

Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Verena Arnold

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

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hartwig
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Lothar W. Kroh
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Platzek

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 11.07.2005

Berlin 2005
D 83

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), früher BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Fachbereich Toxikologie der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände.

Ich danke Prof. Dr. rer. nat. Thomas Platzek vom BfR für die Bereitschaft, sich als Betreuer zur Verfügung zu stellen, das entgegengebrachte Vertrauen, die wertvollen Hinweise und seine Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. rer. nat. Lothar W. Kroh von der Technischen Universität Berlin danke ich herzlich für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit und seine konstruktiven, pragmatischen Anregungen.

Den Kolleginnen und Kollegen aus dem gesamten Fachbereich 1 des BfR sei an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme und die stets angenehme, hilfsbereite Arbeitsatmosphäre gedankt. Für das Zustandekommen dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. Werner Grunow sowie Herrn Dr. Christhard Böhme. Herrn Dr. Hans-Jürgen Altmann und Herrn Dr. Rainer Gürtler danke ich für die Überlassung des Themas, ihre fachliche Diskussionsbereitschaft sowie die großzügige Unterstützung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen. Danke auch für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht zustande gekommen wäre.

Ein besonderer Dank richtet sich an Regina Zimmermann für ihre unermüdliche Hilfe bei der Bewältigung der zahlreichen Analysen und für ihre Kompetenz und Unterstützung in allen praktischen Laborangelegenheiten. Regina Al-Hamwi danke ich für die Weiterführung der praktischen Arbeiten und ihre kompetenten Literaturrecherchen. Ich danke Marlis Sagmeister und Elisabeth Hering für ihren stets hilfsbereiten Einsatz bei der Plasmagewinnung. Jörg Herre danke ich für seine permanente und schnelle Hilfe in allen Computerangelegenheiten. Dank auch an Gitti Finke und Dora Wittke für die Hilfsbereitschaft und die aufmunternden Gespräche über den Laboralltag hinaus.

Herzlichen Dank an alle Institutsangehörigen, die sich als Blutspender zur Verfügung gestellt haben. Den Mitarbeitern des Betriebsärztlichen Dienstes sei herzlich für die kooperative Unterstützung bei der Durchführung der zahlreichen Blutspenden gedankt.

Bei Herrn Dipl.-Ing. Scharna vom IVT der Universitätsbibliothek an der Technischen Universität Berlin möchte ich mich für die umfangreichen Literaturrecherchen bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank richtet sich an meine Eltern, die mich stets großzügig unterstützt haben sowie an meinen Ehemann Andreas, der mit seinen Anregungen stets Motivation und eine große moralische Stütze war.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Symbolverzeichnis	VII
Definitionen	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XVII
Zusammenfassung.....	XIX
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Struktur und Reaktivität von Carbonsäureestern	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.2 Qualitative Parameter	3
2.1.3 Quantitative Parameter	4
2.2 Klassifizierung esterspaltender Enzyme	5
2.3 Zum Metabolismus von Carbonsäureestern	6
2.4 Verlauf der enzymatisch katalysierten Esterhydrolyse	10
2.4.1 Mikroskopische Betrachtung.....	10
2.4.2 Phänomenologischer Ansatz	12
2.5 Pharmakokinetische Parameter.....	16
2.5.1 Spezifische Hydrolyseaktivität	16
2.5.2 Halbwertszeit	17
2.5.3 Reaktionskinetik nach der Theorie von <i>Michaelis-Menten</i>	18
3 Aromastoffe in Lebensmitteln	23
3.1 Allgemeines	23
3.1.1 Begriffsbestimmung	23
3.1.2 Lebensmittelrechtliche Einordnung.....	24
3.2 Toxikologische Bewertung	24
3.2.1 Allgemeines	24
3.2.2 Bewertungsprogramm der Europäischen Kommission.....	25
3.3 Literaturübersicht zu Hydrolysestudien	27
4 Problemstellung und Lösungsansätze	35
5 Ergebnisse	37
5.1 Zur Auswahl der Carbonsäureester und Herangehensweise	37
5.2 Löslichkeit der Carbonsäureester im wässrigen Medium	38

5.3	Plasmagewinnung	44
5.4	Validierung der Methode	48
5.4.1	Versuchsaufbau und Reagenzien	48
5.4.2	Substratkonzentration.....	49
5.4.3	Clean up	50
5.4.4	Plasmapool und Lagerdauer	52
5.4.5	Generieren der Rohdaten.....	56
5.5	Pharmakokinetische Parameter	57
5.5.1	Allgemeines	57
5.5.2	Berechnung der spezifischen Hydrolyseaktivität.....	57
5.5.3	Berechnung der Halbwertszeit	58
5.5.4	Berechnung der kinetischen Parameter nach <i>Michaelis-Menten</i>	58
5.5.5	Phenylacetat als Referenz mit schnellster Hydrolysierbarkeit.....	64
5.6	Vergleich verschiedener physiologischer Medien	65
5.7	Hydrolyseuntersuchungen in Humanplasma.....	67
5.7.1	Ethylester mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest.....	67
5.7.2	Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem oder aromatischem Acylrest.....	75
5.7.3	Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur	86
6	Diskussion	93
6.1	Metabolismus und Risikobewertung.....	93
6.2	Validierung und Methodik.....	94
6.3	Esterhydrolyse in verschiedenen biologischen Medien.....	97
6.4	Hydrolyse in Humanplasma.....	99
6.4.1	Ethylester mit aliphatisch linear verzweigtem und verzweigtem Acylrest.....	99
6.4.2	Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem oder aromatischem Acylrest.....	101
6.4.3	Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur	103
6.4.4	Bewertung der Hydrolysierbarkeit	104
6.4.5	Struktur-Wirkungsbeziehungen	109
6.4.6	Bewertung der Hydrolyseergebnisse.....	111
6.5	Fehlerbetrachtung	112
7	Ausblick	115
8	Experimenteller Teil.....	117
8.1	Allgemeines	117
8.2	Geräte.....	117
8.2.1	Tierhaltung.....	117
8.2.2	Narkose	117
8.2.3	Gaschromatographie	118

8.2.4	Geräte zur Probenvorbereitung und Analyse.....	118
8.2.5	Spektralphotometrie.....	118
8.2.6	Probenarchivierung.....	119
8.3	Chemikalien und Materialien.....	119
8.4	Prüfvorschriften.....	121
8.4.1	Gewinnung von Rattenplasma.....	121
8.4.2	Gewinnung von Humanplasma.....	121
8.4.3	Zum Umgang mit Blutplasma.....	122
8.4.4	Allgemeine Durchführung eines Hydrolyseexperimentes	123
8.4.5	Probenahme	124
8.4.6	Probenaufarbeitung zur Analyse von Carbonsäureestern	124
8.4.7	Probenaufarbeitung zur Analyse von Esterhydrolyseprodukten	124
8.4.8	Gaschromatographische Analyse	125
8.4.9	Validierung	126
8.4.10	Proteinbestimmung	127
8.4.11	Bestimmung der Löslichkeit von Carbonsäureestern	128
	Literaturverzeichnis	131
	Anhang.....	149
I	Eigenschaften und Verwendung von ausgewählten Carbonsäureestern	149
II	Messdaten und Validierungsparameter GC-Analytik	155
III	Methodenvalidierung.....	161
IV	Biologisches Material und pharmakokinetische Parameter	163
	Lebenslauf.....	189

Abkürzungsverzeichnis

Ac	<u>Ac</u> etat
AC	<u>Allyl</u> caproat
Acry	<u>acryl</u> at (propenoat)
All	<u>Allyl</u> (2-propen)
Am	<u>Amyl</u> (n-pentyl)
BA	Butyl <u>ac</u> etat
Benz	<u>Benzyl</u>
BG	<u>Bestimmungsg</u> renze
BiB	<u>Benzylisob</u> utyrat
BlutVol	<u>Blutvolumen</u>
BPA	<u>Benzylphenyl</u> acetat
BS	<u>Benzylsalicyl</u> at
BT	<u>Benzyltigl</u> at
But	<u>Butyl</u>
Butyr	<u>butyr</u> at
BW	<u>Blindw</u> ert
Cap	<u>cap</u> roat (hexanoat)
CEFS	(engl.) <u>C</u> ommittee of <u>E</u> xperts on <u>F</u> lavouring <u>S</u> ubstances
Cinn	<u>cinn</u> amat (<i>trans</i> -3-phenylpropenoat)
COE	(engl.) <u>C</u> ouncil of <u>E</u> urope
Cyt	<u>Cytosol</u>
Dec	<u>decan</u> oat
EB	<u>Ethylbutyr</u> at
EC	<u>Ethylcinn</u> amat
EH	<u>Ethylhept</u> anoat
EiV	<u>Ethylisoval</u> erat
EM	<u>Ethylmyrist</u> at
EP	<u>Ethylpropion</u> at
EPA	<u>Ethylphenyl</u> acetat
Erythr	<u>Erythrozyten</u>
ES	<u>Ethylsalicyl</u> at
Et	<u>Ethyl</u>
ET	<u>Ethyltigl</u> at
EtPhen	<u>Ethylphenyl</u>
EU	<u>Ethylundecan</u> oat
EV	<u>Ethylval</u> erat
FAEE	(engl.) <u>f</u> atty <u>a</u> cid <u>e</u> thyl <u>e</u> ster
FEMA	(engl.) <u>F</u> lavoring <u>E</u> xtract <u>M</u> anufacturer's <u>A</u> ssociation
FAO	(engl.) <u>F</u> ood and <u>A</u> griculture <u>O</u> rganization of the United Nations
FurylProp	<u>furylpropion</u> at
HA	<u>Heptyl</u> acetat
Hep	<u>hept</u> anoat
Hex	<u>hex</u> anoat
i.v.	(lat.) <u>i</u> ntrav <u>e</u> nous

IAB	<u>I</u> so <u>a</u> myl <u>b</u> utyrat
IAC	<u>I</u> so <u>a</u> myl <u>c</u> aproat
IAiV	<u>I</u> so <u>a</u> myl <u>i</u> so <u>v</u> alerat
iAm	<u>i</u> so- <u>A</u> myl
iBut	<u>i</u> so- <u>B</u> utyrat
IOFI	(engl.) <u>I</u> nternational <u>O</u> rganisation of the <u>F</u> lavour <u>I</u> ndustry
iProp	<u>i</u> so- <u>P</u> ropyl
iVal	<u>i</u> so <u>v</u> alerat (isopentanoat)
JECFA	(engl.) <u>J</u> oint FAO/ <u>W</u> HO <u>E</u> xpert <u>C</u> ommittee on <u>F</u> ood <u>A</u> dditives
k. A.	<u>k</u> eine <u>A</u> ngaben vorhanden
KHP	<u>K</u> rebs- <u>H</u> enseleit- <u>P</u> uffer
KMF	<u>k</u> ünstliche <u>M</u> agen <u>f</u> lüssigkeit
Lau	<u>l</u> aurat (dodecanoat)
LDL	(engl.) <u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
Lin	<u>l</u> inoleat
LMKV	<u>L</u> ebens <u>m</u> ittel- <u>K</u> ennzeichnungs <u>v</u> erordnung
MA	<u>M</u> ethylan <u>t</u> hranilat
Me	<u>M</u> ethyl
MeAcry	<u>m</u> ethyl <u>a</u> crylat (methylpropenoat)
Mikr	<u>M</u> ikrosomen
MO	<u>M</u> ethylo <u>o</u> ctanoat
MPA	<u>M</u> ethyl <u>p</u> henyl <u>a</u> ccetat
NWG	<u>N</u> ach <u>w</u> eis <u>g</u> renze
PA	<u>P</u> henyl <u>a</u> ccetat
Pel	<u>p</u> elargonat (nonanoat)
Phen	<u>P</u> henyl
PhenAc	<u>P</u> henyl <u>a</u> ccetyl
PhenEt	<u>P</u> henyl <u>e</u> thyl
PhenProp	<u>p</u> henyl <u>p</u> ropionat
PL	<u>P</u> lasma
PLE	(engl.) <u>p</u> ig <u>l</u> iver <u>e</u> sterase (Schweineleberesterase)
Prop	<u>p</u> ropionat
Sali	<u>s</u> alicylat (2-hydroxybenzoat)
SCF	(engl.) <u>S</u> cientific <u>C</u> ommittee on <u>F</u> ood
SCOOP	(engl.) <u>S</u> cientific <u>C</u> ooperation Working Group on Chemically Defined Flavouring Substances of the Scientific Committee on Food of the EC
secBut	<u>sec</u> - <u>B</u> utyl
tertBut	<u>tert</u> - <u>B</u> utyl
Tigl	<u>t</u> iglat (<i>trans</i> -2-methyl-2-butenat)
ÜZ	Übergangszustand
vgl.	<u>v</u> er <u>g</u> leiche
VO	<u>V</u> er <u>o</u> rdnung
WHO	(engl.) <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation

Symbolverzeichnis

Fth	[μm]	Film Thickness (Filmdicke)
H _a	[mol /min·g Protein]	spezifische Hydrolyseaktivität
ID	[mm]	(engl.) Inner Diameter – Innendurchmesser
K _m	[mol /L]	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante
lg	-	Logarithmus zur Basis 10
ln	-	Logarithmus zur Basis 2
log	-	Logarithmus
log P _{OW}		Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
mg	10 ⁻³ g	Milligramm
mM	10 ⁻³ mol /L	Millimol je Liter
mmol	10 ⁻³ mol	Millimol
nmol	10 ⁻⁹ mol	Nanomol
μmol	10 ⁻⁶ mol	Mikromol
$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$		arithmetisches Mittel, Mittelwert
n	-	Anzahl der Parallelexperimente
pK _m	-	negativer dekadischer Logarithmus der <i>Michaelis-Menten</i> -Konstante
ρ	[g /cm ³]	Spezifische Dichte (bei einer Temperatur von 20°C)
R ² oder r ²		Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r Maß für die lineare Abhängigkeit zwischen zwei Datensätzen, dimensionslos und mit dem Wertebereich -1,0 ≤ r ≤ 1,0 (maximale Korrelation)
$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$		(engl.) standard deviation, empirische Standardabweichung
$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}}$		(engl.) <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean
S ₀	[mmol /L]	Substratanfangskonzentration (Initialkonzentration)
s _v	[mg /L]	Verfahrenstandardabweichung
v _i	[mol /min·g Protein]	Initialgeschwindigkeit
V _{max}	[mol /min·g Protein]	Maximalgeschwindigkeit
VK	[%]	Variationskoeffizient, relative Standardabweichung
x _i	-	einzelner Messwert

Definitionen

Halbwertszeit ($t_{1/2}$)	Die Halbwertszeit ist ein wichtiger pharmakokinetischer Parameter für die Eliminationsgeschwindigkeit einer Substanz aus dem Körper und definiert als die Zeit, innerhalb der die Hälfte des Substrats umgesetzt ist.
Hydrolyseaktivität, spezifische (H_a)	Die spezifische Hydrolyseaktivität ist definiert als die Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit des Substrates, die von einer bestimmten Enzymmenge im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion bewirkt wird (Umsatzrate je Zeiteinheit und Proteinkonzentration).
hydrophil	<i>(griechisch)</i> wasserliebend oder wasserlöslich; Eine Eigenschaft von Molekülen, Wechselwirkungen mit polaren Lösemitteln einzugehen. Die Löslichkeit hydrophiler Moleküle in Wasser beeinflusst indirekt deren Verfügbarkeit in Lebensmitteln sowie deren Ausscheidung über die Niere. Die Anordnung hydrophiler Moleküle an Membranlipide bewirkt die Zusammenlagerung zu Lipid-Doppelmembranen in wässriger Umgebung.
hydrophob	<i>(griechisch)</i> lipophil oder fettlöslich, Eine Eigenschaft von Molekülen, Wechselwirkungen mit unpolaren Lösemitteln einzugehen. Hydrophobe Substanzen können sich im Körperfett anreichern und werden nach Metabolisierung über die Niere ausgeschieden.
<i>in vitro</i>	Hier enzymatische Reaktion im geschlossenen Reaktionssystem. Experimente am isolierten Zellorgan oder in biologischen Flüssigkeiten unter definierten Reaktionsbedingungen im Reagenzglas. Die <i>in vitro</i> Reaktionen laufen ohne dynamische Wechselspiel zwischen Zelle, Zellorganellen, Gewebe, Organ und Gesamtorganismus ab. Die Enzyme sind frei in Lösung. Teilweise Inaktivierung der Enzyme während des Reaktionsverlaufs. Die Substratkonzentration $[S]$ ist gegenüber physiologischen Bedingungen relativ hoch: $[S] \gg K_s$ (Substratsättigung). Es kann in Abhängigkeit von der Versuchsdauer zu einer Anhäufung der Reaktionsprodukte kommen.
<i>in vivo</i>	Hier enzymatische Reaktion im offenen Reaktionssystem oder Reaktionsbedingungen der lebenden Zelle. Experimente am Gesamtorganismus, seinen Organen oder Zellen. Die Enzyme sind in Kompartimenten und an Strukturen gebunden. Der Enzymbestand wird ständig erneuert oder angepasst (Induktion oder Repression). Das Substrate liegt in geringer Konzentration vor: $[S]$ klein; $[S] \approx K_s$ (beschränktes Substratangebot). Während des Substratumsatzes erfolgt eine laufende Beseitigung der Reaktionsprodukte durch andere Enzyme oder deren Abtransport.

K_m	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante; wichtiges Maß für die Affinität eines Enzyms oder Enzymsystems zu einem Substrat. Je höher K_m , um so höher muss die Substratkonzentration sein, damit die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft und desto geringer ist demzufolge die Substrataffinität.
Median	Der Median oder Zentralwert ist definiert als der Wert, der die nach der Größe geordnete Wertereihe in zwei gleich große Teile zerlegt.
V_{max}	Die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ist definiert als eine nur theoretische erreichbare Maximalgeschwindigkeit nach der Theorie von <i>Michaelis-Menten</i> .

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Metabolismus der kurz- und mittelkettigen Fettsäuren im Vergleich zu dem der langkettigen (nach Jahreis & Bochmann, 1998)	7
Abb. 2:	Oxidativer und nicht-oxidativer Ethanolmetabolismus beim Menschen (nach Laposata, 1997)	8
Abb. 3:	FAEE-Synthaseaktivität bei der Bildung von Ethylestern (nach Riley et al., 1990)	9
Abb. 4:	Schematische Darstellung der esterasekatalysierten Hydrolyse von Carbonsäureestern (nach Quinn et al., 1999)	10
Abb. 5:	Mechanismus der Esterhydrolyse durch Carboxylesterase EC 3.1.1.1 (nach Satoh & Hosokawa, 1998).....	11
Abb. 6:	Phänomenologische Betrachtung einer esterasekatalysierten Esterhydrolyse.....	13
Abb. 7:	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit $[v]$ von der Substratanfangskonzentration $[S]$ (nach Drauz & Waldmann, 1995).....	14
Abb. 8:	Schema für die Ein-Substrat-Reaktion nach <i>Michaelis-Menten</i>	14
Abb. 9:	Heterogene Esterhydrolyse durch Lipasen nach <i>Michaelis-Menten</i> (Quinn et al., 1999).....	16
Abb. 10:	Verlauf einer enzymkatalysierten Reaktion bei Substraten mit unterschiedlicher Affinität (nach Drauz et al., 1995).....	20
Abb. 11:	Procedure for the safety evaluation of flavouring agents (nach JECFA, 1996)	26
Abb. 12:	<i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> -Hydrolyse von Ethylacetat bei der Ratte (nach Gallaher & Loomis, 1975).....	29
Abb. 13:	Einfluss der Acylkettenlänge auf pK_m (●) und V_{max} (▲) bei der Hydrolyse von Methylestern durch Carboxylesterase aus Rattenlebermikrosomen (nach Arndt & Krisch, 1973)	33
Abb. 14:	Abhängigkeit von V_{max} und K_m von PLE Isoenzymen I und V von der Acylkettenlänge bei der Hydrolyse von Methylestern (nach Junge & Heymann, 1979).....	33
Abb. 15:	Einfluss der Alkylkettenlänge auf pK_m (●) und V_{max} (▲) bei der Hydrolyse von Acetaten durch Carboxylesterase aus Rattenlebermikrosomen (nach Arndt & Krisch, 1973).....	34
Abb. 16:	Abhängigkeit von V_{max} und K_m von PLE Isoenzymen I und V von der Alkylkettenlänge bei der Hydrolyse von Acetaten (nach Junge & Heymann, 1979)	34
Abb. 17:	Substratübersicht für die enzymatische Hydrolyse in Humanplasma	37
Abb. 18:	Referenzsubstanz Phenylacetat.....	38

Abb. 19:	Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Puffer im Vergleich mit Ratten- und Humanplasma.....	39
Abb. 20:	Löslichkeit von Ethylestern mit aliphatisch linear gesättigtem Acylrest sowie Ethylisovalerat in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C im Vergleich mit Longland et al. (1977).....	41
Abb. 21:	Löslichkeit von Ethyl- und Benzylestern in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C im Vergleich mit Longland et al. (1977)	41
Abb. 22:	Löslichkeit von Estern mit identischer Summenformel und unterschiedlicher chemischer Struktur sowie Isoamylcaproat (IACap) in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C (Messwerte) im Vergleich mit Longland et al. (1977) in Wasser bei 37°C.....	42
Abb. 23:	Schematische Darstellung der negativen Korrelation von Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (37 °C) und Hydrophobizität von Carbonsäureestern $\log P_{OW}$	43
Abb. 24:	Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (37 °C) und Hydrophobizität $\log P_{OW}$ von Carbonsäureestern	44
Abb. 25:	Proteingehalt von Rattenplasma verschiedener Pools	47
Abb. 26:	Proteingehalt von Humanplasma verschiedener Pools	47
Abb. 27:	Schematische Darstellung der säulenchromatographische Reinigung der Probe aus biologischem Material.....	48
Abb. 28:	GC-Chromatogramm mit MN permabond® FFAP-DF-0.25 (30m x 0,32 mm) für Tiglinsäure und Benzylalkohol aus der Hydrolyse von Benzyltiglat in Humanplasma (Plasmacharge: (h)020.504; $S_0 = 1,00$ mM; $t_i = 30$ min, Interner Standard Pentansäure 12,58 ng/ μ l; Extraktionsmittel: Ethylacetat)	51
Abb. 29:	GC-Chromatogramme mit MN permabond® SE-52-DF-0.25 (25m x 0,32 mm) für Undecan- und Phenyllessigsäure aus der Hydrolyse von Ethylundecanoat und Ethylphenylacetat in Humanplasma (Plasmacharge: (h)020.504; $S_0 = 1,00$ mM; $t_i = 30$ min und 20 min, Interner Standard Decansäure: 18,33 und 16,56 ng/ μ l; Extraktionsmittel: Ethylacetat)	52
Abb. 30:	Substratumsatz von Phenylacetat in Rattenplasma Pool (r) 015.004, 1:100 verdünnt.....	53
Abb. 31:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei Phenylacetat in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei -84°C.....	54
Abb. 32:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer	54
Abb. 33:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Rattenplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer	55
Abb. 34:	Hydrolyse von Ethylheptanoat in künstlicher Magenflüssigkeit und 1:100 verdünntem Rattenplasma.....	56

Abb. 35:	Hydrolyseverlauf von Isoamylbutyrat in Humanplasma in Abhängigkeit von der Initialkonzentration des Esters	57
Abb. 36:	Ableitung der Geschwindigkeitskonstanten aus der enzymatischen Hydrolyse von Ethylvalerat in Humanplasma in Abhängigkeit von der Initialkonzentration	58
Abb. 37:	Ableitung der Initialgeschwindigkeit für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma	59
Abb. 38:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma als Funktion der Initialzeit.....	60
Abb. 39:	<i>Michaelis-Menten</i> -Parameter für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma als Funktion der Initialzeit nach <i>Lineweaver-Burk</i>	60
Abb. 40:	Linearisierungsverfahren für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma	61
Abb. 41:	<i>Cornish-Bowen</i> -Plot für die Hydrolyse in Humanplasma	61
Abb. 42:	Kinetische Parameter in Abhängigkeit von der Darstellungsform für die Hydrolyse von Phenylacetat und Ethylphenylacetat in Humanplasma	62
Abb. 43:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot für die Hydrolyse von Ethylvalerat und Ethylisovalerat in Rattenplasma in Abhängigkeit von der Plasma-Verdünnung	63
Abb. 44:	<i>Michaelis-Menten</i> -Parameter für die Hydrolyse von Ethylvalerat und Ethylisovalerat in Rattenplasma in Abhängigkeit von der Plasma-Verdünnung (nach <i>Lineweaver-Burk</i>).....	64
Abb. 45:	Hydrolyseaktivität künstlicher und physiologischer Körperflüssigkeiten bei Ethyltiglat und Benzyltiglat	66
Abb. 46:	Hydrolyseverlauf von Ethylestern mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest in Humanplasma.....	68
Abb. 47:	Bildung von Valeriansäure bei der Hydrolyse von Ethylvalerat in Humanplasma	68
Abb. 48:	Bildung von Myristinsäure bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylmyristat in Humanplasma.....	69
Abb. 49:	Spezifische Hydrolyseaktivität bei Ethylestern mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest in Humanplasma	70
Abb. 50:	Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten aus der Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma	71
Abb. 51:	Halbwertszeit von Ethylestern mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest sowie Ethylvalerat in Humanplasma	71
Abb. 52:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot: Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma	72
Abb. 53:	Maximalgeschwindigkeit und V_{\max}/K_m der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma	73
Abb. 54:	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante K_m der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma	74

Abb. 55:	Verlauf der Maximalgeschwindigkeit und dem negativen dekadischen Logarithmus von K_m (pK_m) in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Acylrests von Ethylestern bei der Hydrolyse in Humanplasma	75
Abb. 56:	Hydrolyseverlauf von Ethyl- und Benzylestern bei der Hydrolyse in Humanplasma.....	76
Abb. 57:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei Ethyl- und Benzylestern mit verzweigten oder aromatischem Acylrest	76
Abb. 58:	Bildung von Benzylalkohol bei der enzymatischen Hydrolyse von Benzyltiglat in Humanplasma	77
Abb. 59:	Bildung von Tiglinsäure bei der enzymatischen Hydrolyse von Benzyltiglat in Humanplasma.....	77
Abb. 60:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Ethyl- und Benzylestern mit verzweigtem und/oder aromatischem Acylrest in Humanplasma	78
Abb. 61:	Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern bei der Hydrolyse in Humanplasma.....	79
Abb. 62:	Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern mit verzweigtem oder aromatischem Acylrest in Humanplasma	79
Abb. 63:	Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern mit verzweigtem und/oder aromatischem Acylrest in Humanplasma	80
Abb. 64:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot: Hydrolyse von verschiedenen Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma	81
Abb. 65:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot: Hydrolyse von Ethylvalerat und -isovalerat in Humanplasma.....	82
Abb. 66:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot: Hydrolyse von Ethyl- und Benzylphenylacetat in Humanplasma.....	83
Abb. 67:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot: Hydrolyse von Ethyl- und Benzyltiglat in Humanplasma.....	83
Abb. 68:	Maximalgeschwindigkeit und V_{max}/K_m bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma.....	84
Abb. 69:	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante K_m der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma	85
Abb. 70:	Hydrolyseverlauf von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma	86
Abb. 71:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma.....	87
Abb. 72:	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k aus Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma.....	88

Abb. 73:	Halbwertszeit von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma	89
Abb. 74:	<i>Lineweaver-Burk</i> -Plot: Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma	90
Abb. 75:	Maximalgeschwindigkeit und V_{\max}/K_m der enzymatischen Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma	90
Abb. 76:	Maximalgeschwindigkeit und V_{\max}/K_m bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma	91
Abb. 77:	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante der Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma	91
Abb. 78:	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante K_m für die enzymatische Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma	105
Abb. 79:	Maximalgeschwindigkeit V_{\max} der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma	105
Abb. 80:	V_{\max}/K_m für die enzymatische Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma	105
Abb. 81:	Hydrolisierbarkeit der untersuchten Carbonsäureester anhand der Halbwertszeit in Humanplasma	107
Abb. 82:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration im Vergleich zu V_{\max}	165
Abb. 83:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	167
Abb. 84:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	168
Abb. 85:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	169
Abb. 86:	Halbwertszeit von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	171
Abb. 87:	Halbwertszeit von Ethylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	173
Abb. 88:	Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	174
Abb. 89:	Halbwertszeit von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	175

Abb. 90:	Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration und Maximalgeschwindigkeit V_{max} bei der Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma	177
Abb. 91:	Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$, spezifische Hydrolyseaktivität H_a sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} bei der Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma	179
Abb. 92:	Spezifische Hydrolyseaktivität H_a , spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	181
Abb. 93:	Spezifische Hydrolyseaktivität H_a , Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	182
Abb. 94:	Spezifische Hydrolyseaktivität H_a , Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	183
Abb. 95:	Kinetische Parameter von Ethylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma	184
Abb. 96:	Kinetische Parameter von Ethyl- und Benzylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma	184
Abb. 97:	Kinetische Parameter von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma	184
Abb. 98:	Spezifische Hydrolyseaktivität H_a von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	185
Abb. 99:	Halbwertszeit $t_{1/2}$ von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	186
Abb. 100:	Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma	187

