinol	2,25 mL	0,75 mL ²
Trolox	2,5 mL	0,5 mL ²
EUK-8	2,0 mL	1,0 mL ^{1*}
EUK-134	2,0 mL	1,0 mL ^{1*}
Katalase	2,5 mL	0,5 mL

1 in bidestilliertem Wasser gelöst

2 in Acetonitril gelöst

* 0,5 mM Lösung

Kaliumpermanganat-Lösung 20 mM wurde verwendet

Messung III:

	Wasser	Wasserstoffperoxid	Acetonitril
N-Acetylcystein	2,5 mL	0,5 mL	0 mL
Ascorbinsäure	2,5 mL	0,5 mL	0 mL
Gallussäure	2,5 mL	0,5 mL	0 mL
Gallussäurepropylester	2,5 mL	0,5 mL	0 mL
Glutathion	2,25 mL	0,75 mL	0 mL
Harnsäure	2,25 mL	0,75 mL	0 mL
Melatonin	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL
Naringenin [#]	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL
Quercetin [#]	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL
Retinol	1,5 mL	0,75 mL	0,75 mL
Trolox	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL
EUK-8	2,5 mL	0,5 mL	0 mL
EUK-134	2,5 mL	0,5 mL	0 mL
Katalase	2,5 mL	0,5 mL	0 mL

Kaliumpermanganat-Lösung 20 mM wurde verwendet

Kapitel 6.3.6:

Eine Ascorbinsäure-Lösung wird entsprechend der Messung II, die in Kapitel 6.3.5 beschrieben wird, direkt nach Herstellung der Lösung, so wie 300 Minuten später vermessen. Dabei wird auf die Inkubationszeit verzichtet.

Kapitel 6.3.7:

Die Proben in der nachfolgenden Tabelle werden entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen. Zusätzlich werden für jede der drei Antioxidantien Katalase, EUK-8 und EUK-134 die Messungen II und III, die in Kapitel 6.3.5 beschrieben werden, mitbestimmt.

Probe	Art des Antioxidans	Wasser	Wasserstoffperoxid	Antioxidans
1	Katalase	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL
	EUK-8 & EUK-134*	1,5 mL	0,5 mL	1,0 mL
2	Katalase	2,1 mL	0,5 mL	0,4 mL
	EUK-8 & EUK-134*	1,7 mL	0,5 mL	0,8 mL
3	Katalase	2,2 mL	0,5 mL	0,3 mL
	EUK-8 & EUK-134*	1,9 mL	0,5 mL	0,6 mL
4	Katalase	2,3 mL	0,5 mL	0,2 mL
	EUK-8 & EUK-134*	2,1 mL	0,5 mL	0,4 mL
5	Katalase	2,4 mL	0,5 mL	0,1 mL
	EUK-8 & EUK-134*	2,3 mL	0,5 mL	0,2 mL

* EUK-8 & EUK-134 Konzentration: 0,5 mmol pro Liter

Kapitel 6.3.8:

Für die Antioxidantien Katalase, EUK-8 und EUK-134 wird die Messung I durchgeführt, wie in Kapitel 6.3.5 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Inkubationszeit verändert wird. Anstelle der in der allgemeinen Versuchsbeschreibung vorgeschriebenen 25 Minuten wird bei den Antioxidantien Katalase und EUK-8 nach 0, 5 und 10 Minuten die Salzsäure zugesetzt, während bei EUK-134 eine Inkubationszeit von 0, 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten eingehalten wird. Zusätzlich wird für jede der drei Antioxidantien Katalase, EUK-8 und EUK-134 die Messung III, die in

Kapitel 6.3.5 beschrieben wird, mitbestimmt. Dabei wird auf die Inkubationszeit verzichtet

Kapitel 6.3.9:

Einfluss von isotoner Kochsalzlösung und Octanol auf das Messergebnis:

Eine Probe bestehend aus 2,0 mL Wasser, 0,5 mL Wasserstoffperoxid und 0,5 mL isotoner Kochsalzlösung, sowie eine Probe mit 2,5 mL Wasser, 0,5 mL Wasserstoffperoxid und 0,1 mL Octanol werden entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen. Als Vergleich wird eine Probe vermessen, die der Messung III entspricht, die in Kapitel 6.3.5 beschrieben wird.

Antioxidative Kapazität von Blutplasma:

Es werden 20 µL Kapillarblut entnommen und mit 980 µL isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Nach dem Zentrifugieren wird der klare Überstand der Blutplasma-Lösung für die Messungen verwendet. Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Messungen I-III werden für die Blutplasma-Lösung entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung durchgeführt:

Messung	Wasser	H ₂ O ₂	Plasmalösung	0,9 % NaCl-Lsg.	Octanol
I	2,0 mL	0,5 mL	0,5 mL	0 mL	0,1 mL
II	2,5 mL	0 mL	0,5 mL	0 mL	0,1 mL
III	2,0 mL	0,5 mL	0 mL	0,5 mL	0,1 mL

Kapitel 6.4.1:

Die Proben in der nachfolgenden Tabelle werden entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen. Auf die Inkubationszeit wird verzichtet.

Konzentrationsniveau	Wasser	Wasserstoffperoxid
31,25 mol/L	2,875 mL	125 μ L
62,5 mol/L	2,75 mL	250 μ L
93,75 mol/L	2,625 mL	375 μ L
125,0 mol/L	2,5 mL	500 μ L
156,25 mol/L	2,375 mL	625 μ L
187,5 mol/L	2,25 mL	750 μ L

Dintest[®]-Ergebnisse der linearen Regression:

Steigung a:	0,023
Ordinatenabschnitt b:	0,511
Korrelationskoeffizient r:	0,9976
X-Mittelwert:	109,375
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%):	Ja
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%):	Nein
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%):	Nein
Reststandardabweichung s_y :	0,103
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	4,519
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} :	4,132

Ergebnisse des F-Test nach Mandel:

Varianzdifferenz DS2:	$13,6 \times 10^{-3}$
Prüfwert PW:	1,419
F(P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 3$):	34,12

Kapitel 6.4.2:

Es werden für die beiden Konzentrationsniveaus in der nachstehenden Tabelle je 6 Proben hergestellt. Für jede einzelne Probe wird eine Wasserstoffperoxid-Lösung frisch hergestellt. Die Proben werden entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vermessen.

Konzentration	Wasser	Wasserstoffperoxid
125	2,5 mL	0,5 mL
187,5	2,25 mL	0,75 mL

Zu Kapitel 7: Wasserstoffperoxid-Elektrode

Lösungen:

- Wasserstoffperoxid-Lösung 1 mM:
500 μL Wasserstoffperoxid-Stammlösung mit einer Konzentration von 31,5 % werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst. 964,0 μL dieser Lösung werden in 100,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst.
- Lösungen der untersuchten Substanzen:
Die Substanzen werden in bidestilliertem Wasser mit einer Konzentration von 1 mmol pro Liter gelöst. Bei den Verbindungen mit geringer Wasserlöslichkeit, wie zum Beispiel Trolox, Harnsäure, EUK-8 und EUK-134 wird stattdessen das doppelte Volumen einer 0,5 mM Lösung eingesetzt. Um das überschüssige Volumen auszugleichen, wird dem Versuchsansatz entsprechend weniger Wasser als Lösungsmittel zugesetzt.
- Katalase-Lösung:
12,0 mg Katalase mit einer Aktivität von 2297 U/mg werden in 50,0 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Bei einer angenommenen Molekülmasse von etwa 240 000 g/mol ergibt sich eine Konzentration von etwa 1 μmol pro Liter.