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Auswahl der wichtigsten esterspaltenden Hydrolasen	5
Tab. 2:	Darstellungsformen zur grafischen Bestimmung von K_m und V_{max}	20
Tab. 3:	Einteilung der Aromastoffe gemäß Anlage 1 Aromenverordnung	23
Tab. 4:	Halbwertszeit von Carbonsäureestern und spezifische Hydrolyseaktivität von künstlicher Magen- und Pankreasflüssigkeit sowie Rattenleber- und Rattendünndarmmucosa-Homogenat bei 37°C (Longland et al., 1997).....	28
Tab. 5:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Lungen- und Leber-Homogenat von Phenylacetat und Amylacetat (nach Dahl, 1987).....	30
Tab. 6:	Studien zur Hydrolysierbarkeit von Carbonsäureestern	31
Tab. 7:	<i>Michaelis-Menten</i> Parameter von Carbonsäureestern	32
Tab. 8:	Studien zur Hydrolysierbarkeit beim Menschen	33
Tab. 9:	Löslichkeit von Carbonsäureestern in Krebs-Henseleit-Puffer (Messwerte) im Vergleich mit Longland et al. (1977) in aqua dest. bei 37°C sowie dem Octanol/Wasser- Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$).....	40
Tab. 10:	Löslichkeit der untersuchten Carbonsäureester in Krebs-Henseleit-Puffer	43
Tab. 11:	Parameter zur Gewinnung von Humanplasma.....	46
Tab. 12:	Parameter zur Gewinnung von Rattenplasma.....	46
Tab. 13:	Literaturangaben zum Proteingehalt von Ratte und Mensch.....	46
Tab. 14:	Gegenüberstellung verschiedener Lösemittel für die Substratdotierung	49
Tab. 15:	Pharmakokinetische Parameter für Phenylacetat in Humanplasma.....	65
Tab. 16:	Reihenfolge der untersuchten Ethylester mit zunehmender Hydrolysierbarkeit und Substrataffinität in Humanplasma	100
Tab. 17:	Reihenfolge der untersuchten Ethyl- und Benzylester mit zunehmender Hydrolysierbarkeit und Substrataffinität in Humanplasma	102
Tab. 18:	Reihenfolge der zunehmenden Hydrolysierbarkeit und Substrataffinität bei Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur	103
Tab. 19:	Kinetische Parameter nach <i>Michaelis-Menten</i> von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma.....	106
Tab. 20:	Chemikalien	119
Tab. 21:	Lösungen	120
Tab. 22:	Verbrauchsmaterial.....	121
Tab. 23:	Substratzusatz für den Hydrolyseansatz	124
Tab. 24:	Zeitpunkte der Probenahme nach Reaktionsstart	124
Tab. 25:	Temperaturprogramm für Carbonsäureester.....	125

Tab. 26:	Temperaturprogramm für Esterhydrolyseprodukte	126
Tab. 27:	Organoleptische Eigenschaften, Vorkommen und Verwendung von Carbonsäureestern in Lebensmitteln	149
Tab. 28:	Verwendung von ausgewählten Carbonsäureestern in kosmetischen Mitteln	154
Tab. 29:	Messdaten - Ethylester.....	155
Tab. 30:	Messdaten - Benzylester.....	157
Tab. 31:	Messdaten – Methyloctanoat, Isoamylbutyrat, Phenylacetat	158
Tab. 32:	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der gaschromatographischen Analyse	159
Tab. 33:	Wiederfindungsrate der Analyten in Humanplasma und Krebs-Henseleit-Puffer in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration	160
Tab. 34:	Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Puffer im Vergleich mit Ratten- und Humanplasma	161
Tab. 35:	Hydrolyse von Ethylheptanoat in künstlicher Magenflüssigkeit.....	161
Tab. 36:	Hydrolyse von Ethylheptanoat in 1:100 verdünntem Rattenplasma.....	161
Tab. 37:	Kinetische Parameter in Abhängigkeit von der Darstellungsform für Phenylacetat in Humanplasma.....	162
Tab. 38:	Kinetische Parameter in Abhängigkeit von der Darstellungsform für Ethylphenylacetat in Humanplasma	162
Tab. 39:	Kinetische Parameter für Phenylacetat in Humanplasma in Abhängigkeit vom Tangentenanstieg.....	162
Tab. 40:	Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse von Ethylvalerat und -isovalerat in Rattenplasma in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.....	162
Tab. 41:	Hydrolyseaktivität von Rattenplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer	163
Tab. 42:	Hydrolyseaktivität von Humanplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer	163
Tab. 43:	Substratumsatz von Phenylacetat in Rattenplasma („frisch“; 1:100 verdünnt) in Abhängigkeit von der Lagerdauer	163
Tab. 44:	Spezifische Hydrolyseaktivität künstlicher und physiologischer Körperflüssigkeiten anhand von Ethyltiglat, Benzyltiglat und Phenylacetat	163
Tab. 45:	Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration.....	164
Tab. 46:	Halbwertszeit von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration.....	170
Tab. 47:	Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration.....	176

Zusammenfassung

Die Hydrolysierbarkeit von Carbonsäureestern, die als Aromastoffe und als Bestandteile von Lebensmittelverpackungsmaterial Bedeutung haben, spielt bei der toxikologischen Bewertung dieser Substanzen eine wichtige Rolle. Das Ziel vorliegender Studie war es, allgemeine Struktur-Wirkungsbeziehungen der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern abzuleiten.

Es wurden 15 Ester aus der ständig aktualisierten JECFA Flavouring Agents Database (JECFA, 2002) mit charakteristischen und für Aromastoffe relevanten Strukturmerkmalen ausgewählt: Ethylester mit linear unverzweigtem Acylrest verschiedener Kettenlänge (Ethylpropionat, -valerat, -heptanoat, -undecanoat und -myristat), Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem und aromatischem Acyl- oder Alkylrest (Ethylisovalerat, Ethyl- und Benzyltiglat, Ethyl- und Benzylphenylacetat, Benzylsalicylat sowie Ethylcinnamat) sowie Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur (Methyloctanoat, Ethylheptanoat und Isoamylbutyrat).

Voraussetzung für die Metabolisierung eines Stoffes ist seine Verteilung im Körper. Daher wurden in der ersten Projektphase die Löslichkeitseigenschaften der Ester beurteilt. Anhand der Löslichkeit in Verbindung mit dem errechneten Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$) konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Substanzen hydrophobe Eigenschaften besitzen.

In künstlicher Magenflüssigkeit, Rattenleberhomogenat sowie Ratten- und Humanplasma wurden *in vitro* Experimente durchgeführt. Aus der Geschwindigkeit von Substratabbau und Produktbildung wurden die pharmakokinetischen Kennzahlen spezifische Hydrolysierbarkeit, Halbwertszeit und *Michaelis-Menten*-Parameter abgeleitet. Die Validierung zur Bestimmung der Hydrolyseparameter erfolgte mittels Hydrolyse von Benzyltiglat, Ethyltiglat und Ethylheptanoat sowie der Referenzsubstanz Phenylacetat in Rattenplasma. Dem wurde die Hydrolysierbarkeit in Humanplasma, künstlicher Magenflüssigkeit und Leberhomogenat gegenübergestellt. Erwartungsgemäß wurde in künstlicher Magenflüssigkeit die geringste Hydrolyseaktivität bestimmt.

Rattenplasma hydrolysierte die Ester im Vergleich zu Humanplasma um den Faktor 7 bis 10 (Ethyltiglat) und 34 bis 51 (Benzyltiglat) schneller. Die höchste Hydrolyseaktivität besaß Rattenleberhomogenat, welches Ethyl- und Benzyltiglat 600-mal und 350-mal schneller als Rattenplasma hydrolysierte. Die speziesspezifischen Hydrolyseeigenschaften bei Mensch und Ratte beruhen auf deren unterschiedlicher Carboxylesterase-Konstitution. Die Ratte besitzt im Vergleich zum Menschen ein hohes Carboxylesteraselevel. Die beim Menschen höhere Cholinesteraseaktivität trägt dagegen nur in einem geringen Maße zur hydrolytischen Spaltung bei. Für die Einteilung der Substanzen nach ihrer Hydrolysierbarkeit wurden nur die Ergebnisse der Studien mit Humanplasma herangezogen.

Ethylundecanoat-, -myristat und -cinnamat sowie Benzylsalicylat und -tiglat wurden in Humanplasma langsam hydrolysiert. Die Elimination war nach ca. 4 bis 5 Halbwertszeiten weitestgehend abgeschlossen. In Verbindung mit den hydrophoben Eigenschaften ($\log P_{OW} > 2$) muss jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Substanzen längere Zeit im Körper zirkulieren. Damit ist besonders im Fettgewebe eine Tendenz zur Anreicherung gegeben.

Die untersuchten Ester wurden bezüglich ihrer Hydrolysierbarkeit in drei Klassen eingeteilt, wobei die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und der Quotient aus Maximalgeschwindigkeit und *Michaelis-Menten*-Konstante (V_{\max}/K_m) als Kriterien herangezogen wurden. Dabei ergaben sich folgende Klassen:

Klasse I: schnelle Hydrolysierbarkeit

Ethylvalerat
Isoamylbutyrat
Benzylphenylacetat
Phenylacetat (Referenzsubstanz)

Klasse II: mäßige Hydrolysierbarkeit

Ethylpropionat
Ethylheptanoat
Ethylisovalerat
Ethylphenylacetat

Klasse III: langsame Hydrolysierbarkeit

Ethylundecanoat und Ethylmyristat
Ethyltiglat
Benzyltiglat
Ethylcinnamat
Benzylsalicylat

In jeder Gruppe befinden sich Substanzen mit verschiedenen Struktureigenschaften, wie aliphatische Ketten mit und ohne Verzweigungen, aromatische Ringe sowie Doppelbindungen im Acylrest- und/oder Alkylrest.

Die *Verlängerung des Acylrestes* um ein oder zwei Methylgruppen führte zu einem signifikanten Abfall der Hydrolysegeschwindigkeit und beeinflusst damit die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} . Nach einem mit zunehmender Acylkettenlänge verzeichneten Anstieg wurde der Maximalwert für V_{\max} bei C_5 (Ethylvalerat) ermittelt. Die weitere Verlängerung der Acylkettenlänge geht mit einem Abfall von V_{\max} einher. Bei mehr als sieben Kohlenstoffatomen wurde die enzymatische Umsatzrate primär von der steigenden Hydrophobizität und damit verringerten Substratverfügbarkeit am reaktiven Zentrum behindert.

Die Kettenlänge des Alkylrestes beeinflusst die Michaelis-Menten-Konstante K_m . Carbonsäureester mit kurzkettigen Alkylresten ($C_n < 6$) besaßen im Vergleich zu längerkettigen einen höheren K_m -Wert. Eine Veränderung der Kettenlänge mit kurzkettigem Alkylrest bewirkte eine signifikante Änderung der Initialgeschwindigkeit, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des S_N2 -Mechanismus, Bildung und Zerfall des tetrahedralen Intermediats, besonders durch dessen Struktur beeinflusst wird.

Verzweigungen bei kurzkettigen Acylresten bewirkten keine signifikante Veränderung der Hydrophobizität. Sie wirkten sich besonders sterisch hemmend auf die Hydrolysierbarkeit aus, wenn sie sich in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms befinden. Dieser Effekt wurde vornehmlich bei voluminösen Substituenten in α -Position beobachtet. Die Abschirmung des reaktiven Zentrums ruft eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstante hervor.

Die intermolekulare Beweglichkeit der reagierenden funktionellen Gruppen ist somit herabgesetzt und führt zu Spannungen bei der Bildung des Übergangszustandes. Die Einführung von Verzweigungen in Estermoleküle wird als Parameter für eine erhöhte Toxizität angesehen.

Die Einführung eines *aromatischen Rings* in Estermoleküle mit kurzkettigen Substituenten ohne Verzweigungen im Molekül beeinträchtigt die Hydrolysierbarkeit nicht. Arylester wurden rasch durch im Plasma befindliche Arylesterase umgesetzt und daher im Vergleich zu Estern mit kurzen Acyl- und Alkylresten vergleichsweise schnell abgebaut. Dieser Effekt überwog deutlich die hervorgerufene Steigerung der Hydrophobizität durch aromatische Substituenten gegenüber kurzkettig verzweigten oder kurzkettig unverzweigten.

Polare Gruppen, wie 2-Hydroxygruppen an aromatischen Ringen, setzen die Carbonylaktivität der funktionellen Gruppe herab. Die erhöhte Polarität der Carbonylgruppe begünstigt eine verstärkte Ausbildung einer Solvathülle, wodurch der Substratangriff allgemein erschwert wird. Dieser Einfluss ist besonders stark in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms ausgeprägt. Weiterhin setzen Sauerstoffatome im Substratmolekül durch Erhöhung der Polarität des Substrates die Hydrolyseaktivität von Lipasen herab.

Der *trans-2- oder trans-3-Doppelbindungen* im Acylrest des Esters verringerten die Hydrolyserate des Substrats signifikant. Sie bewirken eine voluminösere Ausdehnung des Molekülrests und reduzieren dadurch die Bindungsbereitschaft bei der Bildung des Übergangszustandes. Zusätzlich wurde eine erhöhte Hydrophobizität hervorgerufen, die eine im Wässrigen verringerte Substratkonzentration bewirkt.

Die untersuchten Ester mit *identischer Summenformel und verschiedener chemische Struktur* unterschieden sich in der Hydrophobizität nicht. Die unterschiedlichen polaren Eigenschaften von Acyl- und Alkylrest hoben sich bei *inversen Estern* auf. Die Verzweigung in C₃-Position befand sich im Alkylrest und damit an der carbonylfunktion-abgewandten Seite, sodass eine Verringerung der Hydrolysierbarkeit nicht festgestellt wurde. Der gleichzeitig kurzkettige und unverzweigte Acylrest (C₄) bewirkte eine gegenüber den Vergleichssubstanzen (C₇ und C₈) erhöhte Abbaurate.

Die unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften zeigen, dass grundsätzlich eine schnelle Hydrolyse von Carbonsäureestern in Blutplasma des Menschen *nicht* unterstellt werden kann. Mit der Möglichkeit einer langsamen Hydrolyse muss gerechnet werden, wenn Substanzen mit voluminösen Substituenten in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms (α -Position) zu finden sind. Dazu zählen insbesondere Acylkettenlängen > 4 Kohlenstoffatome, *iso-, sec- oder tert*-Funktionen, aromatische Ringe mit polaren Gruppen wie 2-Hydroxy-Gruppen sowie *trans*-Doppelbindungen.

Die Extrapolation von Ergebnissen von der Ratte auf den Menschen in Bezug auf Blutplasma insoweit möglich, als dass aufgrund der verschiedenen Enzymkonstitution bei der Ratte grundsätzlich mit einer schnelleren Hydrolyse von Carbonsäureestern zu rechnen ist. Die am schnellsten ablaufende Hydrolyse in Rattenleberhomogenat lässt den Schluss zu, dass auch beim Menschen unhydrolysierte Ester über die Blutbahn in die Leber gelangt und dort rasch abgebaut wird. Somit kann die toxikologische Bewertung der Substanzklasse *Carbonsäureester* auch anhand der Hydrolyseprodukte vorgenommen werden.

1 Einleitung

Carbonsäureester finden als Aromastoffe und Bestandteile von Lebensmittelverpackungsmaterial seit vielen Jahren breite Anwendung. Die toxikologische Bewertung dieser Substanzen wird seit Jahrzehnten durch verschiedene internationale Gremien diskutiert. Hierbei stehen jene Substanzen im Vordergrund, die bei der Herstellung von Lebensmitteln als Aromastoffe verwendet werden. Bei der toxikologischen Beurteilung dieser Verbindungen spielt die Hydrolysierbarkeit eine bedeutende Rolle.

Die Kriterien für die toxikologische Bewertung werden von verschiedenen internationalen Komitees erarbeitet. Darunter sind Expertengremien wie das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), das Committee of Experts on Flavouring Substances of the Council of Europe (CE), das Scientific Committee for Food (SCF) der EU sowie internationale Organisationen der Aromenindustrie wie die International Organisation of the Flavour Industry (IOFI) in Europa und das Expert Panel of the Flavour and Extract Manufacturers Association of the United States (FEXPAN).

Ein Ansatzpunkt ist die Fragestellung, ob a) grundsätzlich eine schnelle Hydrolyse von Carbonsäureestern unterstellt werden kann oder ob b) auch mit der Möglichkeit einer langsamen Hydrolyse gerechnet werden muss und ob c) die Hydrolysegeschwindigkeit anhand der chemischen Struktur vorausgesagt werden kann oder ob dies im Einzelfall zu prüfen ist.

Bei vielen Estern ist nach der oralen Aufnahme in den Organismus mit einer schnellen Hydrolyse im Verdauungstrakt zu rechnen, so dass die Bewertung auch anhand der Hydrolyseprodukte möglich ist. Bisherige Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die hydrolytische Spaltung in einzelnen Fällen nur langsam verläuft und somit eine teilweise Resorption der unveränderten Ester im Magen-Darm-Trakt nicht ausgeschlossen werden kann. Dies wäre toxikologisch nur dann zu vernachlässigen, wenn in der Folge beim Durchtritt durch die Schleimhaut, im Blut oder in der Leber eine rasche Hydrolyse erfolgen würde und die gebildeten Alkohole und Carbonsäuren toxikologisch unproblematisch sind. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse durch in Geweben vorkommende Carboxylesterasen ist jedoch bei den einzelnen Estern unterschiedlich und wird von deren chemischer Struktur beeinflusst (Basak et al., 1997; Dahl et al., 1987; Grundschober, 1977; Longland et al., 1977; McCracken, 1993a; Savary & Constantin, 1970; Savary, 1972).

Im Fachbereich „Toxikologie der Lebensmittel und Bedarfgegenstände“ des Bundesinstituts für Risikobewertung (früher BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) in Berlin werden seit 1998 Grundlagen zur Methodenentwicklung verschiedener *in vitro* Hydrolysestudien erarbeitet. Der Schwerpunkt dieser Dissertation liegt in der Bewertung der enzymatischen Hydrolysierbarkeit verschiedener Carbonsäureester in Human- und Rattenplasma durch Nachweis von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

Es werden 15 Carbonsäureester aus 3 Strukturklassen ausgewählt: Ethylester mit linear unverzweigtem Acylrest verschiedener Kettenlänge, Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem und/oder aromatischem Acyl- und/oder Alkylrest sowie Ester mit identischer Summenformel und unterschiedlicher chemischer Struktur. Anhand der pharmakokinetischen Variablen *spezifische Hydrolyseaktivität*, *Halbwertszeit* und *Michaelis-Menten-Parametern* sollen allgemeine Aussagen zu chemischer Struktur und Hydrolysierbarkeit abgeleitet werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Struktur und Reaktivität von Carbonsäureestern

2.1.1 Allgemeines

Carbonsäureester sind Carbonylverbindungen, deren Reaktivität auf der leichten Polarität ihrer Carbonylgruppe beruht. Sie wird hervorgerufen durch den negativen induktiven Effekt des Sauerstoffatoms. Die Carbonylgruppe besitzt am Kohlenstoffatom elektrophile und am Sauerstoff nucleophile Eigenschaften. Die an die Carbonylfunktion gebundenen Acyl- und Alkylgruppen bestimmen die Polarität (Carbonylaktivität) und damit die Reaktivität des Esters.

Im Vergleich zu anderen Carbonylverbindungen weisen Ester eine mittlere Carbonylaktivität auf. Bei Abwesenheit eines Katalysators (Säure, Base oder Enzyme) zeigen sie im Wässrigen eine träge Reaktionsbereitschaft. Die Nucleophilie des Wassers ist so gering, dass der erste Schritt einer Solvolyse, die Addition des Nucleophils an des Carbonylkohlenstoffatoms, mit kaum messbarer Geschwindigkeit abläuft.

Sauer oder alkalisch katalysierte Hydrolysen verlaufen dagegen rasch. Der Mechanismus beider Solvolysearten ist in der Vergangenheit umfangreich untersucht worden (Loudon, 1988; Streitwieser, 1994). March gibt eine anschauliche Klassifikation der acht möglichen Mechanismen bei der alkalischen und sauren Esterhydrolyse. Es werden, in Abhängigkeit von der Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur des Alkoholrestes, die Alkylspaltung (S_N1 - oder S_N2 -Mechanismus) und Acylspaltung (S_N1 -Mechanismus oder Bildung eines tetraedrischen Intermediats) unterschieden (March, 1985).

2.1.2 Qualitative Parameter

Polare Substituenteneinflüsse werden durch Elektronegativitätsunterschiede zwischen den Elementen hervorgerufen und bestimmen so die Polarität der Bindung zwischen Substituent und Carbonylkohlenstoffatom. Induktive (I-) Effekte treten zwischen Bindungen mit sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen auf. Substituenten, die das Bindungselektronenpaar stärker anziehen als das Wasserstoffatom, entfalten einen -I-Effekt, umgekehrt einen +I-Effekt. Faktoren wie Ladung, Elektronegativität, Sättigungsgrad des Substituenten bestimmen die Stärke des Effektes.

Sind die Substituenten an sp^2 - oder sp -hybridisierte Kohlenstoffatome gebunden, so sind neben σ - auch π -Bindungen betroffen. Hier treten zusätzlich *Resonanzeffekte* (M-Effekt) auf. Ihre Größe wird neben Ladung und Elektronegativität vor allem durch die Fähigkeit des Substituenten zur inneren Mesomerie bzw. Resonanz bestimmt. Elektronenakzeptor-Substituenten (-I- und -M-Effekt) positivieren das Reaktionszentrum, stabilisieren Anionen und vergrößern die Reaktionsgeschwindigkeit, wenn im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion ein Anion entsteht. Damit ist die Bereitschaft eines Angriffs durch nucleophile Reagenzien erhöht.

Sterische Effekte werden durch voluminöse Substituenten hervorgerufen und beeinflussen vorwiegend in α -Position die Reaktivität der Carbonylfunktion (Barton et al. 1994). Mesomeriehemmung tritt auf, wenn die an der Konjugation beteiligten Atome gehindert werden, in einer Ebene zu liegen und damit der M-Effekt gemindert ist.

Wird das Reaktionszentrum durch benachbarte Substituenten sterisch abgeschirmt, verringert sich die Geschwindigkeitskonstante (F-strain-Effekt). Der B-strain-Effekt beschreibt mit der Beschleunigung bzw. die Vergrößerung der Geschwindigkeitskonstante durch sterische Spannungen im Edukt einen entgegengesetzten Effekt, der vor allem auf der dem Reaktionszentrum abgewandten Seite wirksam ist. Ein Maß für die ausgeübte Abschirmung ist die sterische Substituentenkonstante E_s . Je raumfüllender die Substituenten sind, um so negativer wird E_s und desto langsamer verläuft die Hydrolyse des entsprechenden Esters. Damit steigt der Wert für die Freie Reaktionsenthalpie ΔH^\ddagger , da Abstoßungskräfte auf dem Weg zum Übergangszustand überwunden werden müssen; die freie Aktivierungsenthalpie ΔS^\ddagger wird negativer. Beide Parameter bewirken über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung eine Erhöhung der Freien Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger .

Der Einfluss des *van der Waals Volumens* wurde anhand der Hydrolyse von Ethylestern diskutiert (DeTar, 1976 und 1976a; Moriguchi, 1977).

Nachbargruppeneffekte werden bei nucleophilen Substitutionsreaktionen, besonders bei Solvolysen, beobachtet. β -ständige Gruppen erhöhen im Vergleich zu unsubstituierten Verbindungen die Reaktionsgeschwindigkeit (anchimere Beschleunigung), die bei Reaktionen am Chiralitätszentrum häufig mit der Retention der Konfiguration einhergeht.

Stereo-elektronische Effekte treten insbesondere beim S_N2 -Mechanismus auf. Diese synchron ablaufende Hydrolyse ist gekennzeichnet durch einen acyclisch aktivierten Komplex. Die Freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger ist gering, wenn sich die Elektronen, die an der Produktbildung beteiligt sind, von der austretenden Gruppe abgewandten Seite nähern.

Die Ausbildung von polaren oder ionischen Übergangszuständen kann bei nucleophilen Substitutionsreaktionen durch *Solvatation* behindert werden. Die Struktur des Lösungsmittels korreliert mit den Geschwindigkeitskonstanten von nach dem S_N1 -Mechanismus verlaufenden nucleophilen Substitutionsreaktionen am gesättigten Kohlenstoff (Grunwald & Winstein, 1948).

2.1.3 Quantitative Parameter

Im Vordergrund der Betrachtungen steht die Theorie des Übergangszustandes. Der reaktivitätsbestimmende Parameter ist die Freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger . Sie bestimmt die Geschwindigkeitskonstante einer chemischen Reaktion. Die Gesetze der chemischen Kinetik, wie Arrhenius- und Eyring-Gleichung, beschreiben den Zusammenhang zwischen ΔG^\ddagger , Freier Reaktionsenthalpie $\Delta_R H^\ddagger$, Aktivierungsenergie E_a und -entropie ΔS^\ddagger sowie dem präexponentiellen Faktor der Arrhenius-Gleichung (A). A steht dabei für sterische Anforderungen beim Aufbau des Übergangszustandes (Ghanayem et al., 1985; Hansch & Leo, 1979; Wilson & Famini, 1991).

Der M-Effekt kann quantitativ mit Hilfe der *Hammett-Gleichung* beschrieben werden. Sie beschreibt die lineare Abhängigkeit zwischen logarithmierter Geschwindigkeitskonstante und Dissoziationskonstante einer chemischen Reaktion von *para*- oder *meta*-substituierten Benzderivaten in bezug auf die unsubstituierte Verbindung (Hammett, 1937). Induktive Substituentenkonstanten sind ein quantitatives Maß für den induktiven Effekt.

Gemäß der *Taft-Gleichung* gilt, dass Reaktionen mit positiven Reaktionskonstanten durch Substituenten mit -I-Effekt beschleunigt und mit +I-Effekt verlangsamt werden und kennzeichnen den Einfluss α -ständiger Substituenten auf die Reaktivität aliphatischer Verbindungen (Taft, 1952).

2.2 Klassifizierung esterspaltender Enzyme

Carboxylester spaltende Enzyme werden den Hydrolasen zugeordnet und werden gemäß dem *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB, 2002) in der Enzym-Klasse EC 3.1 „Esterbindungen spaltende Enzyme“ zusammengefasst. Hydrolasen kommen beim Menschen und Säugetier ubiquitär in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten vor. Sie weisen eine breite, sich oftmals überschneidende Substratspezifität und hydrolytische Aktivität auf (Mentlein & Heymann, 1984; Indou et al., 1980). Eine hohe Aktivität besitzen Leber, Niere, Blut, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Gehirn und Pankreas (Buchwald & Bodor, 2000; Satoh & Hosokawa, 1998; Silverman, 1999). Wichtige Vertreter dieser Enzymklasse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Auswahl der wichtigsten esterspaltenden Hydrolasen

Gruppe	EC Nr.	Systematischer Name gemäß NC-IUBMB (2002)	Trivialnamen (Auswahl)	Vorkommen	Typische Substrate
Esterasen	3.1.1.1	Carboxylesterase	unspezifische Carboxylesterase, Aliesterase, B-Esterase	menschliche und tierische Gewebe, überwiegend in Leber und Blut	aliphatische Ester mit geringem Molekulargewicht; xenobiotische Ester
	3.1.1.2	Arylesterase	Arylesterhydrolase, A-Esterase	Plasma und Erythrozyten	aromatische Ester
	3.1.1.6	Acetylesterase	Acetylesterase, C-Esterase	menschliche und tierische Gewebe	Acetylester
Lipasen	3.1.1.3	Triacylglycerollipase	Lipase, Triglyceridlipase	menschliche und tierische Gewebe, überwiegend in Pankreas	Ester mit höherem Molekulargewicht; wasserunlösliche und an Supramoleküle ¹ gebundene Fettsäureester; Triglyceride; Lipidmobilisation in Säugetierzellen; Hydrolyse und Resorption von Fettsäureestern aus der Nahrung in den Blutkreislauf
	3.1.1.13	Sterolesterase	Cholesterylesterase, Acetylcholinlipase	Pankreas und Leber	Hydrolyse und Resorption von Fettsäureestern aus der Nahrung in den Blutkreislauf; Lipoproteinmetabolismus; Sterolester
	3.1.1.34	Lipoproteinlipase	Diglyceridlipase, Clearingfaktor	menschliche und tierische Gewebe, Herz und adipöses Gewebe	adipöse Aufnahme von Fettsäuren; an Proteine gebundene neutrale Triglyceride
Cholinesterasen	3.1.1.7	Acetylcholinesterase	Echte Cholinesterase, Cholinesterase I	menschliche und tierische Gewebe, neuronales Gewebe und Erythrozyten	Acetylcholin; Acetyl- α -methylcholin und andere Acetylester
	3.1.1.8	Butyrylcholinesterase	Pseudo- oder unspezifische Cholinesterase, Cholinesterase II	menschliche und tierische Gewebe, Blutplasma	xenobiotische Ester im Blut, Cholinester

Quelle: Quinn (1999), Schomburg & Salzmann (1991), Walker (1985), Williams (1985)

¹ z.B. Lipoproteine, Eiweiße, Micellen, Membranen, intrazelluläre Lipideinschlüsse

Die Esteraseaktivität von Proteinen am Beispiel von Albumin in Humanplasma gegenüber Phenylestern beschreiben Means & Bender (1975), Ohta et al. (1983) sowie Rainsford et al. (1980). Neben der Esterspaltung katalysieren Hydrolasen auch den enzymatischen Abbau von Peptiden, Amiden und Halogeniden. Die Tatsache, dass diese Enzyme sowohl Ester- als auch Nicht-Esterbindungen spalten können, weist auf die Problematik einer systematischen Klassifikation hin.

Als veraltet gelten daher die von Aldridge (1953) und Augustinsson (1963) beschriebenen Klassifizierungen. Sie werden der breiten und sich überlappenden Substratspezifität der Esterasen nicht gerecht. Die Klassifikation nach Aldridge basiert auf der Interaktion von Enzym und Organophosphaten. Dieser einfache Ansatz teilt die Esterasen in *A-Esterasen* (hydrolysieren Organophosphate), *B-Esterasen* (Inhibierung durch irreversible Phosphorylierung der Serin-Hydroxyl-Gruppe im aktiven Zentrum) und *C-Esterasen* (keine Wechselwirkung) ein. Augustinsson unterteilte die Hydrolasen in *Aliesterasen* (aliphatische Substrate), *Arylesterasen* (aromatische Substrate) und *Cholinesterasen* (Cholinester).

Junge zeigte bereits 1973, dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen Ali- und Arylesterasen nicht möglich ist. Walker & Mackness (1989) diskutierten die Fragestellung, wie aktiv die hydrolytische Aktivität eines Proteins sein muss, um als Esterase bezeichnet zu werden. Sie empfehlen eine neuartige Einordnung, die auf den Eigenschaften der aufgereinigten Enzyme in Verbindung mit ihrem Vorkommen in verschiedenen Spezies basiert.

Williams (1985) klassifizierte die Esterasen in *Cholin-*, *Carboxyl-* und *Arylesterasen*. Darüber hinaus wird zwischen der Hydrolyse durch Carboxylesterasen (Arylesterasen und Cholinesterasen) und Lipasen (Acetylersterasen und Acetylcholinesterasen) unterschieden. Eine der jüngsten Esterase-Klassifizierungen stammt von Satoh & Hosokawa (1998). Sie legen drei „Hauptfamilien“ für esterspaltende Enzyme fest: *Phospholipasen* (maximale Aktivität bei neutralem pH-Wert sowie Aktivierung durch Calciumionen und Lewis-Säuren), *α/β -Hydrolasen* (Serin-Esterase mit Serin, Histidin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure im aktivem Zentrum) sowie *Säure-Lipasen* (Lysosome der Zellen in Magenflüssigkeit, Maximalaktivität bei pH 2 bis 5, Thiofunktion von Cystein im reaktiven Zentrum). Die weiterführende Differenzierung anhand von Unterfamilien basiert auf der Identifizierung der Aminosäuresequenz von Isoenzymen sowie auf einer speziesabhängigen Unterteilung.

In den letzten Jahren hat sich in der Literatur die NC-IUBMB -Nomenklatur (2002) zu Recht durchgesetzt. Sie verbindet eine numerische Systematik mit einer der Substratstruktur entlehnten Bezeichnung und wird entsprechend in dieser Arbeit angewendet.

2.3 Zum Metabolismus von Carbonsäureestern

Der Metabolismus von exogenen Verbindungen hängt vom Aufnahmeweg der Substanzen ab. Neben der Verwendung in Lebensmitteln werden Ester in kosmetischen Mitteln als duftgebende Komponenten eingesetzt. Vorkommen und Verwendung der für diese Studie relevanten Verbindungen zeigt Anhang I (Tab. 27 und Tab. 28). Carbonsäureester, die über kosmetische Mittel auf die Haut gelangen, können durch die Epidermis diffundieren oder durch Schweißdrüsen und Haarbälge in den Organismus eindringen.

Das Haupthindernis dabei ist die Hornschicht der Oberhaut (*Stratum corneum*), die nur einen geringen Wasseranteil besitzt und so vornehmlich für lipophile Verbindungen, wie etwa Carbonsäureester, durchlässig ist. Wegen der Dicke der Hornhaut (ca. 10 µm) werden diese Stoffe nur sehr langsam aufgenommen (Dekant & Vamvakas, 1994). Wir setzen in unserer Studie voraus, dass die relevanten Verbindungen im wesentlichen über Nahrungsmittel, also über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden.

Carbonsäureester werden wie alle lipophilen Substanzen schlecht ausgeschieden. Nach der Aufnahme werden sie größtenteils mit dem Blut über die Pfortader direkt zur Leber transportiert. Die Epithelzellen der Darmwand und der Leber besitzen in hohem Maße die Fähigkeit, Fremdstoffe umzuwandeln und abzubauen (*first pass effect*). Erst nach dem Passieren der Leber gelangen die Stoffe oder ihre Stoffwechselprodukte über den Blutkreislauf zu den verschiedenen Organen. Im Magen-Darm-Trakt erfolgt die Resorption über Membranen, die primär für lipophile Substanzen passierbar sind. Der Transport in Blutkapillaren und Membranen geschieht passiv entlang eines Konzentrationsgefälles und wird zusätzlich durch Poren und Carriermoleküle erleichtert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Carbonsäureestern erfolgt die Interaktion an Membranen hauptsächlich durch Serumalbumine und Lipoproteine (Bird et al., 1996). Verschiedene enzymatische Systeme katalysieren die metabolische Umwandlung in wasserlösliche Verbindungen, wodurch die Ausscheidung über den Harn beschleunigt wird. Enzymatisch katalysierte Hydrolysereaktionen setzen den korrespondierenden Alkohol und die Carbonsäure frei. Die wichtigsten freisetzenden Gewebe dabei sind Leber, Niere, Blut, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Gehirn und Pankreas (Buchwald & Bodor, 2000; Satoh & Hosokawa, 1998; Silverman, 1999).

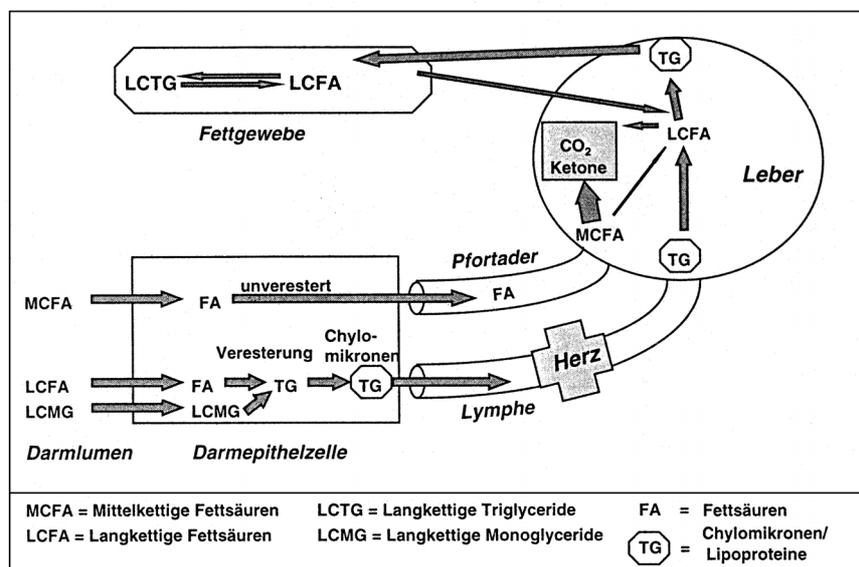


Abb. 1: Metabolismus der kurz- und mittelkettigen Fettsäuren im Vergleich zu dem der langkettigen (nach Jahreis & Bochmann, 1998)

Hydrolasen werden der Phase I des Fremdstoffmetabolismus zugerechnet (Dekant & Vamvakas, 1994; Schäfer & Marquardt, 2004). Die Esterhydrolyseprodukte werden nach dem Durchlaufen des Phase II - Metabolismus ausgeschieden. Der Metabolismus des Acylrests ist

abhängig von der chemischen Struktur der jeweiligen Carbonsäure. Jahreis und Bochmann (1998) beschreiben Transport und Resorption hydrophober, langkettiger Fettsäuren (> 10 C-Atome) sowie kurz und mittelkettiger Fettsäuren (Abb. 1).

Im ersten Schritt werden Carbonsäuren von den freisetzenden Geweben an das Blut abgegeben und an Serumalbumin gebunden. Nach der enzymatischen Aktivierung im Cytoplasma werden die Fettsäuren der β -Oxidation in den Mitochondrien zugeführt. *Linear geradkettig unverzweigt gesättigte Fettsäuren* werden dabei durch sukzessive Acetyl-CoA-Abspaltung abgebaut, das anschließend dem Tricarbonsäurecyclus zugeführt wird. Bei *ungeradkettigen Fettsäuren* verbleibt ein Propionyl-CoA, das in freies Succinat überführt wird und ein Intermediat der Tricarbonsäurecyclus darstellt. Die Metabolisierung von ungesättigten Fettsäuren mit *cis*-Konfiguration erfordert die reversible Umlagerung durch Enoyl-CoA-Isomerase.

Kurz- und mittelkettige Fettsäuren werden unverestert zur Leber transportiert und dort Carnitin-unabhängig oxidiert, woraus eine schnelle Plasmaclearance resultiert. *Langkettige Fettsäuren* werden dagegen in Darmzellen zu Triglyceriden umgesetzt. Sie gelangen durch Assoziation mit Chylomikronen über die Lymphe in die Leber. Nach partieller Oxidation wird der Hauptteil in Lipoproteinen reassimiliert und zwecks Deposition im Fettgewebe gespeichert (Abb. 1).

Ein Schwerpunkt unserer Studie ist die Bewertung der Hydrolysierbarkeit verschiedener Fettsäureethylestern (FAEE), die als Aromastoffe eingesetzt werden. Sie stellen wichtige endogene Stoffwechselprodukte des oxidativen und non-oxidativen Ethanolstoffwechsels dar (Abb. 2). In der Regel findet der oxidative Weg über die Acetat- und weiter Acetyl-CoA-Bildung statt. Letzteres wird anschließend zur Energiegewinnung in den Tricarbonsäurecyclus eingeschleust. Die Phosphatidylethanol-Bildung über den beschriebenen nicht-oxidativen Weg ist als Alkoholismus-Marker bei übermäßigem Alkoholkonsum von Bedeutung und wird an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt (Aleryani, 1996; Gorski, 1996; Haber, 1993). Heute werden FAEE als Ursache alkoholinduzierter Organschäden vor allem an Pankreas, Leber und Herz angesehen. Schädigungen können durch Einlagerung von FAEE in biologische Doppelmembranen eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung auslösen, zur Erhöhung der Lysosomenfragilität beitragen sowie die Hemmung der Proteinsynthese und Zellwucherungen bewirken (Lange, 1981; Hungund et al., 1988; Gorski, 1996; Haber, 1993; Hungund, 1988; Laposata, 1999).

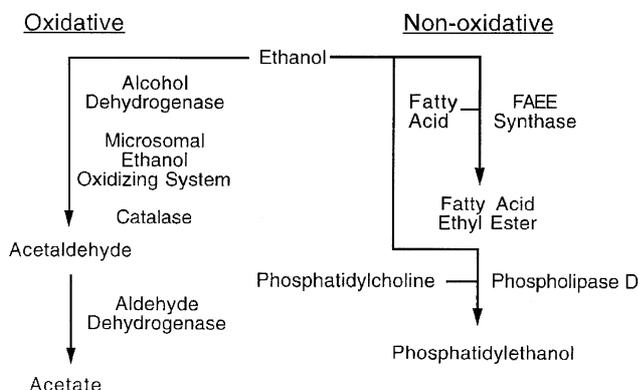


Abb. 2: Oxidativer und nicht-oxidativer Ethanolmetabolismus beim Menschen (nach Laposata, 1997)

Als Acylrest für endogen gebildete Ethylester wurden überwiegend Öl-, Palmitin- und Stearinsäure, in geringerer Konzentration Linol- und Arachidonsäure nachgewiesen (Bernhardt et al., 1996; Bird et al., 1999; Dan & Laposata, 1997; Doyle et al., 1994 und 1996). Die Präferenz zur Synthese von Ethylestern mit Öl- und Linolsäure im Acylrest wurde von Hungund et al. (1988) beschrieben. Besonders nach erhöhtem Alkoholkonsum werden FAEE durch Wirkung spezifischer Synthesen und unspezifischer Esterasen aus Ethanol, freien Fettsäuren, Phospholipiden und Triglyceriden gebildet (Saghir et al., 1999).

FAEE sind stark lipophile Verbindungen, die eine geringe Löslichkeit im wässrigen Medium besitzen. Sie zirkulieren überwiegend an Phospholipide (LDL), Triglyceride, Cholesterinester oder in geringerem Maße an Albumin gebunden im Blutkreislauf (Doyle et al., 1994; Laposata et al., 1995; Szczepiorkowski et al., 1995; Teruya et al., 1995). Auf zellulärer Ebene wurden Wechselwirkungen zwischen Ethylestern und Zellmembranen nachgewiesen. Die dabei stattfindende Ausrichtung des polaren Alkylrestes hin zum wässrigen Medium gewährleistet eine Orientierung der Ester-carbonylfunktion in die für Esterasen favorisierte Position, so dass die esterasekatalysierte Hydrolyse an der Lipid-Wasser-Grenzfläche stattfinden kann (Bird et al., 1999). Neben den Isoformen der cytosolischen und mikrosomalen FAEE-Synthase besitzen die unspezifische Lipoprotein-Lipase, Carboxylesterase, Carboxylester-Lipase und Cholesterin-Lipase Synthaseaktivität. Sie sind überwiegend in Leber, Pankreas, Fettgewebe, verschiedenen Hirnregionen und Leukozyten lokalisiert (Aleryani et al., 1996; Gorski, 1996; Laposata, 1999; Manautou & Carlson, 1991). Für hochgereinigte FAEE-Synthase beim Menschen wurde eine spezifische Aktivität von $40 \pm 2,5 \mu\text{mol} / \text{min} \text{g Protein}$ nachgewiesen (Riley et al., 1990). Abb. 3 zeigt eine mit zunehmender Carbonsäure-Konzentration zunehmende FAEE-Synthaseaktivität des hochgereinigten Enzyms. Ein Abfall der Enzymaktivität wurde nach dem Erreichen der optimalen Substratkonzentration für Linolen- und Ölsäure ab ca. 1 mM beobachtet.

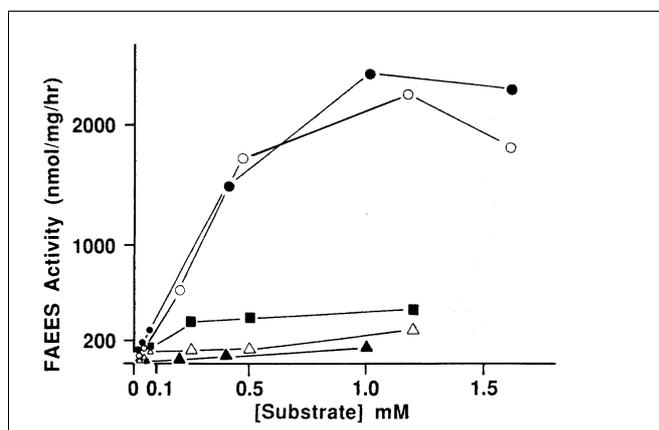


Abb. 3: FAEE-Synthaseaktivität bei der Bildung von Ethylestern (nach Riley et al., 1990)

(●) Linolensäure; (○) Ölsäure, (■) Arachidonsäure, (Δ) Palmitinsäure, (▲) Stearinsäure; Reaktionsbedingungen: 37°C, 1.5 M Ethanol in Phosphat-Puffer (60 mM; pH 7,2)

Weibliche Probanden zeigten gegenüber männlichen bei identischer Ethanol-Aufnahme eine signifikant höhere endogene FAEE-Konzentration (Soderberg, 1999). Diese geschlechts-spezifischen Unterschiede beruhen auf dem bei Frauen verminderten *first-pass-Metabolismus*, woraus ein erhöhter Transport von Ethanol vom Gastrointestinaltrakt ins Blut resultiert. Die

Wiederveresterung der freien Fettsäuren (FFA) zu Phospholipiden und Triglyceriden erfolgt im Körper für gewöhnlich rasch; nach ca. 3 Stunden waren 90 % der FFA umgesetzt (Szczepiorkowski et al., 1995). Hungund et al. (1995) ermittelten in Rattenplasma für Ethyllineolat nach 10 min eine *in vivo* und *in vitro* Umsatzrate von 75 % und 99 %. FAEE werden auch im adipösen Gewebe gespeichert und schrittweise in den Blutkreislauf abgegeben. Auf diese Weise können Fettsäureethylester längere Zeit im Körper zirkulieren (Saghir et al., 1997). Laposata et al. (1989) bestimmten im Fettgewebe von Ratten eine Halbwertszeit von $16 \pm 1,6$ Stunden.

Verschiedene Studien zeigen eine Korrelation von Ethanolaufnahme und FAEE-Synthese. Die *in vivo* Studie von Dan & Laposata 1997 illustriert die FAEE-Bildung beim Menschen. Die Ethanolaufnahme bis zu einer Konzentration im Vollblut von 0,12-0,15 g% (26-33 mM) führte zu einer mittleren FAEE-Konzentration von 1,8 μM FAEE im Serum. Doyle et al. (1994 und 1996) stellten 2 Stunden nach der Ethanolaufnahme (0,07 - 0,10 g% Vollblut) eine FAEE-Konzentration von durchschnittlich 0,30 μM im Blut fest. Die Ethanolaufnahme durch Probanden bis zu einer Konzentration von 26-32 mmol/L Vollblut führte nach 100 min zu einer maximalen Serum-FAEE-Konzentration zwischen 1,25 und 3 μM . In Humanserum wurde *in vivo* für FAEE eine Eliminations-Halbwertszeit von 173 min sowie eine terminale Halbwertszeit von 693 min bestimmt.

2.4 Verlauf der enzymatisch katalysierten Esterhydrolyse

2.4.1 Mikroskopische Betrachtung

Der mikroskopische Ansatz befasst sich mit der Beschreibung von mechanistischen und intermolekularen Aspekten beim Ablauf einer enzymkatalysierten Reaktion. Die *nichtenzymatische und säurekatalysierte Esterspaltung* verläuft in Abhängigkeit von der Molekülstruktur als nucleophile Substitutionsreaktion unter Acyl- oder Alkylspaltung (Abb. 4). Die chemische Struktur der Acyl(R^1)- und Alkyl(R^2)-Reste des Esters bestimmen den Ablauf der Hydrolyse als mono- ($\text{S}_{\text{N}}1$) oder bimolekulare ($\text{S}_{\text{N}}2$) nucleophile Substitution.

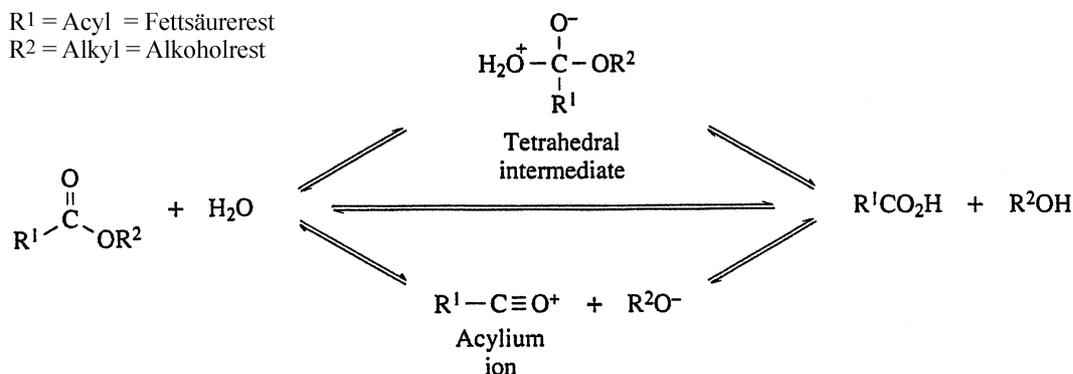


Abb. 4: Schematische Darstellung der esteraseskatalysierten Hydrolyse von Carbonsäureestern (nach Quinn et al., 1999)

Vom Methyl- zum tert-Butylsystem im Alkyl-Rest wächst die Tendenz zur S_N1 -Reaktion unter Spaltung der Alkyl-Sauerstoff-Bindung. Im Übergangszustand (ÜZ) erfolgt hier die Bildung eines Acylium-Ions. In entgegengesetzter Richtung steigt die Tendenz zur Spaltung der Acyl-Sauerstoff-Bindung unter Bildung eines tetrahedralen Intermediats. Dieser S_N2 -Mechanismus läuft bevorzugt bei primären oder sekundären Alkyl-Resten ab. Unabhängig von strukturellen Eigenschaften der Substituenten muss berücksichtigt werden, dass beim natürlichen Metabolismus exogener oder endogener Esteremoleküle tertiäre Alkyl-Reste nur von untergeordneter Bedeutung sind (Baton & Ollis, 1979; Beyer & Walter, 1984; March, 1985; Trotta, 1995).

Mechanistische Aspekte der *esterasekatalysierten Hydrolyse* wurden anhand verschiedener Modelle interpretiert, die im Zusammenhang mit der nichtenzymatischen Säurekatalyse zu betrachten sind und Grenzfälle darstellen. In der Zelle findet ein Mechanismus statt, der als Mischform der beschriebenen Reaktionsverläufe anzusehen ist. Intermolekulare Aspekte der Hydrolyse wurden nach Quinn et al. (1999) als Acyl-Enzym-Mechanismus dargestellt. Die Reaktion verläuft gemäß Abb. 5 in drei aufeinander folgenden Stufen: nichtkovalente Enzym-Substrat-Bindung, Acylation und Deacylation (Williams, 1989; Greenzaid, 1971).

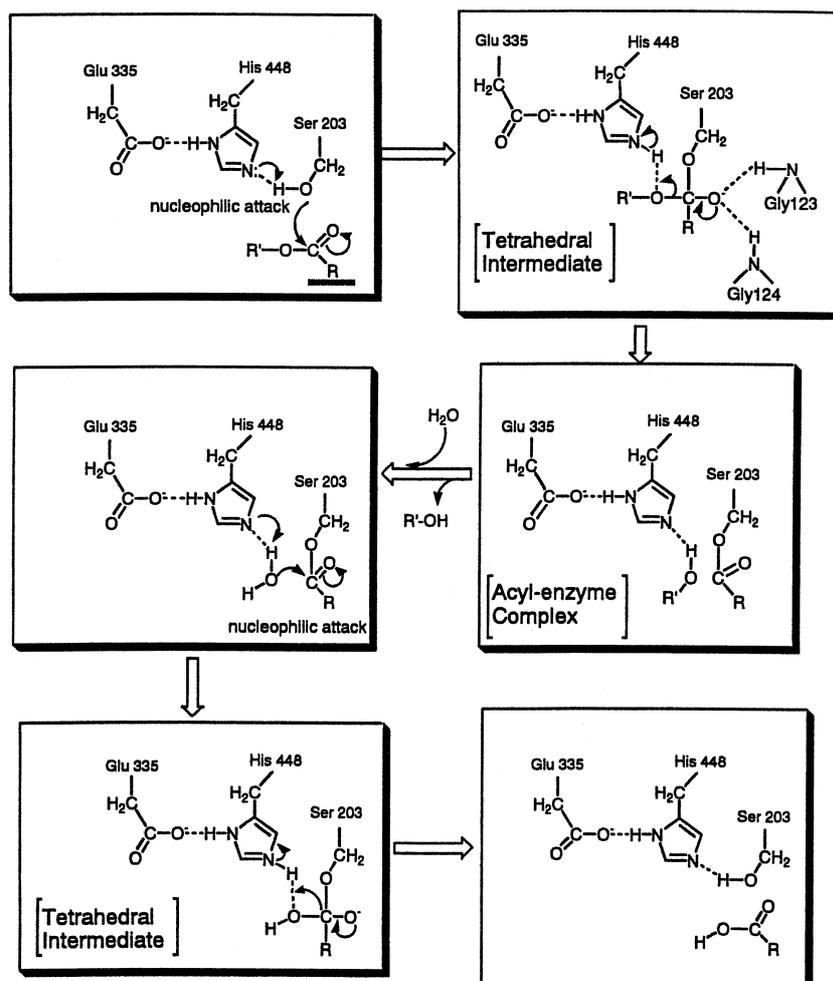


Abb. 5: Mechanismus der Esterhydrolyse durch Carboxylesterase EC 3.1.1.1 (nach Satoh & Hosokawa, 1998)

Der substantielle Nachweis von Acylierung und Deacylierung wurde erstmals durch Froede und Wilson (1984) geführt. Beide Reaktionsstufen durchlaufen den energiereichen Übergangszustand des tetrahedralen Intermediats, der in der Regel mit gleichen Anteilen am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion beteiligt ist (McClelland, 1983; Niyaz Khan, 1982). Das reaktive Zentrum der Esterasen stellt eine hydrophobe Tasche dar, deren Aminosäuren in einer stark apolaren Umgebung eingebettet sind, so dass die Reaktion praktisch im wasserfreien Milieu abläuft.

Abb. 5 zeigt, dass die katalytische Wirksamkeit auf der Funktion der Aminosäuren Serin-Glutaminsäure-Histidin in Verbindung mit vier Cystein-Resten, welche die spezifischen Disulfid-Brücken ausbilden, beruht (Buchwald & Bodor, 1999; Provencher et al., 1994 und 1994a; Toone et al., 1990). Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit werden durch induktive und sterische Effekte sowie durch die Hydrophobizität der Abgangsgruppe bestimmt (Järv et al., 1976). Im ersten Reaktionsschritt des konzertiert ablaufende Mechanismus findet eine Protonenübertragung vom Serin (Ser203) auf den Histidinrest (His448) statt. Der damit verbundene nucleophile Angriff am Carbonylkohlenstoff des Esters führt zur Ausbildung des tetrahedralen Intermediats. Der Übergangszustand wird dabei durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Carboxylat-Anion und dem Imidazol-Kation am Histidin-Rest, in Verbindung mit Wasserstoffbrückenbindung zu peptidischen Glycinresten (Gly123 und Gly124) stabilisiert. Aus dem tetrahedralen Intermediat bildet sich der Acyl-Enzym-Komplex, indem der protonierte Histidinrest ein Wasserstoffatom abgibt und im Anschluss der Alkohol als erstes Hydrolyseprodukt abgespalten wird (Acylation). Die Deacylation führt unter dem Einfluss eines Wassermoleküls über einen inversen Weg zur Abspaltung der Carbonsäure.

Starke Abgangsgruppen bedingen den konzertierten Verlauf des Protonentransfers sowie die Bildung der neuen Carbonylfunktion (Lensink, 1999). Serin und Histidin fungieren als nucleophiles säure-base-katalysierendes Element. Wasser kann als Reaktionsmedium Substrat und Produkt gleichermaßen sein. Es ist an der Ausbildung aller nicht-kovalenten Bindungen beteiligt. Sein pH-Wert stabilisiert die charakteristische Proteinstruktur des Enzyms. Wasser stört gleichermaßen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, garantiert die Reagenzdifusion und ist beteiligt an der Einstellung der Gleichgewichtskonstanten der chemischen Reaktion (Goldberg, 1990).

2.4.2 Phänomenologischer Ansatz

Die phänomenologische oder auch makroskopische Betrachtung des Reaktionsverlaufes lässt mechanistische Aspekte während des Reaktionsablaufs außer acht. In Abhängigkeit von der *Molekularität* und *Reaktionsordnung* der enzymatischen Reaktion werden theoretische Größen zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit abgeleitet.

Die *Molekularität* beschreibt die Anzahl der Moleküle, die an der Bildung des aktivierten Komplexes beteiligt sind bzw. die Anzahl der Moleküle, die miteinander reagieren müssen, damit das Reaktionsprodukt entsteht. Die *Reaktionsordnung* leitet sich aus der Stöchiometrie der Gesamtreaktion in Verbindung mit dem Zeitgesetz ab, welches die beste Näherung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs beschreibt. Aus der Stöchiometrie gemäß Abb. 4 geht hervor, dass Wasser als Lösemittel an der Gesamtreaktion und an der Ausbildung der Solvathülle des akti-

vierten Komplexes beteiligt ist. Wasser liegt in großem Überschuss vor; seine Konzentration bleibt während des gesamten Reaktionsverlaufs praktisch konstant.