Verwendete Geräte und Einstellungen:

- Wasserstoffperoxid Sensor:

ISO-HPO-2

Firma: World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA

- Messgerät:

Apollo 1000

Firma: World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA

Einstellungen am Messgerät:

Current	Filter	Range	Notch-Filter
400 mV	0,4 Hz	10 nA	Off

- Datenübertragung: Messgerät – Computer

Lab-Trax-4/16

Firma: World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA

- Software:

Data-TraxTM

Firma: World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA

Experimente:

Kapitel 7.3.1:

2,0 mL bidestilliertes Wasser werden 2 min nach dem Starten der Messung mit 1,0 mL der Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt. Die Messung wird über einen Zeitraum von 30 min aufgezeichnet.

Kapitel 7.3.2:

Die Messungen werden durchgeführt, wie in Kapitel 7.2 beschrieben. Für die Messungen I – III werden die folgenden Zusammensetzungen gewählt.

Messung I: 1,0 mL der Lösung der untersuchten Substanz, 1,0 mL Wasserstoffperoxid-Lösung und 1,0 mL bidestilliertes Wasser werden gemischt.

Messung II: 1,0 mL der Lösung der untersuchten Substanz werden mit 2,0 mL bidestilliertem Wasser gemischt.

Messung III: 1,0 mL Wasserstoffperoxid-Lösung werden mit 2,0 mL bidestilliertem Wasser gemischt.

Kapitel 7.3.3:

Die Lösungen von Ascorbinsäure, Gallussäure und Gallussäurepropylester werden über 6 Stunden stehen gelassen und dann wie folgt vermessen: 2,0 mL bidestilliertes Wasser werden vorgelegt. 2 min nach Beginn der Aufzeichnung des Sensorsignals wird 1,0 mL der jeweiligen Lösung zugesetzt.

Kapitel 7.3.4:

Die Elektrode wird in 2,0 mL bidestilliertes Wasser eingetaucht und die Messung gestartet. Anschließend wird 1,0 mL einer unmittelbar zuvor hergestellten Ascorbinsäure-Lösung zugesetzt. Die Messwerte werden über 11 Stunden aufgezeichnet.

Kapitel 7.3.5:

Die Lösungen von EUK-8, EUK-134 und Katalase werden entsprechend der nachstehenden Messungen I-III vermessen.

Messung I: 1,0 mL bidestilliertes Wasser wird mit 1,0 mL einer der drei genannten Lösungen versetzt. Die Messung wird gestartet. 2 min nach Beginn der Aufzeichnung wird 1,0 mL Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben.

11 Experimenteller Teil

Messung II: 1,0 mL einer der drei Lösungen und 2,0 mL bidestilliertes Wasser werden gemischt und direkt im Anschluss über einen Zeitraum von 30 min vermessen.

Messung III: 2,0 mL Wasser werden vorgelegt und die Messung wird gestartet. 2 min nach Beginn der Aufzeichnung wird 1,0 mL Wasserstoffperoxid-Lösung zugesetzt.

Kapitel 7.4.1:

Es werden fünf Wasserstoffperoxid-Konzentrationsniveaus vermessen, wie in Kapitel 7.2 beschrieben. Die fünf Wasserstoffperoxid-Verdünnungen werden entsprechend der nachstehenden Tabelle hergestellt.

Konzentrationsniveau	Wasser	Wasserstoffperoxid
66,7 $\mu\text{mol/L}$	2,8 mL	0,2 mL
133,3 $\mu\text{mol/L}$	2,6 mL	0,4 mL
200,0 $\mu\text{mol/L}$	2,4 mL	0,6 mL
266,7 $\mu\text{mol/L}$	2,2 mL	0,8 mL
333,3 $\mu\text{mol/L}$	2,0 mL	1,0 mL

Dintest[®]-Ergebnisse der linearen Regression:

Steigung a:	0,005
Ordinatenabschnitt b:	-0,026
Korrelationskoeffizient r:	0,9998
X-Mittelwert:	200,0
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99%):	Nein
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 99%):	Nein
Max. Abweichung ist ein Ausreißer (F-Test, 99%):	Nein
Reststandardabweichung s_y :	0,012
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	2,227
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} :	1,114

Ergebnisse des F-Test nach Mandel:

Varianzdifferenz DS2:	4×10^{-5}
Prüfwert PW:	0,204
F(P = 99 %, $f_1 = 1$, $f_2 = 2$):	98,5

Kapitel 7.4.2:

Messpräzision: Eine Lösung, die 2,0 mL Wasser, sowie 1,0 mL Wasserstoffperoxid-Lösung enthält, wird 6mal hintereinander für 10 Minuten vermessen.

Methodenpräzision: Es werden 6 Proben hergestellt, die je 2,0 mL Wasser, so wie 1,0 mL Wasserstoffperoxid-Lösung enthalten. Jede dieser Lösungen wird nacheinander für 10 Minuten vermessen. Die Wasserstoffperoxid-Lösung wird für jede Probe zuvor frisch hergestellt.

12 Gefahrstoffverzeichnis

Stoffname	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Ammoniaklösung 25%	C,N	34-50	26-36/37/39-45-61
Borsäure	Xn	36/37/38-62-63	22-26-36/37/39-45
Chromotropsäure-Dihydrat	Xi	36/37/38	26-36
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	-	-	24/25
Ethanol 96%	F	11	7-16
Gallussäure	Xi	36/37/38	24/25
Gallussäurepropylester	Xn	22-43	24-37
Glutathion red.	-	-	24-25
Harnsäure	-	-	24-25
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	24-25
Kaliumhydroxid	C	22-35	26-36/37/39-45
Kaliumpermanganat	Xn, O, N	8-22-50/53	60-61
Methanol	T, F	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Naringenin	Xn	22	22-45
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
n-Octanol	Xi	36/38	23
Phosphorsäure 85%	C	34	26-36/37/39-45
Quecksilberacetat	T+, N	26/27/28-33-50/53	13-28.1-36-45-60-61
Quercetin	T	25	1-22-45
Retinol	Xn	22-36/38-63	26-36/37/39-45

12 Gefahrstoffverzeichnis

Salzsäure 37%	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure konz.	C	35	26-30-45
Scopoletin	Xi	36/37/38	26-37/39
Trolox	Xn	22	24/25-26-36/37/39
Wasserstoffperoxid 31-31,5%	Xn	22-41	26-39

13 Literaturverzeichnis

1. **Halliwell B** *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radical Res **31**, 261-272 (1999)
2. **Loft S und Poulsen H E** *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. J Mol Med **74**, 297-312 (1996)
3. **Halliwell B und Gutteridge J M C** *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc., New York (1999)
4. **Crapo J D und Tierney D F** *Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity*. Am J Physiol **226**, 1401-7 (1974)
5. **Halliwell B und Whiteman M** *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol **142**, 231-255 (2004)
6. **McCord J M** *The evolution of free radicals and oxidative stress*. Am J Med **108**, 652-659 (2000)
7. **Knight J A** *Review: free radicals, antioxidants, and the immune system*. Ann Clin Lab Sci **30**, 145-158 (2000)
8. **Babior B M, Kipnes R S und Curnutte J T** *Biological defense mechanisms. Production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent*. J Clin Invest **52**, 741-4 (1973)
9. **Kuppusamy P und Zweier J L** *Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation*. J Biol Chem **264**, 9880-4 (1989)
10. **Nordberg J und Arner E S J** *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radical Biol Med **31**, 1287-1312 (2001)
11. **Bielski B H J und Cabelli D E** *Highlights of current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solutions*. Int J Radiat Biol **59**, 291-319 (1991)
12. **Kono Y und Fridovich I** *Superoxide radical inhibits catalase*. J Biol Chem **257**, 5751-4 (1982)
13. **Blum J und Fridovich I** *Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical*. Arch Biochem Biophys **240**, 500-8 (1985)
14. **Palmer G C** *Free radicals generated by xanthine oxidase-hypoxanthine damage adenylate cyclase and ATPase in gerbil cerebral cortex*. Metab Brain Dis **2**, 243-57 (1987)
15. **Winterbourn C C, Vissers M C und Kettle A J** *Myeloperoxidase*. Curr Opin Hematol **7**, 53-8 (2000)
16. **Babior B M** *Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction*. Blood **64**, 959-66 (1984)
17. **Betteridge D J** *What is oxidative stress?* Metab, Clin Exp **49**, 3-8 (2000)