Die esterasekatalysierte Esterspaltung ist somit eine *Einsubstrat-Reaktion pseudomolekulare Reaktion erster Ordnung*, bei der aus einem Substrat zwei Produkte entstehen (Buddecke, 1994; Holzhauer, 1995). Reaktionen erster Ordnung sind gekennzeichnet durch die direkte Proportionalität der Reaktionsgeschwindigkeit (dS/dt) zur Konzentration der Ausgangsstoffe (S).

$$\frac{dS}{dt} = -k \cdot S$$

$S(t)$ Substratkonzentration zu einer beliebigen Zeit t
 k Geschwindigkeitskonstante der Reaktion
 t Reaktionszeit

Durch Integration lässt sich bei bekannter Ausgangskonzentration (S_0) zum Zeitpunkt $t = 0$ (Startzeitpunkt) die Konzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt (t) ermitteln.

$$-\int_{S_0}^S \frac{dS}{S} = k \int_{t_0}^t dt$$

$$-\ln \frac{S}{S_0} = kt$$

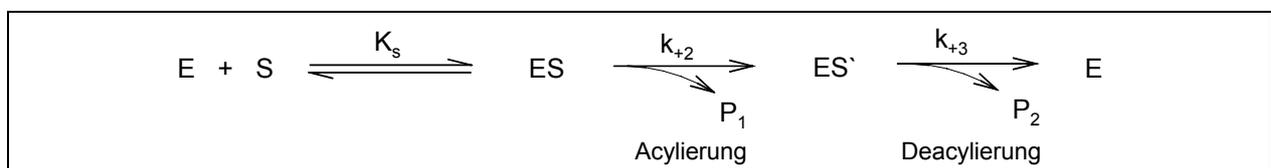
S_0 Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_0
 t_0 $t = 0$ (Startzeit der Reaktion)

Die Delogarithmierung des Integrationsergebnisses führt letztlich zur bekannten Form des Konzentrations-Zeit-Gesetzes 1. Ordnung:

$S = S_0 \cdot e^{-kt}$

S_0 Substratanfangskonzentration (Gleichung 1)

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratumsetzung wird als Abnahme der Substratkonzentration dargestellt und hat allgemeine Bedeutung für die Ausscheidung von endogenen und exogenen Substanzen. Die phänomenologische Darstellung der homogenen Esterhydrolyse als Gesamtreaktion leitet sich in Anlehnung an Abb. 5 wie folgt ab:



E (Enzym), S (Substrat), P₁ (Produkt 1, Alkohol), P₂ (Produkt 2, Säure), ES (Enzym-Substrat-Komplex), ES' (Acyl-Enzym-Komplex), k₂' (Geschwindigkeitskonstante Acylierung), k₃ (Geschwindigkeitskonstante Deacylierung), K_s (Dissoziationskonstante)

Abb. 6: Phänomenologische Betrachtung einer esterasekatalysierten Esterhydrolyse

Die Geschwindigkeitskonstanten für Acylierung und Deacylierung (k_{+2} und k_{+3}) sind annähernd gleich groß und damit gleichermaßen geschwindigkeitsbestimmend. Enzyme mit Histidin im

aktiven Zentrum zeigen Konzentrationsabstufungen für die Reaktionsgeschwindigkeit. Für verschiedene Substratanfangskonzentrationen wurden unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, da jedes Enzym für ein umzusetzendes Substrat eine spezifische Affinität besitzt (Buddecke, 1994; Kleber & Schlee, 1987; Lehninger, 2001). Der Einfluss der Substratsättigung auf die Geschwindigkeit von Reaktionen erster Ordnung zeigt Abb. 7.

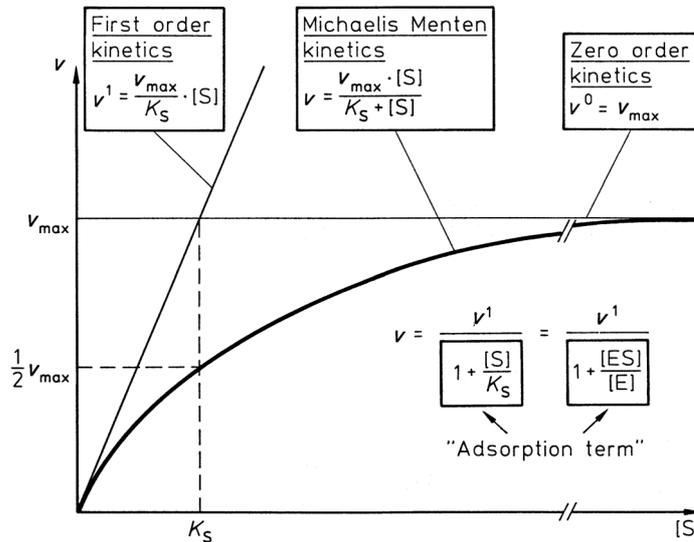
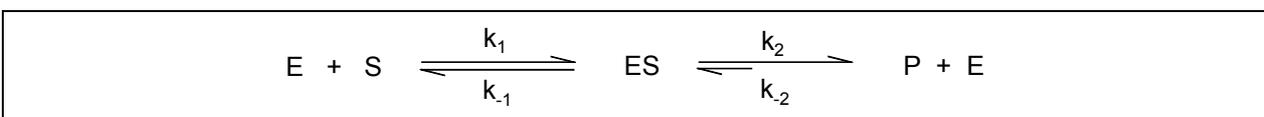


Abb. 7: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit $[v]$ von der Substratanfangskonzentration $[S]$ (nach Drauz & Waldmann, 1995)

Im Bereich einer geringen Substratanfangskonzentration S_0 verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit v_0 proportional zu S_0 . Im weiteren Verlauf geht die Hydrolyse in eine „Reaktion gemischter Ordnung“ über (v_0 steigt langsamer als S_0). Bei weiterem Konzentrationsanstieg nähert sich v_0 schließlich asymptotisch einem konstanten Wert und ist damit konzentrationsunabhängig. Das Enzym ist nun substratgesättigt. In Bezug auf das Substrat spricht man von einer Reaktion nullter Ordnung. Alle Enzyme weisen diesen Sättigungseffekt auf. Die Konzentration, ab der bei einem Enzym Substratsättigung oder -hemmung einsetzt, ist eine substratspezifische Kenngröße, die von anderen Reaktionsparametern wie Temperatur und pH-Wert beeinflusst wird. Zerfällt der Enzym-Substrat-Komplex sehr schnell, ist dieser Schritt nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend und Substratsättigung wird nicht beobachtet.

1902 beschrieben Brown und Henri diesen Effekt unabhängig voneinander und postulierten die Enzym-Substrat-Wechselwirkung als reversible Reaktion, die unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes stattfindet. Michaelis und Menten erweiterten diese Theorie 1913 mit der Formulierung einer Gleichgewichtsreaktion für die enzymatische Katalyse einer Ein-Substrat-Reaktion und leiteten folgenden einfachen Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit ab:



Reaktanten: E (Enzym), S (Substrat), ES (Enzym-Substrat-Komplex), P (Produkt), Geschwindigkeitskonstanten: k_1 (Bildung von ES), k_{-1} (Zerfall von ES), k_2 (Bildung von P); k_{-2} (Rückbildung von ES aus E und P)

Abb. 8: Schema für die Ein-Substrat-Reaktion nach *Michaelis-Menten*

Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes und damit die Produktbildung angesehen. Auf dieser Grundlage gaben Briggs und Haldane 1925 eine allgemeine Formulierung für die Geschwindigkeitsgleichung mit der Annahme eines stationären Zustandes (*steady-state*) an, in dem die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes $[ES]$ konstant ist bzw. die Änderung seiner Konzentration mit Null angenommen wird. Als Voraussetzung für die Einstellung des *steady-state* muss die Anfangssubstratkonzentration S_0 deutlich größer sein als die des Enzyms ($S_0 \gg E$), so dass der Anteil des enzymgebundenen Substrats vernachlässigbar klein ist.

Die enzymkatalysierte Reaktion verläuft wie folgt in drei Phasen: pre-steady-state, steady-state sowie post-steady-state (Belitz et al., 2001): Das Enzym E reagiert intermediär mit dem Substrat S zu $[ES]$. **Der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes unter Freisetzung des Reaktionsprodukts [P] stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.** Die Geschwindigkeitsgleichung nach *Michaelis-Menten* beschreibt eine mathematische Beziehung zwischen Initialgeschwindigkeit v_i [*Änderung der Konzentration je Zeiteinheit*] und Substratkonzentration S_0 [*mol /L*] für die enzymkatalysierte Einsubstratreaktion auf Basis des Massenwirkungsgesetzes. Die kinetische Betrachtung von Rohpräparaten oder biologischem Material haben Michaelis und Menten durch eine Grenzwertbetrachtung das Geschwindigkeitsgesetz relativiert:

$$v_i = \frac{V_{\max} \cdot S_0}{K_m + S_0}$$

Michaelis-Menten-Gleichung

(Gleichung 2)

Ist S_0 so hoch, dass das Enzym gesättigt ist, das heißt im wesentlichen in $[ES]$ gebunden vorliegt, so wird die maximale Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion erreicht:

$$V_{\max} = k_{+2} \cdot E_0$$

Für den speziellen Fall $v_i = \frac{1}{2} V_{\max}$ gilt $K_m = S$. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m entspricht somit jener Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. **Der K_m -Wert hat die Dimension einer Konzentration [mol /L] und ist unabhängig von der Enzymkonzentration.** Aus der hyperbelförmigen Korrelation zwischen v_i und S_0 gemäß Abb. 7 ($E_0 = \text{konstant}$) resultiert, dass nur für sehr geringe Substratkonzentrationen ($v_i \approx S_0$) eine Reaktion erster Ordnung vorliegt. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führt zu der beschriebenen asymptotischen Annäherung von $v_i \rightarrow V_{\max}$. Der Übergang in eine Reaktion nullter Ordnung setzt erfahrungsgemäß bei Konzentrationen $> 5K_m$ ein (Rapoport, 1987).

Der hier beschriebene homogene Reaktionsablauf gilt nicht für Substrate, die sehr schwer oder nicht wasserlöslich sind. Die heterogene Esterhydrolyse ist typisch für durch Lipasen katalysierte Reaktionen. Lipasen sind Esterasen, die eine Spaltung von Estern mit hoher Hydrophobizität katalysieren (Goto, 2000). Das Substrat wird an die Lipid-Wasser-Grenzfläche sogenannter Supramoleküle gebunden. Abb. 9 zeigt die dafür erforderliche Erweiterung des *Michaelis-Menten*-Modells.

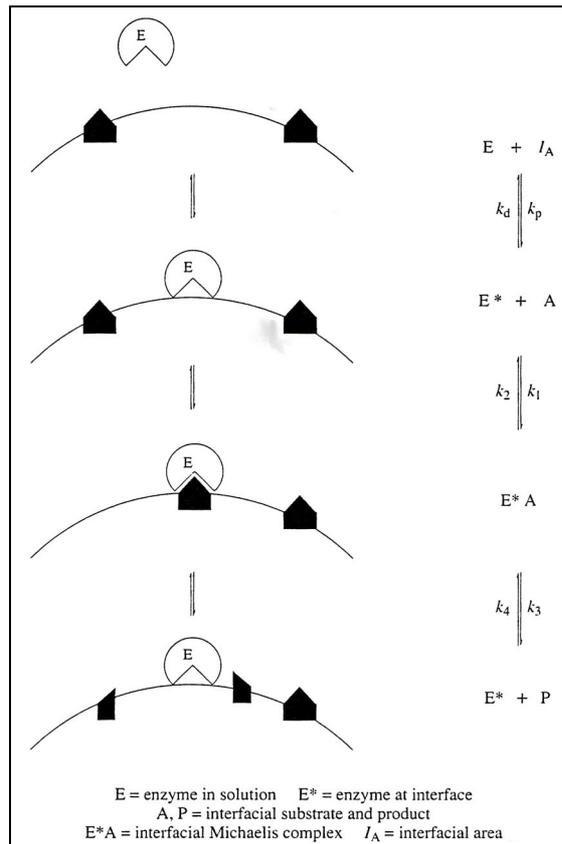


Abb. 9: Heterogene Esterhydrolyse durch Lipasen nach *Michaelis-Menten* (Quinn et al., 1999)

Dazu müssen die Parameter Oberfläche der Enzym-Interface-Wechselwirkung, Substratkonzentration je Oberfläche sowie Reaktionsvolumen berücksichtigt werden. Das Interface symbolisiert hier das Supramolekül, an das der Ester gebunden wird. Das Enzym bindet spezifisch an Trägermolekül und Substrat. Diese Wechselwirkung optimiert die katalytische Funktion und Umsatzrate des Enzyms. Enzym-Substrat-Bindung und der Substratabbau laufen im Vergleich zur Interface-Substrat-Bindung und Substratnachlieferung schneller ab, so dass Substratsättigung bei diesem Reaktionsmodell nicht erreicht werden kann ($k_1 > k_2$).

2.5 Pharmakokinetische Parameter

Die Kinetik beschreibt den zeitlichen Ablauf der Umsetzung eines Substrates. Durch Anwendung von mathematischen Methoden auf beobachtete Messwerte lassen sich charakteristische Größen der Umsetzung bestimmen. Messwerte sind in Abhängigkeit von der Zeit ermittelte Konzentrationen einer durch die Reaktion gebildeten oder umgesetzten Komponente.

2.5.1 Spezifische Hydrolyseaktivität

Die Umsatzrate der enzymkatalysierten Carbonsäureesterhydrolyse im biologischen Medien wie Blutplasma, Magenflüssigkeit oder Leberhomogenat ist auf eine Vielzahl von Hydrolasen

zurückzuführen. Der quantitative Parameter Hydrolyseaktivität beschreibt die Gesamtheit der hydrolytischen Aktivität eines enzymatischen Hydrolysemediums.

Die spezifische Hydrolyseaktivität ist die umgesetzte Substratmenge pro Zeiteinheit und Enzymmenge unter definierten Bedingungen (optimale Substratanfangskonzentration, pH- und Temperaturoptimum, Aktivatoren). Die maximale Substratkonzentration ist dann erreicht, wenn ein maximaler Substratumsatz je Zeiteinheit besteht. Kann aus methodischen Gründen eine Sättigungskonzentration nicht eingestellt werden, so kann die Festsetzung einer definierten Substratsanfangskonzentration als ausreichend angesehen werden (Hess, 1966).

Bedingung für die experimentelle Durchführung ist, dass sich Enzym- und Substratkonzentration während des Messzeitraumes kaum ändern. Der Messzeitraum soll einerseits hinreichend groß sein, um einen über der Bestimmungsgrenze detektierbaren Substratumsatz zu erhalten. Andererseits soll er so kurz als sein, um den unerwünschten Einfluss der Denaturierung mit fortschreitender Reaktionszeit zu minimieren. Das Substrat liegt gegenüber dem Enzym in großem molarem Überschuss vor (Faktor mindestens $1 \cdot 10^3$, Kleber et al., 1997) und seine Konzentration bleibt so während des Messzeitraums praktisch konstant.

Die Maßeinheit der Hydrolyseaktivität ist die Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit des Substrates, die von einer bestimmten Enzymmenge im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion bewirkt wird (Lottspeich & Zorbas, 1998). Bei der Angabe der spezifischen Hydrolaseaktivität bezieht man die molare Aktivität auf die Proteinkonzentration in der Hydrolysenlösung, die als Maß für die Enzymmenge im biologischen System angesehen werden kann.

2.5.2 Halbwertszeit

Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) ist ein wichtiger Kennwert chemischer Reaktionen und hat für die quantitative Beschreibung von physiologischen Abbauraten in der toxikologischen Bewertung einen hohen Stellenwert. **Sie ist definiert als jener Zeitraum, in dem eine zu Beginn herrschende Substratkonzentration auf die Hälfte abgesunken ist.**

Nach Umformung und Integration von Gleichung 1 (Abschnitt 2.4.2) wird ein Term erhalten, der für die Reaktion erster Ordnung einen exponentiellen Abfall der Substratkonzentration mit der Zeit beschreibt. Für die Halbwertszeit gilt definitionsgemäß $S = S_0/2$ und damit:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

k: Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 3)

Für die Berechnung ist es notwendig, den Wert für die Geschwindigkeitskonstante experimentell zu ermitteln. Dazu wird der Abfall der Konzentration des Substrats oder die Zunahme an Edukt während des Hydrolyseverlaufs experimentell bestimmt. Die Logarithmierung der Messwerte führt zu einem linearen Plot, aus dessen Anstieg die Geschwindigkeitskonstante berechnet werden kann (Chandler, 1992; Holtzhauer, 1995; Rappoport, 1987). Die Ableitung der Halbwertszeit erfolgt in unserer Studie in Anlehnung an die im Amtsblatt der EG Nr. L251/216 vom 19.09.1984 beschriebenen Methode. Wird der Term $\ln(S_0/S_i)$ gegen die Reaktionszeit t_i

graphisch aufgetragen, so ergibt sich aus dem Anstieg der linearen Trendlinie der Wert für die Geschwindigkeitskonstante k [min^{-1}].

Im klinisch-pharmakologischen Bereich werden zur Beschreibung des vollständigen Substratabbaus die Eliminationshalbwertszeit, dominierende sowie terminale Halbwertszeit unterschieden. Man geht davon aus, dass nach etwa 4 bis 5 Halbwertszeiten die Elimination eines Pharmakons weitgehend abgeschlossen ist (Forth & Henschler, 1992).

2.5.3 Reaktionskinetik nach der Theorie von *Michaelis-Menten*

Beim exponentiellen Konzentrations-Zeit-Verlauf der Reaktion erster Ordnung ist die Reaktionsgeschwindigkeit dS/dt abhängig von der Lage des Messintervalls. Meist wird dS/dt mit fortschreitender Zeit kleiner. Je stärker gekrümmt die Kurve ist, um so schwieriger wird es, die Initialgeschwindigkeit exakt zu ermitteln. Näherungswerte erhält man abgeleitet vom Hydrolyseverlauf aus dem Anstieg der Tangente am Zeitpunkt t_i „kurz nach dem Start der Reaktion“. Es sind für jedes Substrat $[n]$ Wertpaare $[S_i; t_i]$ als Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_i experimentell zu ermitteln. Die Reaktionsgeschwindigkeit zu einem beliebigen Zeitpunkt t_i entspricht der ersten Ableitung der Funktion der Konzentrationsmenge $S'(t_i)$. Die Bildung der ersten Ableitung erfordert zunächst, den Verlauf der Konzentrationsmenge als Funktion auf der Basis der Messwerte darzustellen. Dies erfolgt nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate nach Gauß (Hartmann et al., 1974; Rösch, 1993):

Aus $[n]$ Wertpaaren $[S_i; t_i]$ wird eine Funktion $S(t)$ gesucht, deren Wertepaare $[S(t_i), t_i]$ möglichst wenig von den gemessenen Werten abweichen, so dass der Ausdruck

$$Q = \sum_1^n [S(t_i) - S_i]^2$$

zum Minimum wird. Der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse lässt sich in guter Näherung als Exponentialfunktion darstellen:

$$S(t) = a_0 \cdot e^{a_1 t} \quad \text{mit} \quad a_1 \leq 0$$

Nach dem Logarithmieren der Messwerte $[S_i \rightarrow \ln S_i]$ wird die Ausgleichfunktion als ganzrationale Funktion ersten Grades bestimmt:

$$\ln S(t) = \ln a_0 + \ln a_1 t \rightarrow S(t) = a_0 + a_1 t$$

Die Koeffizienten a_k werden so bestimmt, dass die Minimalbedingung $[dQ / da_k = 0]$ erfüllt wird. Die Gleichungen für die Koeffizienten, sogenannte Normalgleichungen, lauten:

$$\begin{aligned} a_0 n + a_1 [t] &= [S] \\ a_0 [t] + a_1 [t^2] &= [S \cdot t] \end{aligned}$$

Hierbei bedeuten:

$$[t^2] = \sum_I^n t_i^2$$

$$[S \cdot t] = \sum_I^n t_i \cdot S_i$$

$$[S] = \sum_I^n S_i$$

n Anzahl der gemessenen Wertepaare
 S_i i -ter Wert der im Versuch ermittelte Konzentration
 t_i Zeitpunkt der Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Koeffizienten erfolgt durch Lösen des oben dargestellten Gleichungssystems. Die Ausgleichfunktion ist somit bekannt. Da die Messwerte in einem ersten Schritt logarithmiert wurden, lautet die Funktion in mathematisch exakter Schreibweise:

$$\ln S(t) = \ln a_0 + \ln a_1 t.$$

Diese Funktion kann entsprechend der Logarithmusgesetze wie folgt umgeschrieben werden:

$$\ln S(t) = \ln(a_0 \cdot a_1 t)$$

Das Rückgängigmachen der Logarithmierung ergibt:

$$S(t) = e^{a_0} \cdot e^{a_1 t}$$

Die Ableitung der Funktion an der Stelle t liefert die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt t .

$$S'(t) = V(t) = a_0 \cdot a_1 \cdot e^{a_1 t}$$

Die Initialgeschwindigkeit wird in unserer Studie als Reaktionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t_i = 0,10 \text{ min}$ definiert. Für die Initialgeschwindigkeit gilt somit:

$$V_{i, \text{spez}} = a_0 \cdot a_1 \cdot e^{0,1 \cdot a_1}$$

Die Berechnungen und grafischen Auswertungen für die untersuchten Substanzen erfolgen mit dem Computerprogramm Microsoft®EXCEL. Es gelten folgende Konventionen bei der Variablenbezeichnung:

$$S(t) \rightarrow y$$

$$t \rightarrow x$$

Zusammenfassend kann der Anstieg der Tangente zum Zeitpunkt t_i aus der Hydrolysefunktion (Gleichung 1) wie folgt berechnet werden (Brunner, 1996):

$$T(x) = f(a) + f'(a) \cdot (x - a)$$

(Gleichung 4)

Zur Bestimmung der *Michaelis-Menten*-Parameter K_m und V_{\max} wurden verschiedene Linearisierungsverfahren entwickelt (Tab. 2). Das in der Literatur am häufigsten genutzte Verfahren ist die doppelt reziproke Darstellung nach *Lineweaver & Burk* (1934). Die Vorteile der Darstellung resultieren aus der leichten Ableitung von Inhibitoreffekten, wie der Substratinhibition. Von Nachteil ist die erschwerte Wichtung der Messergebnisse sowie die

Beschränkung auf die Auswertung von Initialgeschwindigkeitsmessungen. Messwerte im Sättigungsbereich häufen sich und bei geringen Substratkonzentrationen erfolgt eine entsprechende Dehnung. Messwerte, die bei niedriger Substratkonzentration erhalten werden, sind mit größerem Fehler behaftet und werden im *Lineweaver-Burk-Plot* bei der Festlegung der Geraden leicht überbewertet (Britt, 1992; Dixon, 1953 und 1972; Markus, 1976).

Tab. 2: Darstellungsformen zur grafischen Bestimmung von K_m und V_{\max}

Darstellungsform nach	Auftrag auf der		Schnittpunkt mit der		Steigung
	x-Achse	y-Achse	x-Achse	y-Achse	
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{S_0}$	$\frac{1}{v_i}$	$-\frac{1}{K_m}$	$\frac{1}{V_{\max}}$	$\frac{K_m}{V_{\max}}$
Hanes-Woolf	S_0	$\frac{S_0}{v_i}$	$-K_m$	$\frac{K_m}{V_{\max}}$	$\frac{1}{V_{\max}}$
Eadie-Hofstee	$\frac{v_i}{S_0}$	v_i	$\frac{V_{\max}}{K_m}$	V_{\max}	$-K_m$
Cornish-Bowen	S_0	v_i	-	-	-

Quelle: Holtzhauer (1997)

Die Verfahren nach *Eadie & Hofstee* (1932) und *Hanes & Woolf* (1922) versuchen diese Nachteile durch Multiplikation der linearisierten Gleichung mit einem Korrekturfaktor auszugleichen. Der *direct plot* nach *Cornish & Bowen* (1976) verhindert durch eine direkte Auftragung der Parameter eine Verzerrung der Messfehlerverteilung. Dagegen ist die Bestimmung von K_m und V_{\max} nur durch eine grafische Abschätzung möglich und entsprechend ungenau. Die Korrelation von V_{\max} und K_m nach *Michaelis-Menten* zeigt Abb. 10.

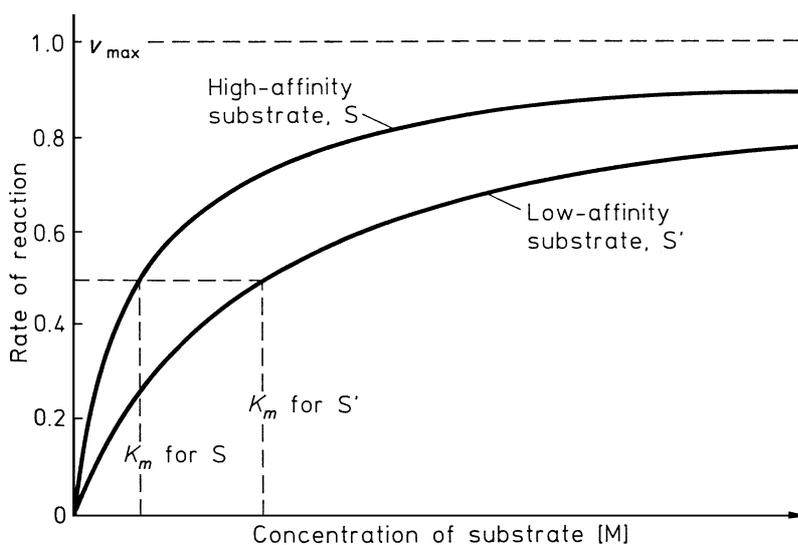


Abb. 10: Verlauf einer enzymkatalysierten Reaktion bei Substraten mit unterschiedlicher Affinität (nach Drauz et al., 1995)

K_m ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat. Je höher K_m , desto größer muss die Substratkonzentration sein, damit die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Dabei verringert sich die Substrataffinität (Lottspeich, 1998).

Der Quotient aus V_{max}/K_m gilt als Indikator für die Substratempfindlichkeit gegenüber der enzymatischen Reaktion unter substratgesättigten Bedingungen. Je höher der Verhältnis, desto größer ist die Empfänglichkeit des Substrats gegenüber dem Enzym (McCarthy, 1997).

Für Phenylacetat wurden die *Michealis-Menten*-Parameter u.a. in Rattenlebermikrosomen (LM) und Rattenlebercytosol (LC) bestimmt (McCracken et al., 1993). Im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 4,0 mM wurde K_m mit 1430 μM und 900 μM (LM und LC) bestimmt. Die V_{max} -Werte betragen 800 und 31 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}(\text{mL})$ Gewebe (LM und LC). Daraus wurde der Quotient $[V_{max}/K_m]$ mit $559\cdot 10^{-3} \text{ L}/\text{g}\cdot\text{min}$ (LM) und $34\cdot 10^{-3} \text{ L}/\text{mL}\cdot\text{min}$ (LC) berechnet. Die Hydrolysierbarkeit von Phenylacetat in Lebermikrosomen ist somit mehr als 16-mal größer als im Lebercytosol. Diese und andere Ergebnisse werden ausführlich in Abschnitt 3.3 (Tab. 7) dargestellt.

3 Aromastoffe in Lebensmitteln

3.1 Allgemeines

In den letzten Jahrzehnten hat der Anteil aromatisierter Lebensmittel stark zugenommen. Er liegt in Deutschland bei 15 bis 20 % des gesamten Lebensmittelverbrauchs (Beelitz et al., 2001). Eine Ursache ist der Anstieg industriell gefertigter Lebensmittel, die teilweise einer Aromatisierung bedürfen, weil bestimmte Rohstoffe nur begrenzt zur Verfügung stehen und deshalb teuer sind, oder, weil beim Herstellungsprozess und der Lagerung Aromaverluste auftreten, die auf diesem Wege ausgeglichen werden sollen.

Aromen werden überwiegend hochverarbeiteten Lebensmitteln zugesetzt und sollen durch ihren anregenden Einfluss auf das Nervensystem des Konsumenten Speisen und Getränken einen speziellen Genusswert verleihen. Dazu werden Aromakonzentrate oder Essenzen verwendet, die aus einzelnen chemischen Substanzen „komponiert“ werden. Hierbei spielen organische Verbindungen wie Alkohole, Aldehyde, Acetale, Ketone, Phenole und Phenolether, Säuren und Ester, Lactone sowie Kohlenwasserstoffe eine bedeutende Rolle.

3.1.1 Begriffsbestimmung

Aromen sind Zubereitungen von Geruchs- und Geschmacksstoffen (Aromastoffe), die dazu bestimmt sind, Lebensmitteln einen besonderen Geruch oder Geschmack zu verleihen (§ 1 Abs. 1 AromenVO). Sie sind nicht zum direkten Verzehr bestimmt und enthalten als Hauptbestandteile *Aromaextrakte (konzentrierte natürliche Aromakomplexe)*, *Aromastoffe*, *Lebensmittel als Trägerstoffe oder Lösemittel* sowie *Zusatzstoffe*.

Bei Aromastoffen handelt es sich um flüchtige Verbindungen, die mit Geruchsrezeptoren wahrgenommen werden. Sie erreichen die Rezeptoren durch nasale Wahrnehmung und über den Rachenraum, nachdem sie beim Kauen freigesetzt worden sind (retronasale Wahrnehmung). Von der Definition ausgenommen sind somit Verbindungen, die ausschließlich süßen, sauren oder salzigen Geschmack verleihen.

Es werden verschiedene Arten von Aromen unterschieden (Anlage 1 Aromenverordnung):

- natürliche, naturidentische oder künstliche Aromastoffe (Tab. 3),
- Aromaextrakte pflanzlichen und tierischen Ursprungs,
- Reaktionsaromen, die nach Erhitzen Aroma entwickeln sowie
- Raucharomen.