18. **Halliwell B** *Oxidants and human disease: some new concepts.* FASEB J **1**, 358-64 (1987)
19. **Biemond P, Swaak A J G, Van Eijk H G und Koster J F** *Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases.* Free Radical Biol Med **4**, 185-98 (1988)
20. **Gutteridge J M C** *Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from hemoglobin by peroxides.* FEBS Lett **201**, 291-5 (1986)
21. **Elstner E F** *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin.* Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, Mannheim (1990)
22. **Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich J P und Freeman B A** *Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares α -tocopherol during lipid peroxidation: greater oxidant protection from the pair nitric oxide/ α -tocopherol than α -tocopherol/ascorbate.* J Biol Chem **275**, 10812-10818 (2000)
23. **Beckman J S** *The physiological and pathological chemistry of nitric oxide.* In: Nitric Oxide - Principles and Actions (Lancaster J), Academic Press, Inc., San Diego (1996)
24. **Beckman J S und Koppenol W H** *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.* Am J Physiol **271**, 1424-37 (1996)
25. **Duchstein H J und Gurka H J** *Activated species of oxygen: a challenge to modern pharmaceutical chemistry.* Arch Pharm (Weinheim, Ger) **325**, 129-46 (1992)
26. **Acworth I N** *The Handbook of Redox Biochemistry.* ESA, Inc., Chelmsford (2003)
27. **Devasagayam T P A, Steenken S, Obendorf M S W, Schulz W A und Sies H** *Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen.* Biochemistry **30**, 6283-9 (1991)
28. **Alessio H M** *Exercise-induced oxidative stress.* Med Sci Sports Exercise **25**, 218-24 (1993)
29. **Block G, Dietrich M, Norkus Edward P, Morrow Jason D, Hudes M, Caan B und Packer L** *Factors associated with oxidative stress in human populations.* Am J Epidemiol **156**, 274-85 (2002)
30. **Halliwell B und Gutteridge J M C** *The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases.* Mol Aspects Med **8**, 89-193 (1985)
31. **Mates J M, Perez-Gomez C und De Castro I N** *Antioxidant enzymes and human diseases.* Clin Biochem **32**, 595-603 (1999)
32. **Thannickal V J und Fanburg B L** *Reactive oxygen species in cell signaling.* Am J Physiol **279**, 1005-1028 (2000)