Tab. 3: Einteilung der Aromastoffe gemäß Anlage 1 Aromenverordnung

Natürliche Aromastoffe	Naturidentische Aromastoffe	Künstliche Aromastoffe
Zubereitungen oder einzelne Stoffe, die für den menschlichen Verzehr geeignet sind und ausschließlich durch physikalische, mikrobiologische oder enzymatische Prozesse aus pflanzlichem oder tierischem Ausgangsmaterial gewonnen werden, und die sich entweder im Rohzustand oder im Zustand nach Verarbeitung durch herkömmliche Lebensmittelverarbeitungsprozesse (einschließlich Rösten, Trocknen, Gären) im Hinblick auf den Verzehr durch Menschen befinden.	Stoffe, die mit chemischen Methoden aus aromatischen Rohstoffen isoliert oder synthetisch hergestellt werden; sie sind chemisch identisch mit Stoffen, die in natürlichen, für den menschlichen Verzehr bestimmten Produkten (zubereitet oder nicht zubereitet) vorkommen.	Stoffe, die bisher nicht in natürlichen, für den menschlichen Verzehr bestimmten Produkten (zubereitet oder nicht zubereitet) identifiziert worden sind.

3.1.2 Lebensmittelrechtliche Einordnung

Lebensmittelrechtlich werden Aromen entweder als Lebensmittel oder als Zusatzstoffe angesehen. Lebensmittel sind generell frei verwendbar, nur bestimmte Stoffe oder Zubereitungen können aus gesundheitlichen Gründen verboten sein oder einer beschränkten Verwendung unterliegen (Negativ-System). Zusatzstoffe unterliegen hingegen der generellen Zulassung durch ein bestimmtes Verfahren (Positiv-System). Beide Systeme werden miteinander kombiniert angewendet.

Im Zutatenverzeichnis ist die Verwendung von Aromastoffen mit dem Hinweis „Aroma“ oder einer Beschreibung des Aromas anzugeben. Bestehen die aromatisierenden Bestandteile ausschließlich aus natürlichen Aromastoffen oder Aromaextrakten, so darf das Wort „natürlich“ gebraucht werden (§ 6 Abs. 5 Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung).

Die Richtlinie des Rates 88/388/EWG vom 22.06.1988 legt Kriterien fest, die eine Verwendung von Aromastoffen in Lebensmitteln sowie deren Ausgangsstoffen für ihre Herstellung betreffen. In der Verordnung (EG) Nr. 2232/96 des Europäischen Parlaments und des Rates wurde die Schaffung einer EU-einheitlichen Positivliste von Aromastoffen, die in oder auf Lebensmitteln verwendet werden sollen, beschlossen. Die Verordnung legt grundlegende Verwendungsbedingungen für diese Stoffe fest:

- Aromastoffe dürfen nur zugelassen werden, wenn sie nach wissenschaftlicher Bewertung die Gesundheit des Verbrauchers nicht gefährden sowie der Verbraucher durch sie nicht irreführt wird.
- Zur Bewertung möglicher schädlicher Auswirkungen eines Aromastoffs ist dieser einer toxikologischen Bewertung zu unterziehen. Alle Aromastoffe müssen ständig überwacht und erforderlichenfalls neu bewertet werden.

3.2 Toxikologische Bewertung

3.2.1 Allgemeines

Toxikologische Fragestellungen werden im Hinblick auf die Verwendung von Aromastoffen bei der Lebensmittelzubereitung seit Jahrzehnten diskutiert (Bär & Griepentrog, 1967; Taylor, 1998). Die Kriterien für die toxikologische Bewertung werden von verschiedenen internationalen Expertenkomitees erarbeitet. Darunter sind Gremien wie das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), das Committee of Experts on Flavouring Substances of the Council of Europe (CE), das Scientific Committee for Food (SCF) der EU sowie internationale Organisationen der Aromenindustrie wie die International Organisation of the Flavour Industry (IOFI) in Europa und das Expert Panel of the Flavour and Extract Manufacturers Association of the United States (FEXPAN).

JECFA hat weltweit bei der Bewertung von Lebensmittelzusatzstoffen den größten Einfluss auf deren Zulassung. Seit mehr als 30 Jahren werden kontinuierlich Bewertungskriterien für die Evaluierung von Lebensmittelzusatzstoffen veröffentlicht. 1987 wurde erstmals in einem JECFA-Report (WHO, 1987) die Evaluierung von Aromastoffen beschrieben. Diese weicht in

wesentlichen Punkten von der Bewertung sonstiger Zusatzstoffe ab. Die Verordnung (EG) Nr. 2232/96 legt ein Verfahren zur Schaffung einer EU-einheitlichen „Positivliste von Aromastoffen zur Verwendung in Lebensmitteln“ fest. Nach Artikel 3 hatten die Mitgliedstaaten der Kommission bis zum 22.11.1997 eine Liste der auf ihrem Territorium vermarkteten Aromastoffe zu melden.

3.2.2 Bewertungsprogramm der Europäischen Kommission

Von der Europäischen Kommission wurde ein „Verzeichnis 1999/217/EG der EG-Kommission der in oder auf Lebensmitteln verwendeten Aromastoffe“ zusammengestellt und am 04.03.1999 veröffentlicht. Es enthält ca. 2800 Stoffe und lässt Ergänzungen zu. Die Informationen, die für die Bewertung benötigt werden, müssen von den Aromastoffherstellern zu bestimmten Fristen geliefert werden. Diese Fristen sind in der Verordnung (EG) Nr. 622/2002 der Kommission festgelegt. Die gelisteten Aromastoffe werden durch ein wissenschaftliches Komitee gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1565/2000 der Kommission bewertet. Die Bewertung läuft in mehreren Phasen ab:

Zunächst werden den Substanzen ihren chemischen Eigenschaften entsprechend so genannte FL-Nummern zugewiesen. Es werden Gruppen strukturverwandter Verbindungen geschaffen, bei denen gewisse Gemeinsamkeiten im metabolischen Verhalten zu erwarten sind. Bei der toxikologischen Bewertung soll auf vorliegende Daten der Expertenkomitees zurück gegriffen werden:

- Daten aus Sicherheitsevaluierungen des Sachverständigenausschusses für Aromastoffe des Europarates (CEFS),
- Daten des Wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses der Europäischen Kommission (SCF) sowie
- Daten des Gemeinsamen FAO/WHO-Sachverständigenausschusses für Lebensmittelzusatzstoffe (JECFA).

Die Stoffgruppen werden zur Evaluierung zwischen JECFA und SCF aufgeteilt. Die Anzahl der zu bewertenden Substanzen ist beträchtlich, so dass gruppenweise vorangegangen wird. Stoffe, bei denen Gemeinsamkeiten im metabolischen und biologischen Verhalten zu erwarten sind, werden gemeinsam bewertet.

„Chemisch definierte Aromastoffe“ werden im Rahmen der Mitwirkung der Mitgliedstaaten bei der wissenschaftlichen Prüfung von Lebensmittelfragen (SCOOP) behandelt. Diese Arbeitsgruppe erstellt eine Datenbank (FLAVIS), in der Informationen für die wissenschaftliche Prüfung von Aromastoffen zusammengestellt werden.

JECFA evaluiert Aromastoffe nach dem Munro-Prinzip (Munro et al., 1998). Es beruht auf der gemeinsamen Verwendung von Struktur-Wirkungsbeziehungen, Metabolismus und Toxizität. In Abb. 11 ist die systematische Vorgehensweise für die toxikologische Bewertung nach Munro dargestellt (JECFA, 1999).

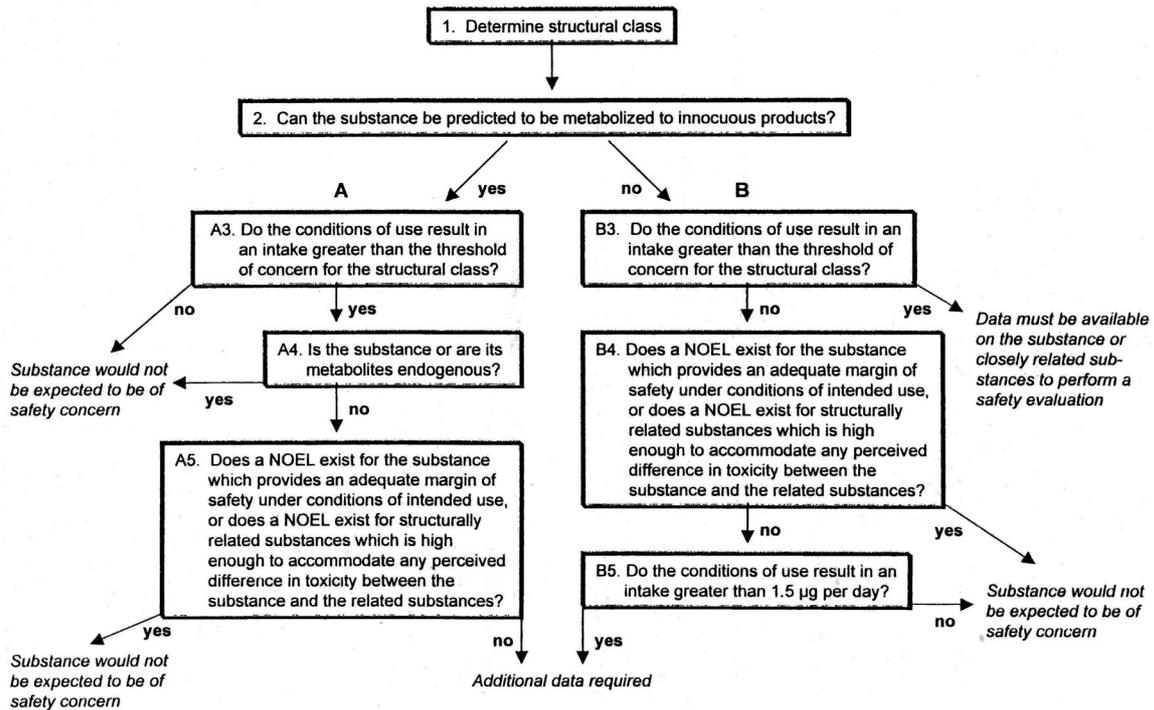


Abb. 11: Procedure for the safety evaluation of flavouring agents (nach JECFA, 1996)

Das Schlüsselement des Verfahrens ist die Unterteilung der zu evaluierenden Verbindungen in drei Strukturklassen (Schritt 1 aus Abb. 11).

- Klasse 1: Substanzen mit einfacher chemischer Struktur, die schnell metabolisiert werden, was einen geringen Toxizitätsgrad bei oraler Gabe erwarten lässt.
- Klasse 2: Substanzen, deren strukturelle Eigenschaften weniger unschädlich als die der Substanzen in Klasse 1 sind, aber nicht auf Toxizität hindeuten.
- Klasse 3: Substanzen, deren strukturelle Eigenschaften keine Annahme der Sicherheit erlauben oder sogar auf Toxizität hindeuten.

Schritt 2 aus Abb. 11 beschreibt die Herangehensweise zur Abschätzung der Metabolisierung. Die Kernaussage der Munro-Bewertung ist, dass entweder der Aromastoff oder die Metaboliten toxikologisch unbedenklich sind oder als endogene Substanzen ausgeschieden werden. Endogene Substanzen sollten keine Störung physiologischer Vorgänge hervorrufen. Die Aufnahmemenge hängt vom Gehalt im Lebensmittel und dessen Verzehrsmenge ab. Unter Bezugnahme auf das 46. JECFA-Meeting (JECFA, 1997) wurden definiert :

- *toxikologisch unbedenkliche Metaboliten*
sind definiert als Substanzen, die für den Menschen als harmlos bekannt sind oder deren toxikologische Bewertung keinen anderen Schluss zulässt
- *endogene Substanzen*
sind Zwischenmetabolite, die natürlicherweise im menschlichen Gewebe oder in Körperflüssigkeiten frei oder konjugiert vorkommen, ausgenommen Hormone und andere Substanzen mit biochemischer oder physiologisch regulativer Funktion.

Die Bewertung nach Munro erfolgt anhand a) der chemischen Struktur, b) der geschätzten täglichen Aufnahmemenge sowie c) anhand vorhandener Daten zur Hydrolysierbarkeit. Es wurden 15 Ethylester mit geradkettigem, gesättigtem Acyl-Rest und einer Kettenlänge von 1 bis 12, 14, 16 sowie 18 Kohlenstoffatome bewertet (Semino, 1997). Alle Substanzen werden von der Lebensmittelindustrie zur Aromatisierung von Lebensmitteln eingesetzt.

- zu a) Aufgrund ihrer einfachen Struktur wurden die Ester gemäß dem Munro-Prinzip der Struktur-Klasse 1 zugeordnet.
- zu b) Die maximale tägliche Aufnahmemenge für Substanzen *mit der Acyl-Kettenlänge* C_1 , C_5 , C_7 bis C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} liegt mit ca. $1,5 \mu\text{g /Tag}$ unterhalb der Schwellenkonzentration von $1800 \mu\text{g /Tag}$ für Substanz-Klasse 1 (JECFA, 1996).
- zu c) Alle Ester werden im Körper vollständig in ihre endogenen Intermediate Ethanol und Carbonsäure gespalten. Die Metaboliten der Ester mit einer Kettenlänge von 2, 3, 4 und 6 C-Atomen sind endogen und erfordern damit keine toxikologische Bewertung.

Für die genannte Ethylester ist damit eine toxikologische Bewertung *nicht* erforderlich.

3.3 Literaturübersicht zu Hydrolysestudien

Carbonsäureester können über verschiedene Wege in den menschlichen Körper gelangen. Sie kommen ubiquitär in Lebensmitteln als natürliche Aromabestandteile vor. Darüber hinaus entstehen Carbonsäureester bei der Zubereitung von Lebensmitteln und tragen auf diesem Wege zur Aromabildung bei (Salter et al., 1988).

Die pharmazeutische Industrie verwendet Carbonsäureester als Vorstufen von therapeutisch aktiven Agenzien, sogenannte prodrugs (Bruchhausen, 1991; Hosokawa et al., 1990). Carbonsäureester werden im Körper als endogene Verbindungen im Verlauf des allgemeinen Metabolismus gebildet (Bernhardt et al., 1996; Bird et al., 1999; Dan & Laposata, 1997; Doyle et al., 1996). Sie sind als Additive in Bedarfsgegenständen mit Lebensmittelkontakt zu finden und können durch Sorption und Migration in das Lebensmittel übergehen. Wechselwirkung und Einflussfaktoren der Migration wurden anhand von Lebensmitteln oder deren Simulantien untersucht (Gnanasekharan, 1997; Koszinowski, 1987; Landois-Garza, 1988; Shmunis, 1990).

Zur Metabolisierung von Carbonsäureestern werden seit Jahren Studien veröffentlicht. Sie beinhalten Methoden zur Strukturaufklärung von Metaboliten oder beschreiben die Abbaubarkeit der Ester in Abhängigkeit von Spezies, biologischem Material (Organe, Blut, Gastrointestinaltrakt) oder Simulantien (künstliche Magenflüssigkeit oder Darminhalt). Überwiegend wurde das *in vitro* Hydrolyseverhalten von Estern bei der Ratte beschrieben. Grundlegende Arbeiten dazu legten 1977 Longland et al. und Grundschober vor. Sie untersuchten die Hydrolyserate und Esteraseaktivität von Carbonsäureestern in künstlicher Gastrointestinalflüssigkeit und Rattenleberpräparationen bei 37°C (Tab. 4).

Tab. 4: Halbwertszeit von Carbonsäureestern und spezifische Hydrolyseaktivität von künstlicher Magen- und Pankreasflüssigkeit sowie Rattenleber- und Rattendünndarmmucosa-Homogenat bei 37°C (Longland et al., 1997)

Substanz	Summenformel	S ₀ [mM] ²	künstliche Magenflüssigkeit	künstliche Pankreasflüssigkeit	Leber-Homogenat	Dünndarmmucosa-Homogenat
			E _a [μmol /L je min] / t _{1/2} [min]		E _a [μmol /g Gewebe je min] / t _{1/2} [s]	
Et But	C ₆ H ₁₂ O ₂	< 58,8	75,8 / 490	6543 / 5,67	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
Et Cap	C ₈ H ₁₆ O ₂	< 3,19	6,73 / 293	578 / 3,47	832 / 0,145	240 / 0,501
Et Hep	C ₉ H ₁₈ O ₂	< 1,07	1,14 / 770	87,8 / 9,78	314 / 0,164	94,2 / 0,550
Et Pelar	C₁₁H₂₂O₂	< 0,06	0,21 / 177	7,14 / 5,92	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
Et Lau	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	< 0,12	0,13 / 640	12,7 / 6,10	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
All Cap	C ₉ H ₁₆ O ₂	< 0,25	0,13 / 1120	73,6 / 1,98	2,24 / 3,96	91,5 / 0,0960
iAm But	C ₉ H ₁₈ O ₂	< 1,52	1,52 / 660	90,4 / 11,3	125 / 0,492	859 / 0,0713
iAm iVal	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	< 0,29	0,70 / 295	19,4 / 10,2	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
iAm Cap	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	< 0,08	0,38 / 146	1,45 / 37,8	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
PhenEt Ac	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	< 7,67	17,5 / 300	177 / 29,7	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
Benz iBut	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	< 0,45	0,50 / 577	17,1 / 17,8	434 / 0,0422	259 / 0,0707
But Ac	C ₆ H ₁₂ O ₂	< 56,8	124 / 318	597 / 66,0	4,82 / 491	21,9 / 108
Et iVal	C ₇ H ₁₄ O ₂	< 17,7	8,07 / 1390	55,8 / 198	66,6 / 23,5	4,99 / 133
Me PhenAc	C ₉ H ₁₀ O ₂	< 0,60	0,33 / 905	2,93 / 96,7	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.
Et PhenAc	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	< 0,43	0,37 / 640	2,25 / 110	k. A. / k. A.	k. A. / k. A.

Ausgangspunkt der Studie von Longland et al. (1997) war die Löslichkeitsbestimmung der Ester in destilliertem Wasser. Die Substratanfangskonzentration S₀ des Hydrolyseansatzes wurde mit einem Wert unterhalb der ermittelten Löslichkeit festgelegt. Daraus resultierte für jedes Substrat ein unterschiedlicher Wert für S₀. Für die Ableitung von Geschwindigkeitskonstanten und der Halbwertszeiten wurde eine Kinetik 1. Ordnung zugrunde gelegt. Die Berechnung basierte auf dem gaschromatographisch bestimmten Abfall der Esterkonzentration während des Hydrolyseverlaufs.

Tab. 4 zeigt den signifikanten Abfall der Halbwertszeit in der Reihenfolge künstliche Magenflüssigkeit >> künstliche Pankreasflüssigkeit >> Leber- und Dünndarmmucosahomogenat. Damit wurde belegt, dass die Esteraseaktivität in Geweben und Körperflüssigkeiten sehr verschieden sein kann. In Abhängigkeit von der Halbwertszeit wurde eine Einteilung gemäß folgender Kategorien vorgenommen (Longland et al., 1977; Grundschober, 1977):

- schnelle Hydrolysierbarkeit: t_{1/2} < 10 min
- mäßige Hydrolysierbarkeit: 10 min ≤ t_{1/2} ≤ 45 min
- langsame Hydrolysierbarkeit: t_{1/2} > 45 min.

Die Kategorie „schnell hydrolysierbar“ ist ohne die Festlegung von Grenzen unspezifisch (Child et al., 1971, Ghittori et al., 1984). Die Esteraseaktivität in unterschiedlichen Geweben führt zu keiner konsistenten Einteilung. **So wird Ethylpelargonat mit der Halbwertszeit von 5,92 min in künstlicher Pankreasflüssigkeit als schnell hydrolysierbar eingestuft. Die korrespondierende spezifische Esteraseaktivität ist mit 7,14 μM /min im Vergleich zu Substraten mit ähnlicher Halbwertszeit (Et But, Et Cap, Et Hep, Et Lau) vergleichsweise gering (siehe Tab. 4).**

² Substratkonzentration "less than that required to give an saturated solution"

Die Interpretation der Hydrolyseparameter kann somit nur in ihrer Gesamtheit erfolgen. Als Ursache können verschiedene Substratanfangskonzentrationen (S_0) des Hydrolyseansatzes angenommen werden. Ein Vergleich kinetischer Messgrößen setzt voraus, dass für jedes Substrat identische Parameter in Bezug auf Enzymkonstitution, Temperatur, pH-Wert und S_0 vorliegen.

Adamczyk & Grote (1999) untersuchten den Einfluss von oxidierten Acylresten (α -Alkoxy- und α -Hydroxy-Gruppen) auf die Hydrolyse- und Amidolyseaktivität von Lipasen. Im Vergleich zu Benzylphenylacetat war die Hydrolysierbarkeit durch die erhöhte Anzahl von Sauerstoffatomen im Substrat (Benzylphenoxyacetat) herab gesetzt. Dieser Effekt trat verstärkt in benachbarten Regionen der Carbonylfunktion auf. Das zusätzliche Sauerstoffatom erhöht die Elektrophilie der Carbonylgruppe, die Polarität des Moleküls wird verstärkt, die Hydratation begünstigt und damit eine Substratbindungswahrscheinlichkeit am hydrophoben reaktiven Zentrum herabgesetzt.

Ein wichtiger Aspekt ist der Vergleich von *in vitro* mit *in vivo* Studien. Gallaher & Loomis (1975) stellten die Hydrolysierbarkeit von Ethylacetat *in vitro* in Rattenvollblut mit der *in vivo* Metabolisierung bei der Ratte gegenüber. Abb. 12 die beim *in vivo* Umsatz um den Faktor 7 bis 13 erhöhte Umsatzrate im Vergleich zur *in-vitro*-Reaktion. Die Verifizierung der *in vitro* Ergebnisse konnte durch die synchrone Quantifizierung von Substrat und freigesetzten Hydrolyseprodukten erzielt werden (rechte Seite in Abb. 12). Die *in vivo* Reaktion zeigt 5 min nach der Ethylacetat-Injektion einen Anstieg der Ethanolkonzentration im Blut. Nach ca. 15 min erreichte die Ethanolkonzentration ein Maximum; danach überwogt der Einfluss der ethanolabbauenden Enzyme. Die Halbwertszeit von Ethylacetat wurde hier mit 5-10 min bestimmt. Vollblut wies im Vergleich zu Niere oder Leber eine geringere *in vivo* Hydrolyseaktivität auf (Buchwald, 2000 und 2002; Mutch et al., 1992; Quinn et al., 1999, Satoh & Hosokawa, 1998). Hungund et al. (1995) stellten eine um 25 % erhöhte *in vivo* Abbaurrate von Linolsäureethylester ($t_{1/2} < 1$ min) in Rattenplasma gegenüber dem *in vitro* Experiment fest.

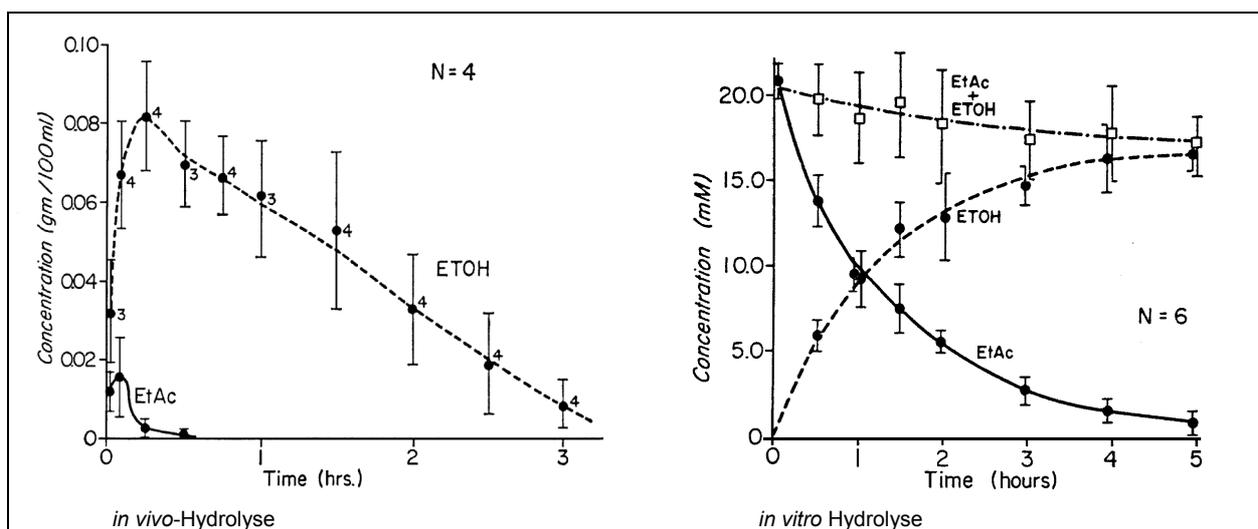


Abb. 12: *in vivo* und *in vitro*-Hydrolyse von Ethylacetat bei der Ratte (nach Gallaher & Loomis, 1975)

Tab. 5: Spezifische Hydrolyseaktivität von Lungen- und Leber-Homogenat von Phenylacetat und Amylacetat (nach Dahl, 1987)

Spezies	Testsystem	S ₀ [mM]	Hydrolysedauer	H _{a, spez.} [mol /min-g Protein]	
				Phenylacetat	Amylacetat
Hamster	Lunge	50 - 125	10 min	520 ± 30·10 ⁻⁶	180 ± 4·10 ⁻⁶
	Leber			1500 ± 10·10 ⁻⁶	1100 ± 81·10 ⁻⁶
Kaninchen	Lunge			390 ± 50·10 ⁻⁶	47 ± 2·10 ⁻⁶
	Leber			610 ± 30·10 ⁻⁶	380 ± 14·10 ⁻⁶
Ratte	Lunge			110 ± 6·10 ⁻⁶	75 ± 4·10 ⁻⁶
	Leber			510 ± 10·10 ⁻⁶	250 ± 6·10 ⁻⁶

Dahl et al. (1987) untersuchten an Hamster, Kaninchen und Ratte die spezifische Hydrolyseaktivität (H_{a, spez.}) in S9-Homogenat von Leber und Lunge gegenüber Amyl- und Phenylacetat (Tab. 5). Die freigesetzte Carbonsäure wurde quantifiziert und daraus H_{a, spez.} berechnet. Grundsätzlich erwies sich Leberhomogenat hydrolyseaktiver als die Lungenpräparation. Hamstergewebehomogenat hydrolysierte beide Ester mit höchster Aktivität. Phenylacetat wurde stets schneller als Amylacetat hydrolysiert, da beim Abbau neben der unspezifischen Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) zusätzlich die Arylesterase (EC 3.1.1.2) beteiligt ist (McCracken, 1993a).

Die Hydrophobizität der Alkylrestes beeinflusst wesentlich die Hydrolyserate. Mit ansteigender Hydrophobizitätskonstante von Methylacetat (C₁) → Octylacetat (C₈) nimmt die Hydrolyserate bis Pentylacetat (C₅) zu. Ab C₆ (Hexylacetat) wurde eine fallende Hydrolyserate beobachtet. Ebenso korrelierte die ansteigende Hydrophobizität von n-, iso-, sec- und tert-Butylacetat negativ mit der Hydrolyserate in Rattengewebehomogenat.

Der Einfluss sterischer Faktoren, wie Verzweigungen, verringert sich mit zunehmendem Abstand zum Carbonylkohlenstoffatom. Grundschober (1977) definierte die Hydrolyserate als Substratabbau zwei Stunden nach Reaktionsstart und ermittelte diese in Schweinegewebehomogenaten von Pankreas, Jejunum (mittlerer Dünndarmabschnitt) sowie Leber. Neben dem Abfall der Esterkonzentration wurde zusätzlich die Menge an freigesetzter Alkoholkomponente gemessen. Unter den gegebenen Redaktionsbedingungen (0,5 M Phosphatpuffer; pH 7,5 und 37 °C) war die Konzentration der untersuchten Ester um 50 bis 100 % reduziert.

Eine Gegenüberstellung der schnellen Hydrolysierbarkeit von aliphatischen und verzweigten Acetatestern im Vergleich zum vergleichsweise langsamen Abbau von Estern mit aromatischer Substituenten ist in Abb. 14 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Herangehensweisen der Autoren bei der Bestimmung von Hydrolyseraten. Verschiedene Untersuchungsbedingungen erschweren einheitliche Schlussfolgerungen.

Methylcinnamat wird in Vollblut und Serum sehr langsam hydrolysiert; daher ist vor allem im Magen mit der Resorption von nicht-hydrolysiertem Ester zu rechnen. Eine hohe Hydrolyseaktivität wurde im Gastrointestinaltrakt und in der Leberpräparation nachgewiesen. Propylanthranilat und Anthranilsäure werden hauptsächlich über den Magen aufgenommen. Da Propylanthranilat auch im peripheren Blut nachgewiesen wurde, kann auf eine langsamere Hydrolyse des Esters geschlossen werden (Fahelbum & James, 1977).

Kakkar & Mayersohn (1998) studierten die *in vivo* Hydrolyse von Methylsalicylat an der Ratte und wiesen eine vergleichsweise langsame Hydrolyse in Plasma nach (t_{1/2} 36 min; Systemische Clearance 14 ml/min kg).

Doppelbindungen oder Ringe in der Nähe der Carbonylfunktion lösen sterische Hinderungen bei der Esterspaltung aus. Ein Vergleich der relativen Hydrolyseraten von Methylestern in Schweineleberesterase ergab folgende Reihenfolge der Hydrolyseraten: -phenyloxypropanoat : -phenylpropanoat : -phenylcyclopropanoat : -*trans*-3-phenylpropenoat (cinnamat) = 85:70:2:1 (Basak et al., 1997).

Tab. 6: Studien zur Hydrolysierbarkeit von Carbonsäureestern

Substanz	Summenformel	Spezies	Testsystem	S ₀ [mM]	Hydrolysedauer / -rate	Referenz		
All Hex	C ₉ H ₁₆ O ₂	Schwein	Pankreas	0,34	2 h / 100%	Grundschober, 1977		
All PhenAc	C ₁₁ H ₁₂ O ₂		Pankreas	0,25	2 h / 100%			
All Tigl	C ₈ H ₁₂ O ₂		Darm	2,54	2 h / 100%			
Am PhenAc	C ₁₃ H ₁₈ O ₂		Pankreas	< 0,11	2 h / 100%			
iAm Ac	C ₇ H ₁₄ O ₂		Pankreas	0,67	2 h / 20%			
			Darm	3,34	2 h / 100%			
iProp But	C ₇ H ₁₄ O ₂		Pankreas	1,23	2 h / 40%			
iProp PheAc	C ₁₁ H ₁₄ O ₂		Pankreas	0,45	2 h / 50%			
Me Cinn	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	Kaninchen	Blut	12,5	3 h / 0,59 mM	Fahelbum & James, 1977		
			Serum	12,5	1 h / 0,25 mM			
			Ratte	Blut	15,5		3 h / 0,54 mM	
				Serum	15,5		1 h / 0,29 mM	
		Schwein	Gastroint.	12,5	10 ± 80·10 ⁻³ mol /min·gProt	Basak et al., 1997		
			Leber	12,5	20,3±1,7·10 ⁻⁶ mol/min·gProt			
				Schwein	LeberCE	7 - 40	k _{cat} = 1 /min	
		Me PhenProp	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Schwein	LeberCE	7 - 40	k _{cat} = 12,4 /min	
		Me Sali	C ₈ H ₈ O ₃	Ratte, in vivo	Plasma	0,85	t _{1/2} = 36 min	Kakkar & Mayersohn, 1998

Kinetische Parameter nach *Michaelis-Menten* sind in Tab. 7 zusammengefasst. McCarthy & Witz (1997) interpretierten den Quotienten V_{max}/K_m als Maß für die „Anfälligkeit“ von Acrylatestern gegenüber der Hydrolyse durch Schweinelebercarboxylesterase (PLE). PLE hat sich daher wegen ähnlicher katalytischer Eigenschaften seiner Isoenzyme als Modell für die enzymatische Hydrolyse beim Menschen bewährt (Hosokawa et al., 1990).

Butylacrylat und Butylmethacrylat zeigen aufgrund annähernd gleich großer kinetischer Parameter eine ähnliche Hydrolysierbarkeit durch Schweineleber-Cholinesterase. Ebenso wurden Methylcinnamat (Methyl-*trans*-3-phenylpropenoat) und Methylphenylpropionat untersucht und fast identische K_m -Werte bestimmt. Die *trans*-Doppelbindung beeinflusst hier die Enzymaffinität kaum. Generell werden Unterschiede bei kinetischen Parametern als signifikant interpretiert, wenn sich diese um mindestens zwei Zehnerpotenzen unterscheiden.

Die α -Methylsubstitution hat einen geringen Einfluss auf K_m und V_{max} . Unter Berücksichtigung der Vertrauensbereiche beider Parameter konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Butylacrylat und Butylmethacrylat werden mit annähernd gleich großer Hydrolysegeschwindigkeit (V_{max}) abgebaut. Ebenso kann von einer ähnlichen Affinität (K_m) gegenüber methylierten und unmethylierten Substraten ausgegangen werden (McCarthy, 1999).

Tab. 7: Michaelis-Menten Parameter von Carbonsäureestern

Substanz	Spezies	Test-system	S ₀ [mM]	Michaelis-Menten-Parameter			Referenz
				K _m [mol /L]	V _{max} [mol /min·g Prot]	V _{max} /K _m [L /g (mL)·min]	
iAm Ac	AcChE (EC 3.1.1.7)		1 - 5	3,6·10 ⁻³	k. A.	k. A.	Cohen et al., 1984
But Acry	Schwein	LeberCE	0,005-0,25	33,3 ± 8,5·10 ⁻⁶	1,49 ± 0,83·10 ⁻⁹	45·10 ⁻⁶	McCarthy, 1999
But But	Ratte	LeberCE	0,2 - 2	0,11·10 ⁻³	470·10 ⁻⁶	k. A.	Arndt & Krisch, 1973
But MeAcry	Schwein	LeberCE	0,005-0,25	72 ± 28·10 ⁻⁶	1,84 ± 0,64·10 ⁻⁹	26·10 ⁻⁶	McCarthy, 1999
Et Acry	Schwein	LeberCE	0,025-2,5	134 ± 16·10 ⁻⁶	8,9 ± 2,0·10 ⁻⁹	6,64·10 ⁻⁵	McCarthy & Witz, 1997
Et But	Schwein	LeberCE	0,1-12,7	0,44·10 ⁻³	11,7·10 ⁻⁶ /U	-	Adler et al., 1962
Et Methacry	Schwein	LeberCE	0,025-2,5	159 ± 90·10 ⁻⁶	5,2 ± 2,5·10 ⁻⁹	3,30·10 ⁻⁵	McCarthy & Witz, 1997
EtPhen Prop	Rind	LeberCE	k. A.	1,3·10 ⁻³	k. A.	k. A.	Wynne et al., 1973
Me But	Schwein	LeberCE	0,12 - 44,2	0,439·10 ⁻³	11,7·10 ⁻⁶ /U	k. A.	Adler et al., 1962
Me Cinn	Ratte	Leber	0,25 - 8,17	0,39 ± 0,05·10 ⁻³	53 ± 15·10 ⁻⁶	k. A.	Fahelbum & James, 1977
	Schwein	LeberCE	7 - 40	33,3·10 ⁻³	k. A.	k. A.	Basak et al., 1997
Me PhenProp	Schwein	LeberCE	7 - 40	5,9·10 ⁻³	k. A.	k. A.	Basak et al., 1997
Phen Ac	Ratte	LebMicr	0,5-4,0	1430 ± 140·10 ⁻⁶	800 ± 75·10 ⁻⁶	559·10 ⁻³	McCracken et al., 1993
		LebCyt		900 ± 500·10 ⁻⁶	30,7 ± 3,0·10 ⁻⁶	34·10 ⁻³	
		LungMicr		1460 ± 580·10 ⁻⁶	4,9 ± 3,1·10 ⁻⁶	3,3·10 ⁻³	
		LungCyt		1330 ± 550·10 ⁻⁶	14,2 ± 5,5·10 ⁻⁶	11·10 ⁻³	
		HautMicr		950 ± 100·10 ⁻⁶	1,13 ± 0,02·10 ⁻⁶	1,2·10 ⁻³	
		HautCyt		340 ± 50·10 ⁻⁶	3,4 ± 1,4·10 ⁻⁶	10·10 ⁻³	
BlutPl/Cyt		2340 ± 40·10 ⁻⁶	290 ± 40·10 ⁻⁶	124·10 ⁻³			

Die Länge des Alkylrestes beeinflusst die Michaelis-Menten-Konstante. Ethylacrylat besitzt im Vergleich zu Butylacrylat einen vierfach höheren K_m-Wert. Der mittlere K_m-Wert für Ethylmethacrylat wurde als annähernd doppelt so hoch bestimmt wie für Butylmethacrylat. V_{max} von Butylacrylat /-methacrylat war gegenüber Ethylacrylat /-methacrylat auf ein Sechstel /Drittel verringert (McCarthy & Witz, 1997). Ghanayem et al. (1985) untersuchten den Einfluss von α-Methylsubstituenten auf die Toxizität von Acrylaten. In einer Studie mit PLE konnte der Einfluss auf kinetische Parameter nicht belegt werden (Adler et al., 1962).

Hydrolysestudien mit biologischem Material des Menschen wurden bisher nur vereinzelt publiziert. Eine Übersicht dazu liefert Tab. 8. Im Vordergrund standen die vergleichende Bewertung der Hydrolysierbarkeit von Phenylacetat sowie die Untersuchung der endogenen Synthese von Fettsäureethylestern und deren Metabolismus (Doyle, 1994). McCracken et al. (1993) untersuchten die *in vitro* Hydrolyseaktivität der Ratte mit Phenylacetat und etablierten die Substanz als Marker für die Arylesteraseaktivität in biologischen Systemen.

Die Ratte verfügt in Blut, Plasma und Serum über höhere Esteraseaktivitäten als der Mensch (Aldridge, 1953; Buchwald & Bodor, 1999 und 2000; McCracken et al., 1993 und 1993a; Minagawa et al., 1995; Saghiri et al., 1999). Human- und Rattenblut enthalten hohe Aktivitäten an Cholinesterase (EC 3.1.1.7 und 3.1.1.8), dagegen ist die Aktivität der Carboxylesterase (EC 3.1.1.1, EC 3.1.1.2 und EC 3.1.16) bei der Ratte gegenüber der des Menschen deutlich erhöht.

Tab. 8: Studien zur Hydrolysierbarkeit beim Menschen

Substanz	Testsystem	S ₀ [mM]	Hydrolyse- parameter	<i>Michaelis-Menten-Parameter</i>			Referenz
				K _m [mol /L]	V _{max} [mol/min]	V _{max} /K _m [l/min-g]	
Phen Ac	LeberMicr	0,5 - 4	k. A.	280 ± 93·10 ⁻⁶	57 ± 21·10 ⁻⁶ /g Gewebe	0,204	McCracken et al., 1993a
	LeberCyt	0,5 - 4	k. A.	190 ± 66·10 ⁻⁶	37 ± 8·10 ⁻⁶ /g Gewebe	0,195	
	BlutPl	0,5 - 4	k. A.	1480 ± 285·10 ⁻⁶	250 ± 54·10 ⁻⁶ /ml Plasma	0,168	
	Serum	3,0	38-126·10 ⁻⁶ mol /ml Serum-min	k. A.	k. A.	k. A.	Mutch et al., 1992
FAEE	Fettgewebe	k. A.	t _{1/2} = 16 – 24 h	k. A.	k. A.	k. A.	Doyle, 1994

Arndt & Krisch (1973) sowie Junge & Heymann (1979) stellten den Einfluss der Kettenlänge von Acyl- und Alkylresten auf kinetische Parameter bei der enzymatischen Hydrolyse von Methyl-estern und Acetaten dar (Abb. 13 bis Abb. 16).

Substratinhibition setzte bei der Hydrolyse von Methylestern in Rattenlebercarboxylesterase bei S₀ > 0,01 mol/L ein. Ein scharfer Maximalwert für V_{max} wurde bei der Acylkettenlänge C₄ (Methylbutyrat) ermittelt, wogegen der Verlauf von pK_m keine Abhängigkeit von der Acylkettenlänge zeigte. Bei der Hydrolyse von Alkylacetaten stieg V_{max} von C₁ bis C₃ kontinuierlich an und erreichte ein Maximum für Propylacetat (Arndt & Krisch, 1973).

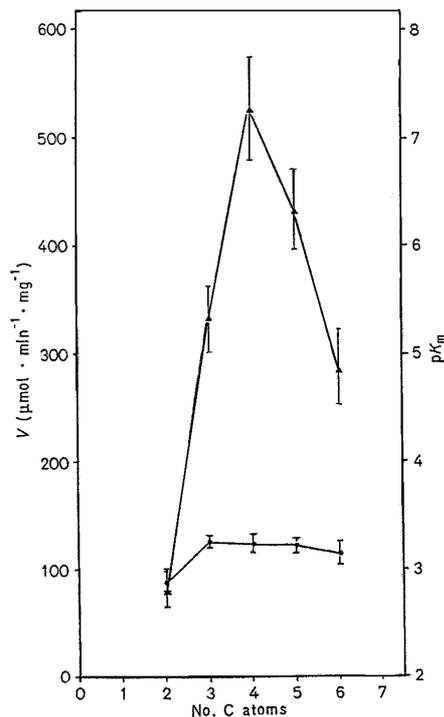


Abb. 13: Einfluss der Acylkettenlänge auf pK_m (●) und V_{max} (▲) bei der Hydrolyse von Methylestern durch Carboxylesterase aus Rattenlebermikrosomen (nach Arndt & Krisch, 1973)

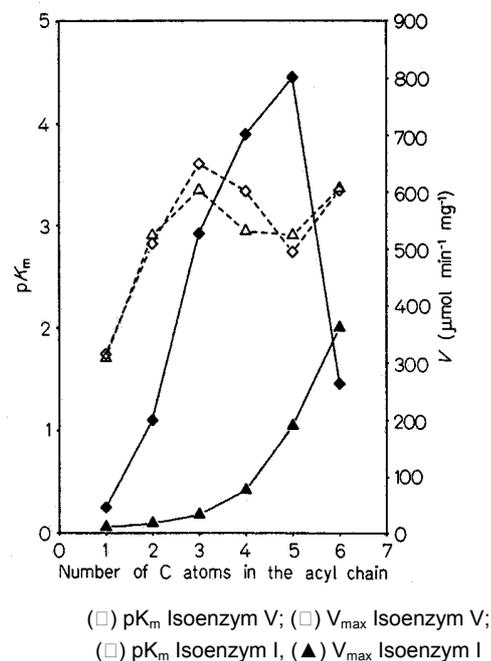


Abb. 14: Abhängigkeit von V_{max} und K_m von PLE Isoenzymen I und V von der Acylkettenlänge bei der Hydrolyse von Methylestern (nach Junge & Heymann, 1979)

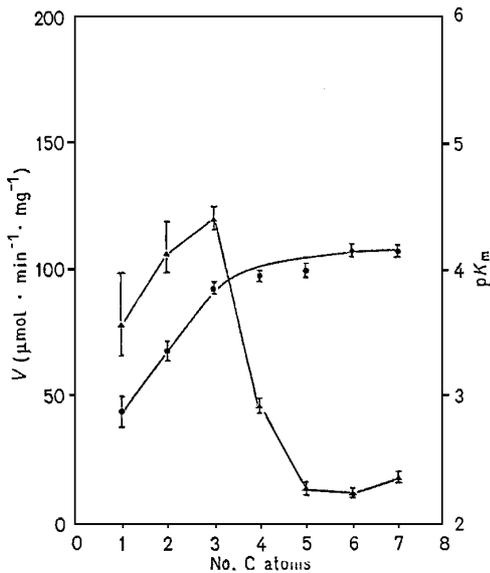


Abb. 15: Einfluss der Alkylkettenlänge auf pK_m (●) und V_{max} (▲) bei der Hydrolyse von Acetaten durch Carboxylesterase aus Rattenlebermikrosomen (nach Arndt & Krisch, 1973)

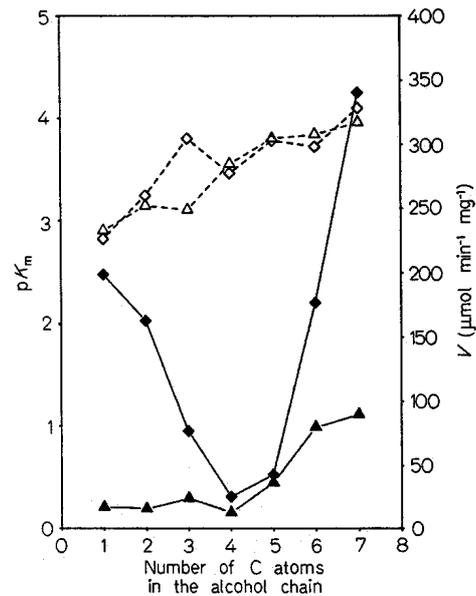


Abb. 16: Abhängigkeit von V_{max} und K_m von PLE Isoenzymen I und V von der Alkylkettenlänge bei der Hydrolyse von Acetaten (nach Junge & Heymann, 1979)

Der Vergleich von Abb. 13 und Abb. 15 lässt den Schluss zu, dass der stärkere Einfluss auf V_{max} von der Kettenlänge des Acylrestes ausgeht. Die zunehmende Alkylkettenlänge von Acetatestern ergibt ansteigende Werte für pK_m , die sich, ohne ein Maximum zu erreichen, bis zu einer Acylkettenlänge von C_7 plateauartig annähern. Der Mechanismus verläuft wie bei allen Serinesterasen über die Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediats, dessen Zerfall als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Gesamtreaktion angesehen wird. Der Einfluss der Rückreaktion der Intermediat-Bildung ohne Substratumsatz, nimmt mit zunehmender Hydrophobizität des Alkylrestes zu, was letztlich zu einem Abfall der Gesamtumsatzrate (V_{max}) bei Alkylkettenlängen von C_3 bis C_7 führt.

Bei der Hydrolyse von Acetatestern zeigt das Isoenzym V ein Minimum für die Maximalgeschwindigkeit bei den Alkylkettenlängen von Butyl- (C_4) und Pentyl- (C_5)acetat (Abb. 16). Isoenzym I zeigt dagegen die deutliche Präferenz für den Umsatz von Acetaten mit längeren Alkylresten. Der pK_m -Wert beider Isoenzyme zeigt annähernd gleich große Werte und steigt mit zunehmender Alkylkettenlänge leicht an. Die Tendenz von Isoenzyme I, bevorzugt Monoacylester mittlerer Kettenlänge zu hydrolysieren, deckt sich mit seiner Cholinesterase-eigenschaft. Für Isoenzym V wurde eine höhere Substratspezifität nachgewiesen, was besonders in der schnellen Transacylationskatalyse zum Ausdruck kommt. Für die inversen Ester Butylacetat und Methylpentanoat, die eine identische Summenformel und Molekülgröße aufweisen, wurden ähnliche K_m -Werte, aber deutlich verschiedene V_{max} -Werte bestimmt. Ursache dafür kann eine „unproduktive“ Enzym-Substrat-Bindung [ES] sein: [ES] ist zu stabil, zu instabil oder eine unvorteilhafte geometrische Anordnung des Substrates verhindert deren Umsetzung (Savary, 1972).

4 Problemstellung und Lösungsansätze

Wie einleitend beschrieben, spielt die Hydrolysierbarkeit von Carbonsäureestern, die als Aromastoffe und als Bestandteile von Lebensmittelverpackungsmaterial Bedeutung haben, bei der toxikologischen Bewertung dieser Stoffe eine wichtige Rolle.

Seit der ersten Beschreibung enzymatisch katalysierter Reaktionen anhand von kinetischen Parameter durch Michaelis und Menten (1928) werden kontinuierlich Studien veröffentlicht, die Hydrolyseeigenschaften von Carbonsäureestern beschreiben. Castle et al. (1993), Dahl (1987), Fabelbum & James (1977 und 1979), Hagan et al. (1967), Longland et al. (1977), McCarthy & Witz (1997) sowie McCracken et al. (1993a) untersuchten verschiedene Carbonsäureester hinsichtlich ihrer Hydrolysierbarkeit in biologischem Material von Ratte, Kaninchen, Schwein und Hamster sowie künstlicher Magenflüssigkeit und Darminhalt. Studien auf der Grundlage von biologischem Material des Menschen existieren hingegen nur in geringer Anzahl. Überwiegend wurden Hydrolysestudien mit Phenylacetat veröffentlicht (McCracken et al., 1993; Mutch, 1992).

Auf diesen Grundlagen aufbauend sollen in unserer Studie mit Humanplasma die Hydrolyseeigenschaften von Carbonsäureestern näher untersucht werden. Dazu ist es zunächst erforderlich, eine geeignete Methode zu quantitativen Beschreibung der Hydrolysierbarkeit zu validieren.

Im ersten Abschnitt werden zur Beschreibung der Hydrolyseeigenschaften anhand von Esterabbauraten und/oder Eduktbildungsgeschwindigkeiten geeignete Modellsubstanzen und pharmakokinetische Parameter festgelegt. Insgesamt werden 15 Carbonsäureester untersucht, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur im Acyl- und/oder Alkylrest unterscheiden. Diese Ester befinden sich in der ständig aktualisierten JECFA Flavouring Agents Database (JECFA, 2002) und repräsentieren für Aromastoffe charakteristische Strukturelemente. Die Substanzen werden in drei Strukturklassen unterteilt:

- Ethylester mit linear unverzweigtem Acylrest verschiedener Kettenlänge,
- Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem oder aromatischem Acyl- oder Alkylrest und
- Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur.

Ziel der Arbeit ist es, den strukturellen Moleküleigenschaften durch Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen einen Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und Hydrolysierbarkeit zuzuordnen.

Einen Schwerpunkt bildet die Beurteilung der Hydrolyseeigenschaften von Tiglinsäureestern, die sich in Studien mit Pankreas-, Darm- und Lebergewebe vom Schwein als langsam hydrolysierbar erwiesen haben. Als Referenzsubstanz wird Phenylacetat verwendet. Diese Verbindung wird in biologischen Medien mit Esteraseaktivität schnell hydrolysiert und ist daher als Marker für Arylesteraseaktivität im Plasma geeignet (McCracken 45, 1993). Die von Mutch (1992) und McCracken (1993) publizierten Hydrolyseparameter am Menschen werden zur Plausibilitätskontrolle der erhaltenen Messergebnisse herangezogen.

Voraussetzung für die Metabolisierung eines Stoffes ist seine Verteilung im Körper. Carbonsäureester besitzen meist hydrophobe Eigenschaften, woraus die geringe Löslichkeit im wässrigen Medium resultiert. Diese wiederum beeinflusst die Verteilung der Substanzen im Organismus und damit deren Eliminierung.

Voruntersuchungen sollen die Beurteilung der chemisch-physikalischen Eigenschaften der Ester ermöglichen. Dazu wird die Löslichkeit der Ester experimentell bestimmt und die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten abgeleitet. Weiterhin wird ein geeignetes Verfahren zur reproduzierbaren Gewinnung von Ratten- und Humanplasma etabliert. Als methodische Vorversuche werden Hydrolyseexperimente in den biologischen Systemen Ratten- und Humanplasma, künstliche Magenflüssigkeit sowie Rattenleberhomogenat durchgeführt.

Im Vordergrund der kinetischen Hydrolyseexperimente steht die Untersuchung von Humanplasma. Rattenplasma wird zur Methodvalidierung eingesetzt. Die in der Vergangenheit veröffentlichten Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen dienen als Ansatz für die Methodenentwicklung sowie zur Gegenüberstellung von Zwischenergebnissen. Zusätzlich wird die Hydrolysierbarkeit in Rattenleberhomogenat und künstlicher Magenflüssigkeit untersucht.

Ein geeignetes chromatographisches Analyseverfahren soll die Erfassung des zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Hydrolyse anhand der Esterhydrolyseprodukte (Alkohol und Carbonsäure) ermöglichen. Aus der Eliminationsgeschwindigkeit werden folgende pharmakokinetische Kenngrößen berechnet:

- spezifische Hydrolyseaktivität,
- Halbwertszeit sowie
- enzymkinetische Parameter nach der Theorie von *Michaelis-Menten*.

Diese Parameter werden im Zusammenhang mit Reaktionsmechanismen der esterase-katalysierten Hydrolyse sowie qualitativen und quantitativen Aussagen zu Reaktivität und Struktur der Carbonsäureester interpretiert.

Die zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse soll darin münden, die untersuchten Carbonsäureester anhand ihrer Hydrolysierbarkeit, unter Berücksichtigung der strukturellen Merkmale, in Gruppen einzuteilen.

Abschließend wird die Möglichkeit der Extrapolation von Ergebnisse aus Tierstudien auf den Menschen unter Berücksichtigung verschiedener intrinsischer Unterschiede, der Kinetik und Metabolisierung erörtert. Weiterhin soll die Übertragung von Daten aus *in vitro* Bedingungen auf die Ableitung von *in vivo* Ergebnissen diskutiert werden.

5 Ergebnisse

5.1 Zur Auswahl der Carbonsäureester und Herangehensweise

Es wurden Ester ausgewählt, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur im Acyl- und/oder Alkylrest unterscheiden (Abb. 17). Ausgehend von der Substanz Ethylheptanoat wurden folgende Fragestellungen zur Beschreibung des Hydrolyseverhaltens gestellt:

- Einfluss der Kettenlänge des Acylrestes bei Ethylestern,
- Einfluss des Alkylrestes im Vergleich von Ethyl- und Benzylestern,
- Vergleich von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur.

Ein Schwerpunkt lag auf der Beurteilung der Hydrolyseeigenschaften der Ester der Tiglinsäure (*trans*-2,3-Dimethylacrylsäure): Ethyltiglat und Benzyltiglat. Tiglate haben sich in Studien mit Pankreas-, Darm- und Lebergewebe vom Schwein als langsam hydrolysierbar erwiesen (Grundschober, 1977).

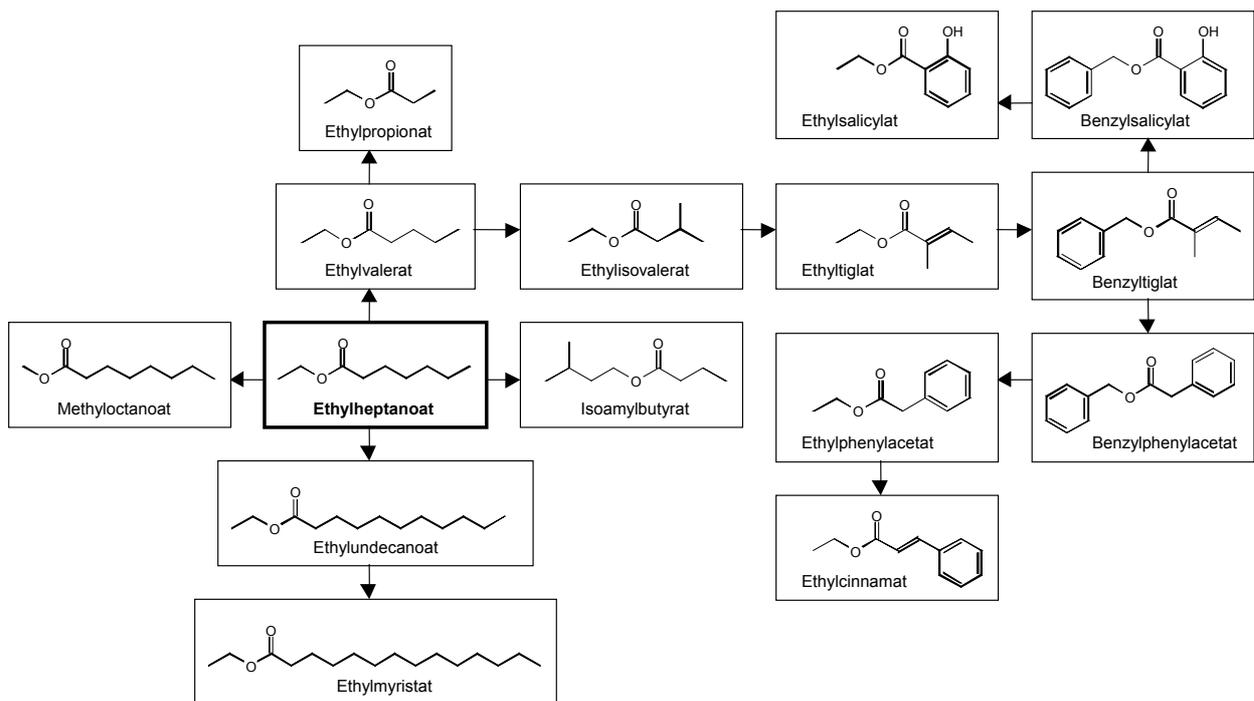


Abb. 17: Substratübersicht für die enzymatische Hydrolyse in Humanplasma

Die Referenzsubstanz Phenylacetat (Abb. 18) wird in biologischen Medien mit Esteraseaktivität sehr schnell hydrolysiert und ist in vorangegangenen Studien als Marker für Arylesteraseaktivität im Plasma eingeführt worden (McCracken et al., 1993).

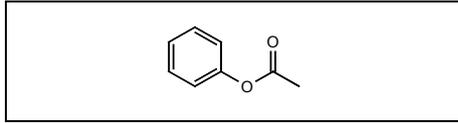


Abb. 18: Referenzsubstanz Phenylacetat

In der ersten Projektphase wurden *Ethylheptanoat*, *Ethyltiglat*, *Benzyltiglat* sowie *Phenylacetat* untersucht und mit Rattenplasma als Hydrolysemedium zur Methodenentwicklung eingesetzt. Diese Untersuchungen ermöglichten eine Abschätzung von Reproduzierbarkeit verschiedener Hydrolyseexperimente und Einflussfaktoren. Diese Vorversuche führten zu allgemeinen Aussagen, die eine Einordnung der hydrolytischen Aktivität von Humanblutplasma im Vergleich mit anderen physiologischen Medien erlauben. Im einzelnen wurden Rattenblutplasma, Krebs-Henseleit-Puffer als Leerwert für Plasma, künstliche Magenflüssigkeit sowie Leberhomogenat untersucht.