33. **Frankel E N und Meyer A S** *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.* J Sci Food Agric **80**, 1925-1941 (2000)
34. **Huang D, Ou B und Prior R L** *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.* J Agric Food Chem **53**, 1841-1856 (2005)
35. **Li Y, Huang T-T, Carlson E J, Melov S, Ursell P C, Olson J L, Noble L J, Yoshimura M P, Berger C und et al.** *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.* Nat Genet **11**, 376-81 (1995)
36. **Ho Y-S, Gargano M, Cao J, Bronson R T, Heimler I und Hutz R J** *Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase.* J Biol Chem **273**, 7765-7769 (1998)
37. **Carlsson L M, Jonsson J, Edlund T und Marklund S L** *Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia.* Proc Natl Acad Sci USA **92**, 6264-8 (1995)
38. **Kirkman H N und Gaetani G F** *Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH.* Proc Natl Acad Sci USA **81**, 4343-7 (1984)
39. **Chance B, Sies H und Boveris A** *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.* Physiol Rev **59**, 527-605 (1979)
40. **De Haan J B, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea R D, Cheung N S, Bronson R T, Silvestro M J, Wild S, Zheng S S, Beart P M, Hertzog P J und Kola I** *Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide.* J Biol Chem **273**, 22528-22536 (1998)
41. **Siems W, Sommerburg O, Mayer H und Tilman G** *Oxidativer Stress und Pharmaka.* In: Oxidativer Stress und Pharmaka (Siems W, Krämer K und Grune T), 43-64, Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn (2005)
42. **Halliwell B** *Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action?* Free Radical Biol Med **7**, 645-51 (1989)
43. **Sanchez-Moreno C** *Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.* Food Sci Technol Int (London, UK) **8**, 121-137 (2002)
44. **Miller N J, Rice-Evans C, Davies M J, Gopinathan V und Milner A** *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.* Clin Sci **84**, 407-12 (1993)
45. **Rice-Evans C und Miller N J** *Total antioxidant status in plasma and body fluids.* Methods Enzymol **234**, 279-93 (1994)

46. **Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M und Rice-Evans C** *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biol Med **26**, 1231-1237 (1999)
47. **DeLange R J und Glazer A N** *Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents*. Anal Biochem **177**, 300-6 (1989)
48. **Cao G, Alessio H M und Cutler R G** *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. Free Radical Biol Med **14**, 303-11 (1993)
49. **Ou B, Hampsch-Woodill M und Prior R L** *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. J Agric Food Chem **49**, 4619-4626 (2001)
50. **Wayner D D M, Burton G W, Ingold K U und Locke S** *Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins*. FEBS Lett **187**, 33-7 (1985)
51. **Wayner D D M, Burton G W, Ingold K U, Barclay L R C und Locke S J** *The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma*. Biochim Biophys Acta **924**, 408-19 (1987)
52. **Blois M S** *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature (London, UK) **181**, 1199-200 (1958)
53. **Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J und Shani J** *Free radical scavenging by ethanol extract of propolis*. Int J Radiat Biol **57**, 461-5 (1990)
54. **Benzie I F F und Strain J J** *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem **239**, 70-76 (1996)
55. **Folin O und Ciocalteu V** *Tyrosine and tryptophan determinations proteins*. J Biol Chem **73**, 627-50 (1927)
56. **Bors W, Michel C und Saran M** *Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity*. Biochim Biophys Acta **796**, 312-19 (1984)
57. **Fogliano V, Verde V, Randazzo G und Ritieni A** *Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines*. J Agric Food Chem **47**, 1035-1040 (1999)
58. **Soltau A** *Dissertation in Vorbereitung* (Universität Hamburg)

59. **Andreae W A** *A sensitive method for the estimation of hydrogen peroxide in biological materials.* Nature (London, UK) **175**, 859-60 (1955)
60. **Root R K, Metcalf J, Oshino N und Chance B** *Hydrogen peroxide release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors.* J Clin Invest **55**, 945-55 (1975)
61. **Flohe L und Brand I** *Kinetics of glutathione peroxidase.* Biochim Biophys Acta **191**, 541-9 (1969)
62. **Staniek K und Nohl H** *Hydrogen Peroxide detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system.* Biochim Biophys Acta **1413**, 70-80 (1999)
63. **Swaroop A und Ramasarma T** *Inhibition of hydrogen peroxide generation in rat liver mitochondria by radical quenchers and phenolic compounds.* Biochem J **194**, 657-65 (1981)
64. **Halliwell B** *Antioxidant characterization. Methodology and mechanism.* Biochem Pharmacol **49**, 1341-8 (1995)
65. **Aruoma O I, Halliwell B, Hoey B M und Butler J** *The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid.* Free Radical Biol Med **6**, 593-7 (1988)
66. **van Antwerpen P und Neve J** *In vitro comparative assessment of the scavenging activity against three reactive oxygen species of non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxicam and sulfoanilide families.* Eur J Pharmacol **496**, 55-61 (2004)
67. **Pazdzioch-Czochra M und Widenska A** *Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity.* Anal Chim Acta **452**, 177-184 (2002)
68. **Martinez-Tome M, Garcia-Carmona F und Murcia M A** *Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives.* J Sci Food Agric **81**, 1019-1026 (2001)
69. **Boveris A, Martino E und Stoppani A O M** *Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems.* Anal Biochem **80**, 145-58 (1977)
70. **Corbett J T** *The scopoletin assay for hydrogen peroxide: a review and a better method.* J Biochem Biophys Methods **18**, 297-307 (1989)
71. **Mohanty J G, Jaffe J S, Schulman E S und Raible D G** *A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative.* J Immunol Methods **202**, 133-141 (1997)