5.2 Löslichkeit der Carbonsäureester im wässrigen Medium

Eine wesentliche Voraussetzung für die Metabolisierung eines Stoffes ist seine Verteilung im Körper. Carbonsäureester werden im Allgemeinen als lipophile Substanzen bezeichnet, die sich nicht oder schwer in Wasser lösen und damit schlecht ausgeschieden werden. Die Löslichkeit ist somit ein wichtiger Parameter für die Resorption, Verteilung und Eliminierung *in vivo*.

Die Umwandlung lipophiler Substanzen zu hydrophilen Metaboliten ist essentiell für deren Ausscheidung. Die Biotransformation von Carbonsäureestern erfolgt über den in Abschnitt 2.3 beschriebenen Weg. Darüber hinaus wird die Bioverfügbarkeit bei der enzymatischen Hydrolyse maßgeblich von der Löslichkeit im jeweiligen Hydrolysemedium bestimmt. Eine Abschätzung der Löslichkeit ist daher für die Beurteilung der Ergebnisse vorliegender Studie unabdingbar.

Hansen und Andersen (1988) publizierten dazu sogenannte REM-Werte. Dieser Parameter beschreiben als *Relative Energy Difference* ein Maß für die Affinität von Lösemitteln gegenüber dem zu lösenden Agens. REM-Werte berücksichtigen Wechselwirkungen (unpolare, Dipol-, Wasserstoffbrückenbindungen) und Energiedifferenzen zwischen Lösemittel und zu lösender Substanz.

Die untersuchten und strukturverwandten Carbonsäureester sowie deren Metabolite (Essigsäure, Benzoesäure, Benzylalkohol, Butyl- und sec-Butylacetat, Ethanol, Ethylacetat, Ethylcinnamat, Isoamylacetat, Methanol, Methyloleat, Stearinsäure) weisen REM-Werte > 1 auf; das heißt, sie besitzen eine geringe Affinität gegenüber Blutserum und werden somit als schlecht löslich charakterisiert (Hansen & Andersen, 1988). Darauf beruht die Annahme der Abstoßung und physikalischen Barriere zwischen Lösemittel und Substanz.

Eine weitere Messgröße zur Beschreibung des Löslichkeitsverhaltens sind Verteilungskoeffizienten. Kaneko (1994) untersuchte Verteilungskoeffizienten in Ratten- und Humanplasma. Acetatester zeigten in Rattenplasma eine gegenüber Humanplasma um den Faktor 2,8 erhöhte

Löslichkeit. Dieser Trend setzte sich bei C₁ bis C₅-Alkoholen fort. Weiterhin liegen Hinweise darauf vor, dass n-Alkylacetate im Vergleich mit iso-Alkylacetaten leichter löslich sind.

Die Löslichkeit der untersuchten Carbonsäureester wurde in Krebs-Henseleit-Puffer bei einer Temperatur von 37 °C bestimmt. Krebs-Henseleit-Puffer wurde auf pH 7,4 eingestellt und entsprach damit den physiologischen Werten für Mensch (Normalwert: 7,36 - 7,44) und Ratte (Normalwert: durchschnittlich 7,36). Darüber hinaus besitzen Krebs-Henseleit-Puffer, Human- und Rattenplasma eine ähnliche mineralische Zusammensetzung (Abb. 19 sowie Tab. 34 in Anhang III).

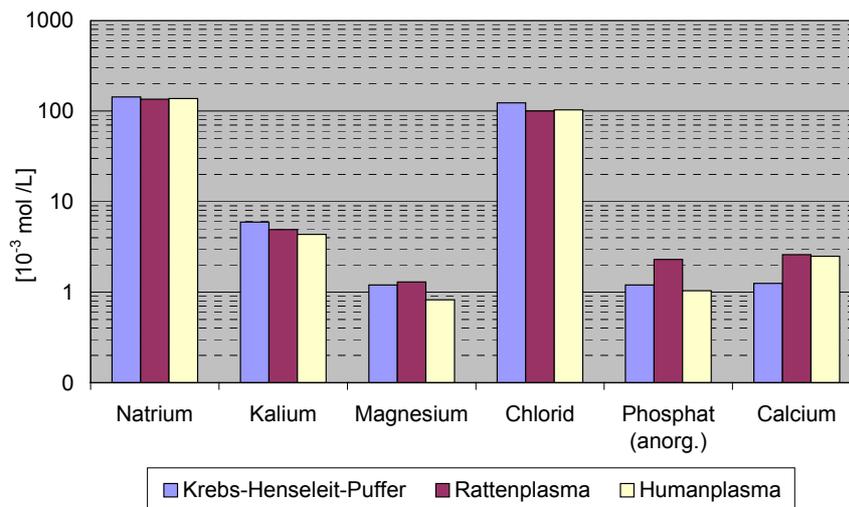


Abb. 19: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Puffer im Vergleich mit Ratten- und Humanplasma

Für den Puffer wurde *bideionisiertes*, membranfiltriertes Wasser verwendet, da Fremdionen bekanntermaßen die Konformation von Proteinen beeinflussen können (Hayakawa, 1989; Rick, 1990). Unter diesen Bedingungen wurden die Untersuchungsparameter der folgenden Hydrolyseexperimente simuliert.

Tab. 9 zeigt eine Übersicht der ermittelten Ergebnisse im Vergleich mit Literaturangaben und dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{O/W}$). $\log P_{O/W}$ wird häufig zur Abschätzung der Affinität eines Analyten zu biologischen Membranen und damit als Maß für die Bioakkumulation einer Substanz herangezogen. Er beschreibt modellhaft die Fähigkeit einer Substanz, Membran-Lipidschichten durch Diffusion passieren zu können und wird zur Beurteilung der Resorbierbarkeit einer Substanz aus dem Magen-Darm-Trakt genutzt (Hansch & Leo, 1979). Analytisch stellt der Koeffizient die Verteilung einer Substanz in einem gesättigten n-Octanol-Wasser-Lösemittelgemisch dar. Je größer der Koeffizient ist, desto höher ist in der Regel die Affinität zur organischen Phase:

$$\log(P_{O/W}) = \frac{c_O}{c_W}$$

c_O = Konzentration des Analyten in der n-Octanol-Phase
 c_W = Konzentration des Analyten in der wässrigen Phase

Tab. 9: Löslichkeit von Carbonsäureestern in Krebs-Henseleit-Puffer (Messwerte) im Vergleich mit Longland et al. (1977) in aqua dest. bei 37°C sowie dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$)

Substanz	Summenformel	$\log P_{OW}$	[nach Longland et al., 1977]		Messwerte
		Näherung ³	„mg /100 ml H ₂ O“	[mmol /L]	[mmol /L]
Ethylpropionat	C ₅ H ₁₀ O ₂	1,071	-	-	183,2 ± 36,2 (n = 5)
Ethylbutyrat	C ₆ H ₁₂ O ₂	-	600	56,8	-
Ethylvalerat	C ₇ H ₁₄ O ₂	1,939	-	-	11,30 ± 1,25 (n = 5)
Ethylisovalerat	C ₇ H ₁₄ O ₂	1,881	230	17,7	-
			-	-	13,90 ± 0,96 (n = 6)
Ethylcaproat	C ₈ H ₁₆ O ₂	-	3,2	3,19	-
Ethylheptanoat	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,807	17	1,07	-
			-	-	0,69 ± 0,18 (n = 7)
Ethylpelargoat	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	-	1,2	0,064	--
Ethylundecanoat	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	4,543	-	-	0,091 ± 0,0038 (n = 3)
Ethyllaurat*	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-	2,7	0,118	-
Ethylmyristat	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	5,845	-	-	0,064 ± 0,040 (n = 4)
Ethyltiglat	C ₇ H ₁₂ O ₂	1,904	-	-	16,10 ± 2,04 (n = 6)
Benzyltiglat	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	3,324	-	-	0,49 ± 0,06 (n = 4)
Benzylsalicylat	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	3,519	-	-	0,24 ± 0,02 (n = 4)
Benzylphenylacetat	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	3,475	-	-	0,21 ± 0,05 (n = 5)
Ethylphenylacetat	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	2,275	-	-	8,59 ± 1,41 (n = 4)
Methylphenylacetat*	C ₉ H ₁₀ O ₂	-	9	0,60	-
Ethylsalicylat	C ₉ H ₁₀ O ₃	2,319	-	-	1,83 ± 0,18 (n = 6)
Ethylcinnamat	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	3,099	-	-	1,60 ± 0,41 (n = 6)
Methyloctanoat	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,838	-	-	0,70 ± 0,06 (n = 6)
Heptylacetat	C ₉ H ₁₈ O ₂	-	-	-	0,86 ± 0,09 (n = 5)
Isoamylbutyrat	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,749	24	1,52	-
			-	-	0,88 ± 0,13 (n = 7)
Isoamylcaproat	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	-	1,5	0,081	-
Phenylacetat	C ₈ H ₈ O ₂	2,026	-	-	35,1 ± 1,94 (n = 4)
Phenylethylacetat*	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	-	126	7,67	-

Die Löslichkeit von Ethylestern mit linear gesättigter Acylkettenlänge wurde von 3 bis 14 Kohlenstoffatomen untersucht (Abb. 20). Sie weist mit 0,064 mM für Ethylmyristat (C₁₄) bis 183 mM für Ethylpropionat (C₃) auf große Unterschiede in den polaren Eigenschaften der Substanzen hin.

Mit zunehmender Kettenlänge des Acylrestes nimmt der unpolare Einfluss zu und führt zu ansteigender Hydrophobie des Moleküls. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Übereinstimmung mit Literaturangaben für die Löslichkeit in destilliertem Wasser ((Longland, 1977). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) und destilliertem Wasser bei 37 °C wurde nicht festgestellt.

Ethylvalerat und -isovalerat zeigen, unter Bezugnahme auf die Literaturangabe (Longland et al., 1977), keinen signifikanten Unterschied in der Löslichkeit. Ein polaritätsverändernder Einfluss von Verzweigungen in kurzkettigen Acylresten auf das Gesamtmolekül konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

³ Abschätzung mittels interaktivem logP-Kalkulator miLog 1.2

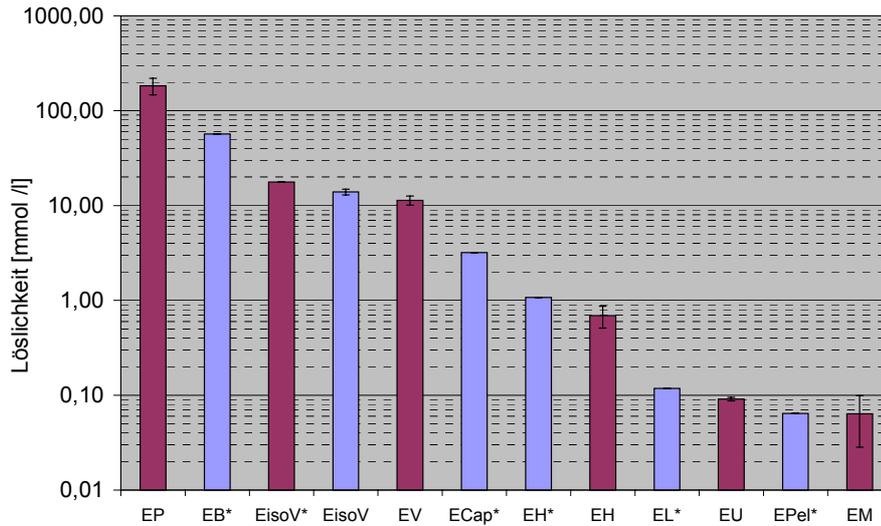


Abb. 20: Löslichkeit von Ethylestern mit aliphatisch linear gesättigtem Acylrest sowie Ethylisovalerat in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C im Vergleich mit Longland et al. (1977)

Aromatische Substituenten erhöhen den lipophilen Einfluss des jeweiligen Molekülrestes. Bei Ethylestern mit aromatischen Acylresten wurde ein deutlicher Abfall der Löslichkeit beobachtet (Ethylphenylacetat, -salicylat und -cinnamat). Substanzen, die aromatische Reste im Acyl- und Alkylrest aufweisen, besitzen dagegen deutlich hydrophobere Eigenschaften (Benzylphenylacetat und -salicylat; Ethyl- und Benzyltiglat), siehe Abb. 21.

Substanzen mit identischer Summenformel ($C_9H_{18}O_2$) zeigen ähnliche polare Eigenschaften. Mit zunehmender Kettenlänge steigt die Hydrophobie des Alkylrestes in der Reihenfolge Methyl octanoat → Ethylheptanoat → Isoamylbutyrat. In gleichem Maße nehmen die hydrophilen Eigenschaften des Acylrestes zu. Im Gesamtmolekül heben sich diese Einflüsse auf (Abb. 22).

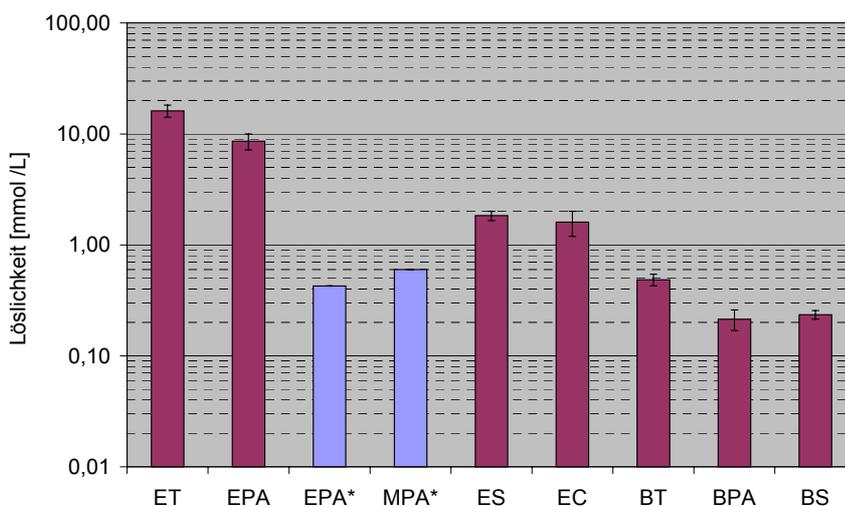


Abb. 21: Löslichkeit von Ethyl- und Benzylestern in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C im Vergleich mit Longland et al. (1977)

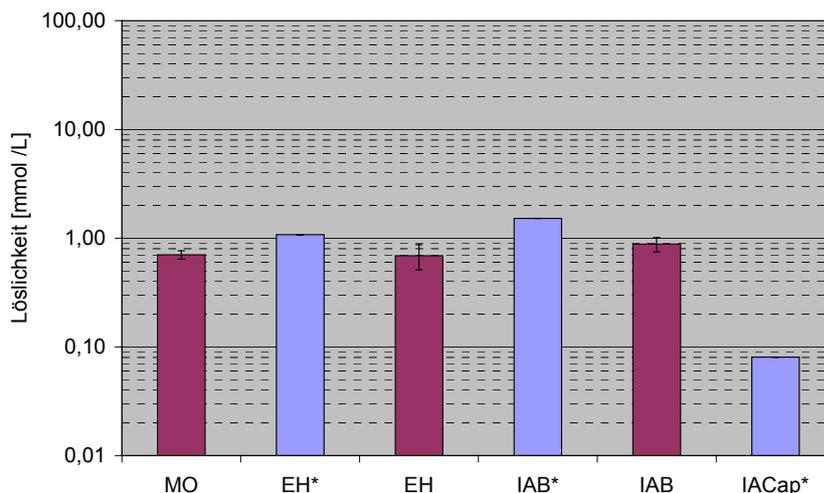


Abb. 22: Löslichkeit von Estern mit identischer Summenformel und unterschiedlicher chemischer Struktur sowie Isoamylcaproat (IACap) in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C (Messwerte) im Vergleich mit Longland et al. (1977) in Wasser bei 37°C

Anhand ihrer Löslichkeit gemäß Tab. 9 wurden die untersuchten Carbonsäureester den folgenden drei Löslichkeitsklassen zugeordnet:

- begrenzt löslich: Substanzen, in denen sich polarer und unpolarer Rest ausgleichen (Acyl- und Alkylreste mit niederen und mittellangen Kohlenstoffketten, einzelne aromatische Carbonsäuren): begrenzt löslich in Wasser, löslich in Ether,
- bedingt löslich: Substanzen, in denen sich polarer und unpolarer Rest ausgleichen, tendenziell ist der unpolare Einfluss erhöht (Acyl- und Alkylreste mit aromatischen Carbonsäuren, niederen und mittellangen Kohlenstoffketten): bedingt löslich in Wasser, löslich in Ether sowie
- minimal löslich: Ester, in denen der unpolare Rest im Acyl- oder Alkylrest überwiegt (> 6 Kohlenstoffatome, aromatische Carbonsäuren oder Alkohole): minimal löslich in Wasser, löslich in Ether.

Die Mehrheit der untersuchten Ester wurde als begrenzt oder bedingt löslich eingestuft. Besonders Ethylester mit kurzkettenigen Fettsäuren (< 6 Kohlenstoffatome) können übereinstimmend mit Literaturangaben (Jahreis, 1998 und Mills, 1999) als gut wasserlöslich bezeichnet werden. Im Bereich eines mittellanges Acylrestes (bis 10 Kohlenstoffatome; Goss, 1999) wurden bedingt wasserlösliche Eigenschaften nachgewiesen (Tab. 10).

Bei Ethylestern mit langkettigem Acylrest (> 10 Kohlenstoffatome) betrug die Löslichkeit < 0,10 mM (Savary, 1970). Für diese im Wässrigen minimal löslichen Substanzen war der Nachweis einer hydrolytischen Spaltung nur schwer möglich. Die große Schwankungsbreite der Ergebnisse resultiert aus der Nähe der Messdaten zur Nachweisgrenze.

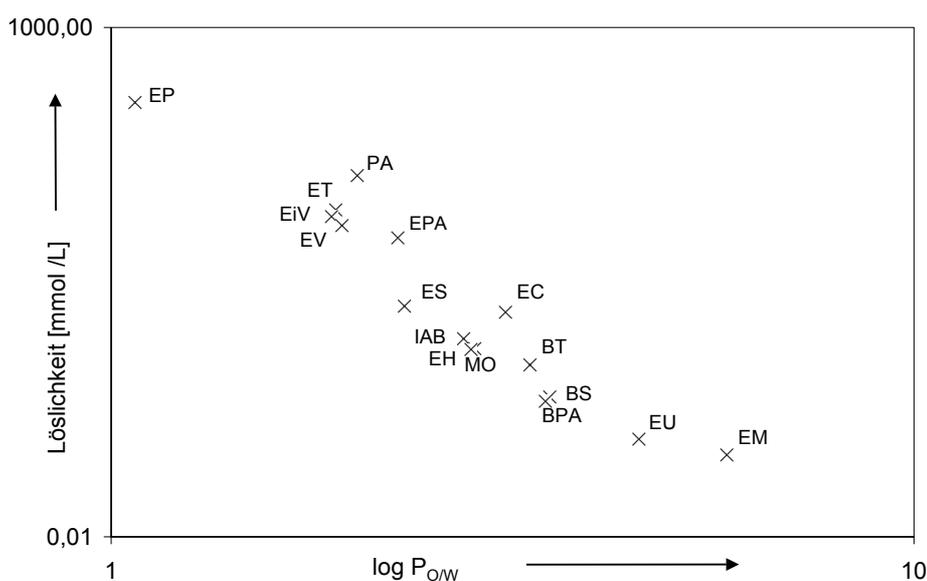
Tab. 10: Löslichkeit der untersuchten Carbonsäureester in Krebs-Henseleit-Puffer

Löslichkeitsklasse	Substanz	Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4; 37°C)
begrenzt löslich	Ethylpropionat	10 mM > Löslichkeit < 250 mM
	Ethylvalerat	
	Ethylisovalerat	
	Ethyltiglat	
	Ethylphenylacetat	
	Phenylacetat	
bedingt löslich	Ethylheptanoat	0,10 mM > Löslichkeit < 10 mM
	Ethylcinnamat	
	Benzyltiglat	
	Benzylsalicylat	
	Benzylphenylacetat	
	Methyloctanoat	
	Isoamylbutyrat	
minimal löslich	Ethylundecanoat	< 0,10 mM
	Ethylmyristat	

Zusätzlich lassen sich Aussagen über das Anreicherungsvermögen in biologischen Medien ableiten. Man unterscheidet nach Schäfer & Marquardt (2004) drei Gruppen:

- ($\log P_{OW} < 0,5$): nicht anreichernd bzw. schlechte Resorption aufgrund niedriger Lipophilität,
- ($0,5 \geq \log P_{OW} \leq 2$): leicht anreichernd bzw. gute Resorption sowie
- ($\log P_{OW} > 2$): stark anreichernd bzw. zunehmend geringe Resorption aufgrund schlechter Wasserlöslichkeit.

Außer Ethylpropionat, -valerat, -isovalerat und -tiglat besitzen alle untersuchten Ester mit einem $\log P_{OW} > 2$ eine starke Tendenz zur Anreicherung (Abb. 23). Für hydrophobe Ethylester (Acylrest $C_n > 6$) wurde von Laposata et al. (1989) eine Anreicherung im Fettgewebe von Ratten beschrieben. Die Substanzen werden im adipösen Gewebe gespeichert, gelangen nach und nach in den Blutkreislauf und zirkulieren über mehrere Stunden im Körper (Saghir et al., 1997).

**Abb. 23:** Schematische Darstellung der negativen Korrelation von Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (37 °C) und Hydrophobizität von Carbonsäureestern $\log P_{OW}$

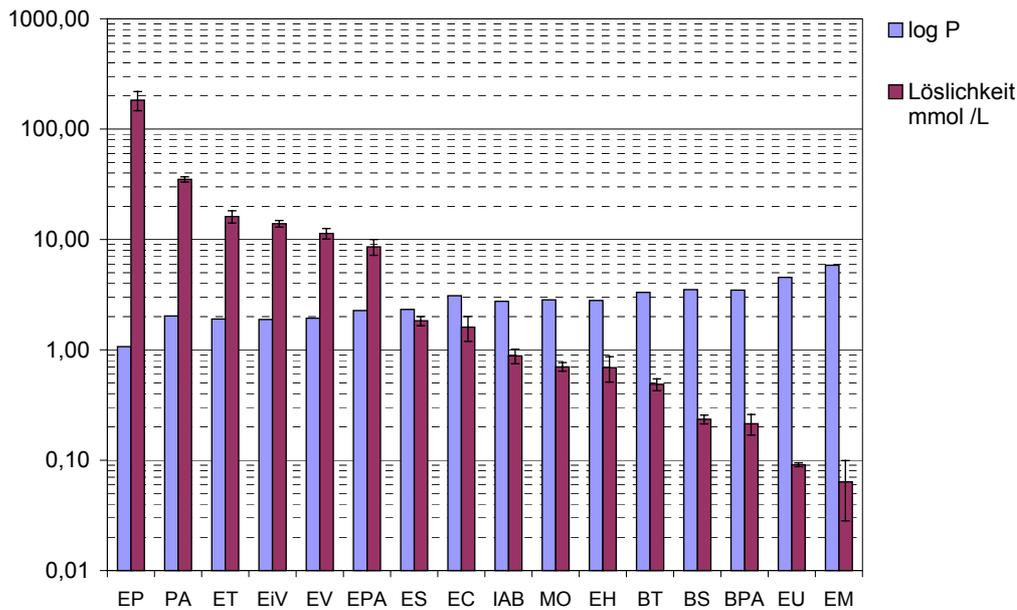


Abb. 24: Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (37 °C) und Hydrophobizität $\log P_{O/W}$ von Carbonsäureestern

Die Geschwindigkeit der Diffusion durch lipophile Zellmembranen steigt *nicht* parallel zu $\log P_{O/W}$. Bei sehr guter Verteilung und gleichzeitig sehr geringer Löslichkeit im Wässrigen reichern sich lipophile Substanzen in der Membran an (Dekant, 1994). Tab. 9 zeigt in Verbindung mit Abb. 24 die mit abnehmender Löslichkeit erwarteten ansteigenden Werte für $\log P_{O/W}$. Dieser Zusammenhang bestätigt zusätzlich die experimentell erhaltenen Ergebnisse für die Löslichkeit.

5.3 Plasmagewinnung

Blutplasma ist das zu Untersuchungen der Enzymaktivität oder auf dem Gebiet der Metabolismusstudien am häufigsten verwendete biologische Material außerhalb des klinisch-chemischen Bereiches. Vollblut oder Serum spielen als Untersuchungsmaterial eine untergeordnete Rolle. Vollblut besteht aus einer eiweißreichen Flüssigkeit, dem Blutplasma. Es macht ca. 55 % seines Gesamtvolumens aus. Daneben sind Erythrozyten (44 Vol %), Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten (zusammen ca. 1 Vol %) im Blut enthalten (Pschyrembel, 2001; Rapoport, 1987). Nach der Ausfällung des Fibrins im Plasma wird Blutserum erhalten. Dieser als Spontangerinnung bezeichnete Vorgang dauert mindestens 30 Minuten.

Im Vordergrund dieser Studie stand die Untersuchung der so weit wie möglich originären Esteraseaktivität im Plasma. Jeder Zeitverzug besonders bei Temperaturen über 4 °C würde zum Abfall der Enzymaktivität führen. In Anlehnung an die Methodik von McCracken (1993) wurde das Vollblut daher unmittelbar nach der Gewinnung auf 4 °C abgekühlt, 10 min gelagert und im Anschluss zentrifugiert, ohne die Kühlkette zu unterbrechen. Bei der Plasmagewinnung wird die Spontangerinnung durch den Zusatz eines Antikoagulans unterbunden. Calcium katalysiert mehrere Stufen der Thrombinbildung und damit die Blutgerinnung. Die Wirkung eines Antikoagulans besteht demnach im Entfernen entsprechender Ionen. Nur das verwendete

Heparinat bindet Calcium reversibel und zeitlich begrenzt. Es wird aus dem Plasma nicht entfernt. Eine Konformationsänderung, hervorgerufen durch eine veränderte Ionenzusammensetzung bei Plasmaproteinen, kann damit weitestgehend ausgeschlossen werden. Andere gerinnungshemmend wirkende Substanzen wie Citrate und EDTA (Komplexbildung) oder Oxalat und Fluorid (Ausfällung) entfernen Calciumionen dauerhaft aus dem Plasma und sind aus genannten Gründen für Metabolismus- oder Enzymaktivitätsbestimmungen ungeeignet (Englhardt, 1974; Peter, 1977; Rick, 1990). Plasma ist im Gegensatz zu Serum praktisch frei von Hämoglobin. Hämoglobin im Plasma zeigt die Lyse von Erythrozyten (Hämolyse) an und weist auf Störungen bei der Plasmagewinnung hin. Die Freisetzung des Zellinhalts von Erythrozyten führt zur Erhöhung der Kalium- und Phosphatkonzentration sowie der Aktivität verschiedener Enzyme (Rick, 1990). Hämolytisches Plasma wurde nicht für die Plasmapoolgewinnung verwendet. Ziel der Plasmagewinnung war es, mehrere Pools mit vergleichbarer Esteraseaktivität zu erhalten. Dabei wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die spezifische Enzymaktivität im Blutplasma berücksichtigt und wie folgt minimiert:

Interindividuelle Schwankungen

Mutch et al. (1992) quantifizierten die interindividuelle Schwankungsbreite der Esteraseaktivität verschiedener Enzyme im Humanblut. Mit Phenylvalerat und -acetat wurde die spezifische Esteraseaktivität mit 2,5 bis 16,2 (n = 113) und 38 bis 126 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ (n = 124) bestimmt. Die Untersuchung der interindividuellen Schwankung war nicht Gegenstand der Dissertation. Durch das Anlegen der Plasmapools wurde ein mittlerer Wert für die Esteraseaktivität ermittelt, der eine speziesspezifische Betrachtung von Ratte und Mensch ermöglichte. Generell wurde angestrebt, dass sich bei wiederholter Gewinnung von Humanplasma die selben Probanden zur Verfügung stellen. In Anlehnung an McCracken (1993) und Minagawa (1995) entstammten die Ratten dem gängigen Zuchtstamm Wistar/Hann und wurden aus der institutseigenen Tierzuchtanlage bezogen.

Geschlechtsspezifische Unterschiede

Geschlechtsspezifische Unterschiede sind bei der Ratte hinsichtlich der Carboxylesteraseaktivität (Gad, 1994; Robbi, 1983) und beim Menschen aus der klinischen Diagnostik bekannt (Feissli, 1966). In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich Blut männlicher Probanden verwendet. Alle Ratten waren männlichen Geschlechts.

Krankheitsspezifische Unterschiede

Organerkrankungen können zu einem erhöhten endogenen Enzymabbau (Proteinkatabolismus und Proteinresorption über das lymphatische System) führen und verändern damit das Enzymverteilungsmuster im Blutplasma und den Organen (Englhardt, 1966; Haug, 1969). Alle Probanden waren nach eigenen Angaben gesund. Die inneren Organe der Ratten wurden augenscheinlich begutachtet; es kam nur das Blut gesunder Tiere zur Anwendung.