72. **Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N und Haugland R P** *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidase spectrochem. anal. fluorometrics.* Anal Biochem **253**, 162-168 (1997)
73. **Budavari S** *Merck Index - An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals.* Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey (1989)
74. **Lichtenberg L A und Wellner D** *A sensitive fluorometric assay for amino acid oxidases.* Anal Biochem **26**, 313-9 (1968)
75. **Moridani M Y, Scobie H, Jamshidzadeh A, Salehi P und O'Brien P J** *Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation.* Drug Metab Dispos **29**, 1432-1439 (2001)
76. **Becker H G O, Berger W und Domschke G** *Organikum - Organisch-chemisches Grundpraktikum.* WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2001)
77. **Meunier G und Meunier B** *Evidences for an efficient demethylation of methoxyellipticine derivatives catalyzed by a peroxidase.* J Am Chem Soc **107**, 2558-60 (1985)
78. **Donahue W F** *Interference in fluorometric hydrogen peroxide determination using scopoletin-horseradish peroxidase.* Environ Toxicol Chem **17**, 783-787 (1998)
79. **Tarpey M M und Fridovich I** *Methods of detection of vascular reactive species. Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite.* Circ Res **89**, 224-236 (2001)
80. **Ehlers E** *Analytik I - Qualitative pharmazeutische Analytik.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1997)
81. **Miles A M und Grisham M B** *Antioxidant properties of aminosalicylates.* Methods Enzymol **234**, 555-72 (1994)
82. **Calcutt G** *The formation of hydrogen peroxide during the autoxidation of ascorbic acid.* Experientia **7**, 26 (1951)
83. **Scarpa M, Stevanato R, Viglino P und Rigo A** *Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase.* J Biol Chem **258**, 6695-7 (1983)
84. **Miyake N, Kim M und Kurata T** *Formation mechanism of monodehydro-L-ascorbic acid and superoxide anion in the autoxidation of L-ascorbic acid.* Biosci, Biotechnol, Biochem **61**, 1693-1695 (1997)
85. **Wang S Y und Jiao H** *Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen.* J Agric Food Chem **48**, 5677-5684 (2000)

86. **Jander G** *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1995)
87. **Allsopp C B** *Application of a photoelectric method to the colorimetric estimation of hydrogen peroxide with titanium sulfate*. *Analyst* **66**, 371 (1941)
88. **Eisenberg G M** *Colorimetric determination of hydrogen peroxide*. *Ind Eng Chem, Anal Ed* **15**, 327-8 (1943)
89. **Veber M und Csanyi L J** *Analytical applications of mixed-ligand complexes. II. Determination of hydrogen peroxide in the presence of peroxide derivatives*. *Microchem J* **22**, 238-44 (1977)
90. **Sellers R M** *Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using potassium titanium(IV) oxalate*. *Analyst (Cambridge, UK)* **105**, 950-4 (1980)
91. **Clapp P A, Evans D F und Sheriff T S S** *Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide after extraction with ethyl acetate*. *Anal Chim Acta* **218**, 331-4 (1989)
92. **Wagner R und Ruck W** *Determination of hydrogen peroxide and other peroxy compounds*. *Z Wasser Abwasser Forsch* **17**, 262-7 (1984)
93. **Otomo M** *Photometric determination of titanium with hydrogen peroxide and Xylenol Orange*. *Bull Chem Soc Jpn* **36**, 1341-6 (1963)
94. **Patterson B D, MacRae E A und Ferguson I B** *Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV)*. *Anal Biochem* **139**, 487-92 (1984)
95. **Mori M, Shibata M, Kyuno E und Ito S** *Reaction of hydrogen peroxide with titanium(IV) at different pH values*. *Bull Chem Soc Jpn* **29**, 904-7 (1956)
96. **Jander G** *Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum (einschließlich der quantitativen Analyse)*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1995)
97. **Dempsey P M, O'Leary J und Condon S** *Polarographic assay of hydrogen peroxide accumulation in microbial cultures*. *Appl Microbiol* **29**, 170-4 (1975)
98. **Akgol S und Kinckaya E** *A novel biosensor for specific determination of hydrogen peroxide: catalase enzyme electrode based on dissolved oxygen probe*. *Talanta* **48**, 363-367 (1999)
99. **Ohki A, Naka K, Ito O und Maeda S** *Enzyme electrode for hydrogen peroxide using a new enzyme-immobilization "polymer-enzyme aggregate"*. *Chem Lett* 1065-8 (1994)
100. **Severinghaus J W und Astrup P B** *History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode*. *J Clin Monit* **2**, 125-39 (1986)
101. **Clark L C, Jr., Wold R, Granger D und Taylor Z** *Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography*. *J Appl Physiol* (1948-1976) **6**, 189-93 (1953)

102. **Tanguy S, Boucher F R, Malfroy B und De Leiris J G** *Free radicals in reperfusion-induced arrhythmias: study with EUK 8, a novel nonprotein catalytic antioxidant.* Free Radical Biol Med **21**, 945-954 (1996)
103. **Rong Y, Doctrow S R, Tocco G und Baudry M** *EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology.* Proc Natl Acad Sci USA **96**, 9897-902 (1999)
104. **Baker K, Marcus C B, Huffman K, Kruk H, Malfroy B und Doctrow S R** *Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury.* J Pharmacol Exp Ther **284**, 215-221 (1998)
105. **Mortimer C E** *Chemie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996)
106. **Zhang X** *Real time and in vivo monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors- from dream to reality.* Front Biosci **9**, 3434-3446 (2004)
107. **Falbe J und Regitz M** *Roempp Chemie Lexikon.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)

14 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Guido Schmeinck
Geburtsdatum	16.05.1978
Geburtsort	Bocholt
Familienstand	verheiratet seit dem 29.07.2005 mit Meike Schmeinck, geb. Maßmann
Kinder	Mia, geboren am 29.07.2007

Schulbildung

1984-1988	Clemens-August Grundschule, Bocholt
1988-1997	Euregio-Gymnasium, Bocholt

Zivildienst

1997-1998	St. Vinzenz-Hospital Rhede
-----------	----------------------------

Studium

1998-2002	Studium der Pharmazie an der Universität Münster
Nov 2002 - Apr 2003	Pharmaziepraktikum in der Laurentius- Apotheke, Aachen
Mai 2003 - Okt 2003	Pharmaziepraktikum bei der Grünenthal-GmbH, Aachen
Dezember 2003 Februar 2004	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung Approbation als Apotheker

Promotion

2004 – 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Hamburg, Institut für Pharmazie Betreuung des Praktikums: Arzneistoffanalytik unter besonderer Berücksichtigung der Arzneibücher (Qualitätskontrolle und -sicherung) Anfertigung einer Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Duchstein
-------------	--