Tagesschwankungen

Die Blutentnahme fand unter konstanten Bedingungen am nüchternen Probanden unter Ruhebedingungen statt, da Tagesschwankungen den Enzymspiegel nach körperlicher Belastung oder Nahrungsaufnahme verändern (Massarat, 1964; Otto, 1964). Die Entnahme von Rattenblut erfolgte einheitlich morgens, kurz nach Beginn des Tagrhythmus an der nüchternen Ratte.

Altersabhängige Schwankungen

Die männlichen Probanden wiesen ein weites Altersspektrum auf (Tab. 11). Die Humanpools repräsentierten damit die Esteraseaktivität eines mittleren Alters von $42,8 \pm 9,6$ bis $44,4 \pm 11,1$ Jahren. Solbach und Merten veröffentlichten 1965 eine umfangreiche Studie zur altersabhängigen Änderungen von Enzymaktivitäten im Humanblut. Dagegen konnten Williams et al. (1989) keinen signifikanten Hinweis auf eine altersabhängige Esteraseaktivitäten beim Menschen finden.

Tab. 11: Parameter zur Gewinnung von Humanplasma

Pool- Nummer	Anzahl der Probanden	Alter der Probanden [Jahre]					Blutvolumen je Proband [ml]	Plasmaausbeute [Vol %]	Proteingehalt [g /L]	
		Median	Min	Max	±					
(h) 002.003	10	44,4	±	11,1	41	30	66	ca. 70	ca. 35,4	$93,2 \pm 0,7$
(h) 014.704	14	44,6	±	12,2	43	23	67	ca. 70	ca. 42,1	$89,1 \pm 0,5$
(h) 020.504	16	42,8	±	9,6	41	23	59	ca. 130	ca. 38,2	$95,4 \pm 0,6$

Um diesen widersprüchlichen Angaben gerecht zu werden, wurde ein im Mittel vergleichbares Alter der Probanden angestrebt. Entsprechend entstammten die Ratten meist einem Wurf und hatten ein Alter von 60 bis 80 Tagen (Tab. 12).

Tab. 12: Parameter zur Gewinnung von Rattenplasma

Pool- Nummer	Anzahl der Tiere	Alter ¹ der Tiere	Haltungs- dauer ²	Körpergewicht ³ KG [g]		BlutVol ⁴ je Ratte [ml]	BlutVol ⁵ je g KG [ml]	Plasma- ausbeute [Vol %]	Protein- gehalt [g /L]
(r) 982.501	9	13 Wo.	14 d	k. A.	± k. A.	ca. 8,0	k. A.	ca. 35,0	$72,5 \pm 1,0$
(r) 982.903	3	15 Wo.	10 d	k. A.	± k. A.	ca. 10,0	k. A.	ca. 33,3	$68,9 \pm 0,7$
(r) 001.703	20	16 Wo.	6 d	526,5	± 47,1	ca. 11,6	ca. 0,022	ca. 49,4	$71,1 \pm 0,5$
(r) 003.602	23	12 Wo.	8 d	411,0	± 15,2	ca. 8,1	ca. 0,020	ca. 38,5	$61,5 \pm 0,2$
(r) 005.202	12	15 Wo.	27 d	454,0	± 25,6	ca. 8,8	ca. 0,019	ca. 45,7	$66,8 \pm 0,7$
(r) 011.501	10	17 Wo.	87 d	546,7	± 31,1	ca. 10,2	ca. 0,019	ca. 51,0	$68,2 \pm 0,6$
(r) 012.001	20	12 Wo.	25 d	380,2	± 23,4	ca. 9,1	ca. 0,024	ca. 53,6	$71,9 \pm 1,1$
(r) 015.002	11	10 Wo.	19 d	319,1	± 15,4	ca. 8,7	ca. 0,027	ca. 49,5	$61,1 \pm 1,8$
(r) 015.004	19	10 Wo.	21 d	326,2	± 19,2	ca. 9,0	ca. 0,028	ca. 53,0	$62,8 \pm 0,7$

1 Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme; 2 Haltungsdauer der Tiere vor Ort; 3 durchschnittliches Körpergewicht der Tiere am Tag der Plasmagewinnung; 4 gewonnenes Blutvolumen je Tier; 5 gewonnenes Blutvolumen bezogen auf das Körpergewicht der Tiere

Im Anschluss jeder Plasmagewinnung wurde der Proteingehalt nach *Lowry* bestimmt. Für beide Plasmaarten konnten gut reproduzierbare Proteingehalte ermittelt werden (Abb. 25 und Abb. 26). Zur Plausibilitätsprüfung wurden Literaturangaben zur physiologischen Zusammensetzung herangezogen (Tab. 13):

Tab. 13: Literaturangaben zum Proteingehalt von Ratte und Mensch

Plasmaart	Proteingehalt	Anmerkungen	Referenz
Rattenplasma	63,0 g /L	mittlerer Wert für erwachsene männliche Wistar-Ratten, ca. 3 Monate alt	Waynforth, 1992
Humanplasma	7,25 g /100 ml	Gesamtprotein	Biotest-Information, 2003 (www.biotest.de)
	6 - 8 g /100 ml	Gesamteiweiß	Buddecke, 1999; Schenk, 1990
	6,5 - 7,9 %	Gesamtprotein	Leuthardt, 1963
	60 - 80 g /L	Gesamtprotein, meist anionisch	Mairbäurl, 2001
	7 - 8 %	Eiweißkörper	Pschyrembel, 2001
	72 ± 7 g /L	Konzentration der Plasmaproteine	Rapoport, 1987

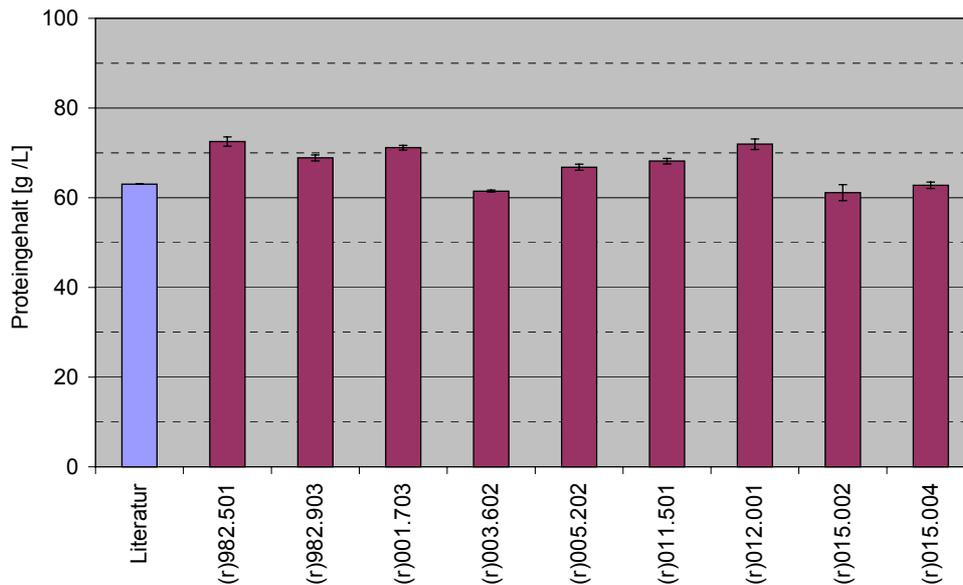


Abb. 25: Proteingehalt von Rattenplasma verschiedener Pools

Insgesamt wurden für Ratten –und Humanplasma gut reproduzierbare Proteingehalte bestimmt. Auffällig ist der um bis zu 19 % erhöhte Proteingehalt für Humanplasma im Vergleich mit Literaturangaben (Abb. 26). Da alle Messwerte gleichermaßen auf den Proteingehalt bezogen wurden, hebt sich dieser Einfluss beim Vergleich mit Ergebnissen in Humanplasma auf. Ursache könnte die Differenz in der Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Albumine sein, da die Fraktion V von Ratten- und Rinderserumalbumin im Gehalt von Tyrosin und Tryptophan gegenüber Humanserumalbumin eine bessere Übereinstimmung zeigt.

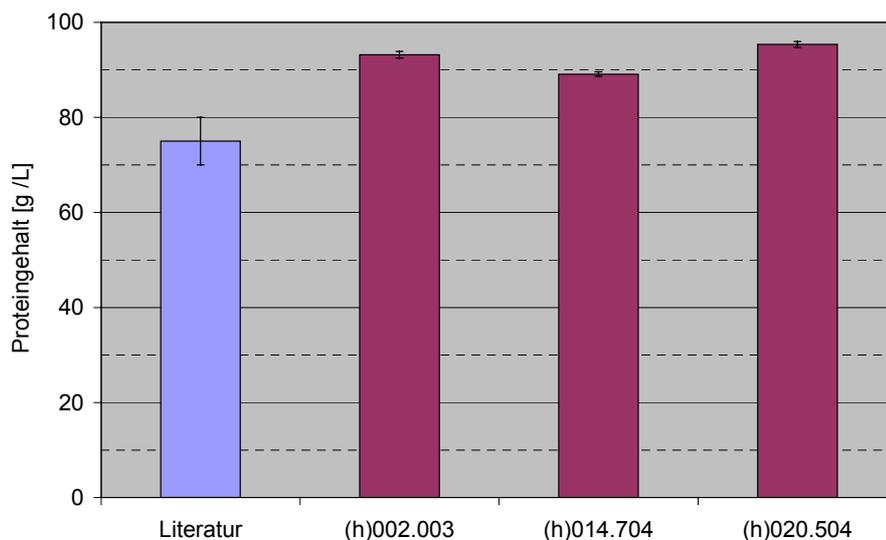


Abb. 26: Proteingehalt von Humanplasma verschiedener Pools

5.4 Validierung der Methode

5.4.1 Versuchsaufbau und Reagenzien

Die Bedingungen zur Ermittlung von Zeit-Umsatz-Kurven wurden in Anlehnung an die standardisierte Methode zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten (Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972) sowie unter Berücksichtigung der Vorschrift zur Durchführung der Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH (Amtsblatt der EG Nr. L 251/216 vom 19.9.84) festgelegt. Die allgemeinen Anforderungen zur Durchführung enzymatischer Analysen gemäß § 35 LMBG L 0.00 23 (1992) wurden berücksichtigt.

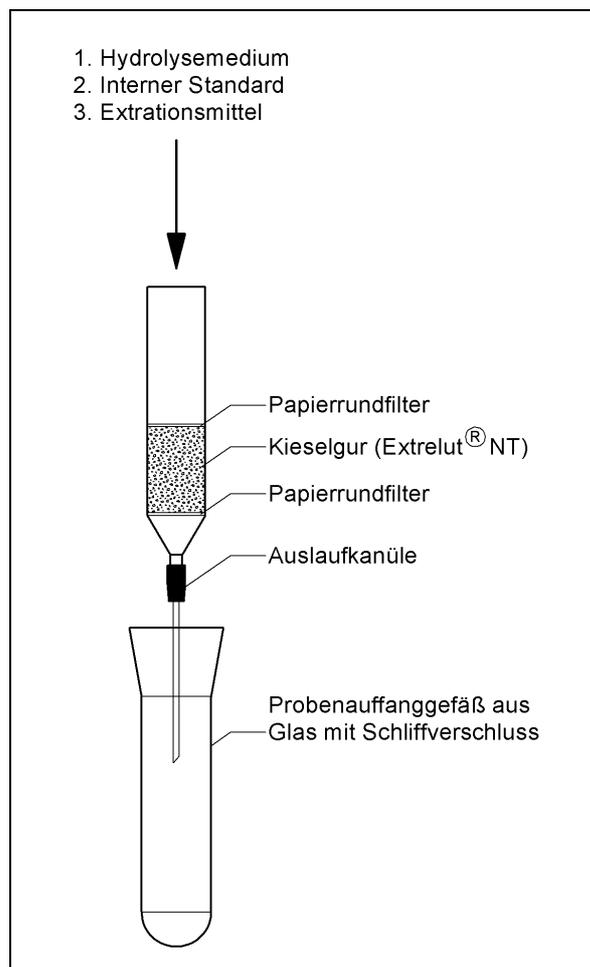


Abb. 27: Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Reinigung der Probe aus biologischem Material

Die minimale Reaktionszeit bei der Erfassung von Zeit-Umsatz-Kurven betrug 4 Minuten. Ester mit hoher Hydrolyserate wie Phenylacetat erforderten das Verdünnen von Blutplasma und Leberhomogenat. Als Lösemittel wurde Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) eingesetzt. Der Puffer ist hinsichtlich pH-Wert und mineralischer Zusammensetzung mit Blutplasma vergleichbar (Abb. 19 in Abschnitt 5.2). Die Inkubationstemperatur der Ester im biologischen Medium betrug

$37 \pm 1^\circ\text{C}$. Diese Temperatur simulierte die Körpertemperatur von Mensch (Normalwert Mensch: $36,5 - 37,8^\circ\text{C}$) und Ratte (Normalwert $\varnothing 38,1^\circ\text{C}$). Sie stellt einen mittleren Temperaturbereich dar und repräsentiert das Optimum für Enzyme mit Esteraseaktivität.

Die enzymatische Hydrolyse wurde unverzüglich nach der Probenahme durch das Aufgeben auf die Festphasensäule mit Extrelut[®] gestoppt (Abb. 27). Extrelut[®] ist ein weitporiges Kieselgur, das wässrige Proben vollständig aufnimmt. Mit den Lösemitteln Ethylacetat und n-Hexan wurden der Analyt vollständig eluiert, während Wasser, Salze und Proteine auf der Säule verbleiben. Anhand der Wiederfindungsraten wurde für alle Analyten demonstriert, dass dieses Verfahren für die Untersuchungszwecke geeignet ist (Anhang II, Tab. 33).

Die Inhibition der Esteraseaktivität wurde in Vergangenheit durch Zusatz von starken Säuren wie 4 N HCl oder 1,5 M H₂SO₄ (Albro, 1973), Fluorid (Arndt, 1973; Boyer, 1971; Toennes, 1999) Aceton (Werner et al., 1997) oder Physostigmin (Junge et al., 1979) beschrieben. Junge et al. (1979) zeigten anhand verschiedener Isoenzyme der Schweineleberesterase, dass Physostigmin einzelne Fraktionen der Isoenzyme in ihrer Aktivität kaum beeinträchtigt. Säuren können eine unerwünschte nichtenzymatische Esterhydrolyse induzieren und damit Messdaten verfälschen. Die Esteraseinhibition durch Fluorid bis 98 % erfordert eine Inkubationszeit von ca. 30 min. Darüber hinaus beschreibt Dahl (1987) ein aufwendiges Verfahren durch Zusatz von Isopropanol und Einfrieren in Flüssigstickstoff. Letztlich erwies sich das Abstoppen der Enzymreaktion durch Chemikalienzusatz als unpraktikabel und wurde verworfen.

5.4.2 Substratkonzentration

Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse bei enzymkinetischen Untersuchungen ist die exakte Vorlage einer definierten Initialkonzentration (Substratanfangskonzentration S_0). Diese wurde in der Hydrolysenlösung eingestellt, indem aus einer Substratstammlösung definierter Konzentration ein definiertes Volumen in die Hydrolysenlösung gegeben wurde, aus der sich S_0 rechnerisch ermitteln lässt. Diese Verfahrensweise erforderte ein für das Substrat geeignetes Lösemittel. Tab. 14 gibt eine Übersicht der gebräuchlichen Lösemittel, die zum Abstoppen von enzymatischen Reaktionen verwendet werden.

Tab. 14: Gegenüberstellung verschiedener Lösemittel für die Substratdotierung

Lösemittel	Substrat	Referenz	Anmerkung
Wasser	Ethylacetat	Gallaher, 1977	zu geringe Löslichkeit
Methanol (1 M)	Phenylacetat	Junge, 1979	als Hydrolyseprodukt Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht; Wechselwirkung mit Acyl-Transfer-Intermediat, non-kompetitiver Inhibitor
Ethanol	Acetate	Dahl, 1987;	als Hydrolyseprodukt Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht,
	Acrylate	McCarthy, 1977	Wechselwirkung mit Acyl-Transfer-Intermediat,
1-Butanol	Acetate	Greenzaid, 1971	Wechselwirkung mit Acyl-Transfer-Intermediat,
2-Butanol	-	Zollner, 1999	Acetylerase EC 3.1.1.6 – Inhibitor
Aceton	Acetate	Greenzaid, 1971	Denaturierungsmittel, als Lösemittel zu polar um hydrophobe Ester zu lösen
Acetonitril	Acetate	Yan, 1999	Denaturierungsmittel, als Lösemittel zu polar um hydrophobe Ester zu lösen
Dimethylsulfoxid	für Ames- und Mikrokernstest	Greenzaid, 1971	Denaturierungsmittel, als Lösemittel zu polar um hydrophobe Ester zu lösen
1,4-Dioxan	Acetate	Greenzaid, 1971; Zollner, 1999	keine Inhibitoreigenschaften; gute Löslichkeit aller Ester

Ester mit kurzkettigen Acyl- und Alkylgruppen sind schwach acide Lösemittel. Sie besitzen nucleophile Eigenschaften gegenüber der Acylgruppe des Acyl-Transfer-Intermediats. Greenzaid et al. (1971) beobachteten bei geringen Konzentrationen (Methanol < 0,5 M; Ethanol < 0,3 M; 1-Butanol < 0,1 M) eine Steigerung und bei höheren Konzentrationen eine Verringerung der Hydrolyserate. Methanol werden nonkompetitive Inhibitoreigenschaften zugeschrieben. Es bindet nicht an das freie Enzym sondern an den Enzym-Substrat-Komplex, woraus ein inaktiver Komplex entsteht, der nicht weiter reagieren kann.

In unserer Studie wurde 1,4-Dioxan als Substratlösemittel eingesetzt. Die Substanz erfüllte folgende Anforderungen:

- keine Inhibitoreigenschaften gegenüber Esterase (Greenzaid, 1971; Zollner, 1999),
- gute Lösungseigenschaften der Carbonsäureester,
- geringe Toxizität,
- geringes Denaturierungspotential.

Im nächsten Schritt stand die Minimierung des Volumens der Substratstamlösung im Vordergrund. Der Volumenanteil der Substratlösung im Hydrolyseansatz betrug 0,07 bis maximal 0,17 Vol %. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumenanteil des Lösemittels von 0,09 Vol % (Ethylmyristat) bis maximal 0,14 % (Ethylpropionat).

Maßgeblich für die Bewertung der Hydrolyserate der in Abschnitt 2.4 diskutierten enzymkatalysierten Reaktionen ist ausschließlich die Substratanfangskonzentration S_0 . Ein Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten verschiedener Substanzen ist nur möglich, wenn unter identischen Reaktionsbedingungen, einschließlich S_0 , gearbeitet wird. Um verlässliche und gut reproduzierbare Werte für K_m und V_{max} zu erhalten, sollte S_0 im Bereich $0,1 K_m$ bis $5 K_m$ liegen. Oberhalb dieses Konzentrationsbereiches ist praktisch kein Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit mehr messbar (Rapoport, 1987).

In Vorversuchen wurde durch Einzelbestimmungen ein Schätzwert für die zu erwartende Größe der *Michaelis-Menten*-Parameter ermittelt. Arndt (1973) wies bei der Hydrolyse von Methylbutyrat durch Carboxylesterase aus Rattenleber ab $S_0 > 10$ mM Substrathemmung nach. Andere Studien verwendeten ähnliche Konzentrationen: „0“ – 2 mM (Britt, 1992); 5 – 10 mM (Dahl, 1985); 0,5 – 4,0 mM (McCracken 46, 1993) oder 1 mM (Yan, 1999). Dagegen beschrieb Gallaher (1977) die Hydrolysierbarkeit von Ethylacetat in Rattenplasma mit $S_0 = 22,70$ mM. Acrylatester wurden mit $S_0 = 0.005 - 0.250$ mM und Carboxylesterase von Schweineleber untersucht (McCarthy, 1997).

5.4.3 Clean up

Bei den untersuchten Analyten handelt es sich um Carbonsäureester, Alkohole und Carbonsäuren (siehe Abschnitt 8.4, Tab. 25 und Tab. 26). Zunächst wurden die apolaren Analyten aus dem polaren Hydrolysemedium (Blutplasma, künstliche Magenflüssigkeit, Krebs-Henseleit-Puffer) säulechromatographisch an Extrelut[®] isoliert. Ziel der Extraktion war die quantitative Abtrennung der zu analysierenden Verbindung von der Probenmatrix und die Überführung in ein Medium, das zur gaschromatographischen Analyse geeignet ist. Bei der Extraktion wurde die wässrige Probe auf eine mit Extrelut[®] gefüllte Glassäule gegeben. Nach Zugabe des internen Standards auf die Säule wurden Analyt (Ester, Carbonsäure oder Alkohol)

und interner Standard mittels n-Hexan (Analyt: Ester) oder Ethylacetat (Analyt: Carbonsäure oder Alkohol) aus der wässrigen Phase extrahiert (siehe Abb. 27).

Die Carbonsäuren Propionsäure bis Octansäure sowie Tiglinsäure und Benzylalkohol stellen leichtflüchtige Substanzen mit Molgewichten von 74 g/mol bis 144,22 g/mol dar. Die stark polare FFAP-Phase (Polyethylenglycol-2-nitroterephthalsäureesterphase) ermöglichte eine direkte gaschromatografische Analyse dieser Substanzen aus der aufgereinigten Probe. Bei der Hydrolyse von Benzyltiglat wurden Benzylalkohol- und Tiglinsäure simultan bestimmt (Abb. 28). Benzylalkohol wurde im Vergleich zu Tiglinsäure mit ca. dreifach höherer Empfindlichkeit gemessen, die sich aus den durchschnittlichen Responsefaktoren für Benzylalkohol ($RF_x = 0,43$) und Tiglinsäure ($RF_x = 1,14$) ableiten lässt.

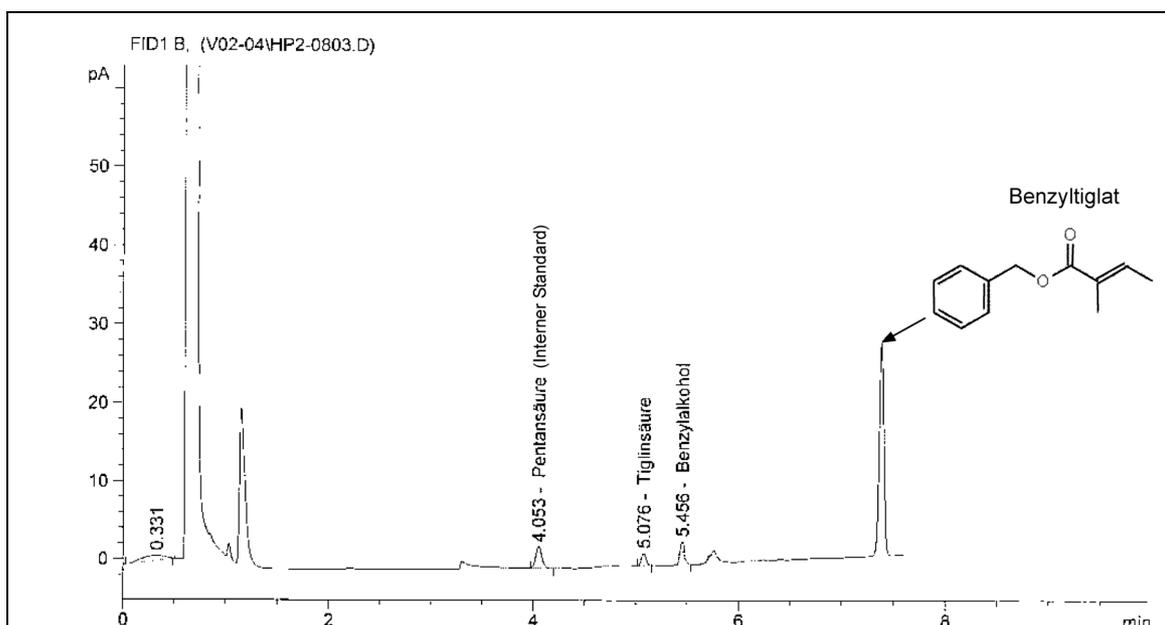


Abb. 28: GC-Chromatogramm mit MN permabond® FFAP-DF-0.25 (30m x 0,32 mm) für Tiglinsäure und Benzylalkohol aus der Hydrolyse von Benzyltiglat in Humanplasma (Plasmacharge: (h)020.504; $S_0 = 1,00$ mM; $t_i = 30$ min, Interner Standard Pentansäure 12,58 ng/ μ l; Extraktionsmittel: Ethylacetat)

Unpolare Carbonsäuren ($> C_8$) bis Myristinsäure (C_{14}) wurden mittels MN permabond® SE-52-DF-0.25 (5 % Diphenyl- 95 % Dimethylpolysiloxan) detektiert. Die Phase besitzt eine mittlere Polarität und zeigte gegenüber der FFAP-Säule insbesondere bei Undecan- Myristin- und Phenyllessigsäure eine verbesserte Empfindlichkeit. Nach einer Hydrolysezeit von 20 min in Humanplasma wurde aus Ethylphenylacetat bereits 17,8 ng/ μ L Phenyllessigsäure freigesetzt. Dagegen liegen bei der Hydrolyse von Ethylundecanoat in Humanplasma nach 30 min nur 3,35 ng/ μ L vor (Abb. 29). Ethylphenylacetat wurde demnach deutlich schneller als Ethylundecanoat in Humanplasma hydrolysiert.

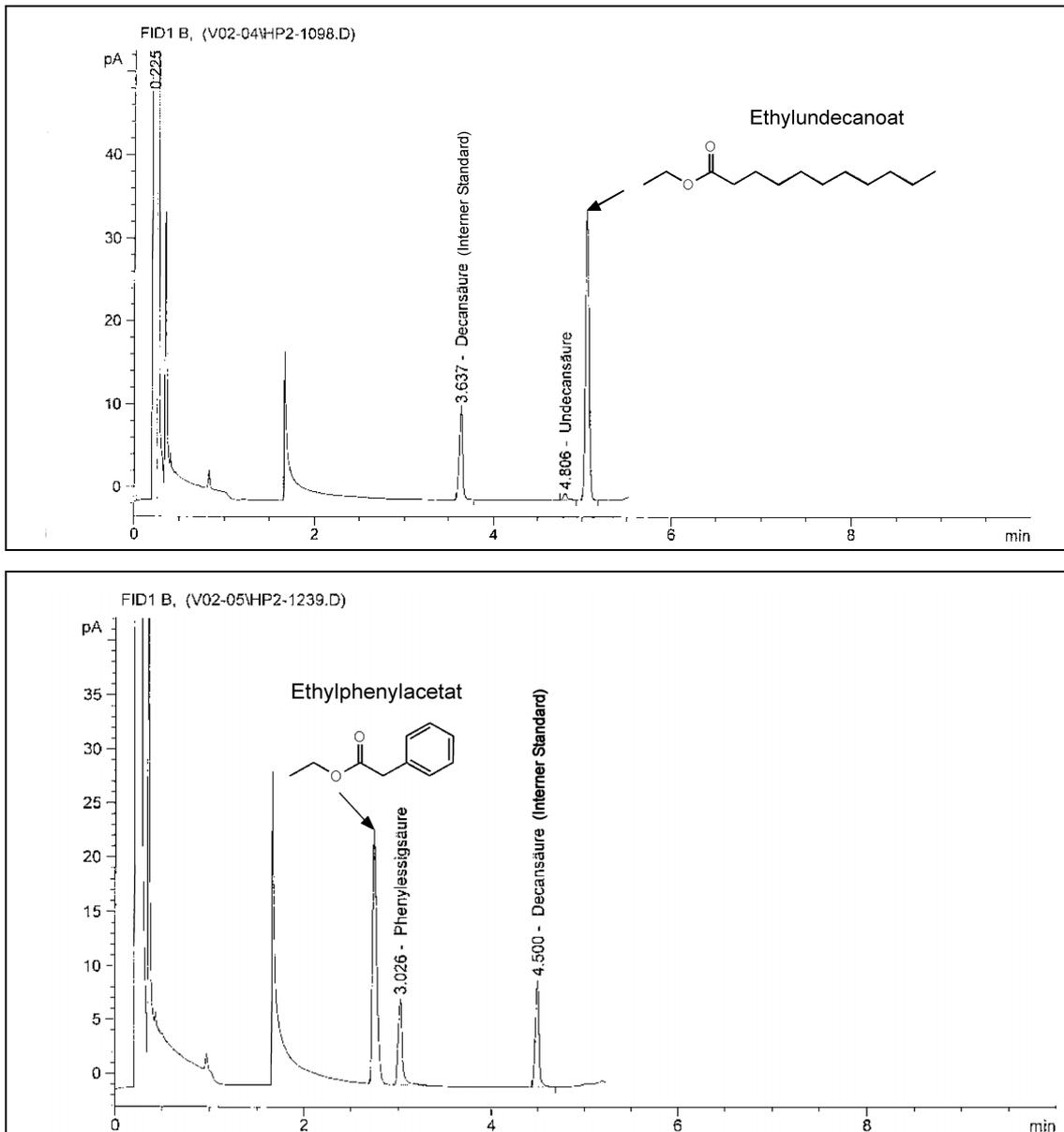


Abb. 29: GC-Chromatogramme mit MN permabond® SE-52-DF-0.25 (25m x 0,32 mm) für Undecan- und Phenyllessigsäure aus der Hydrolyse von Ethylundecanoat und Ethylphenylacetat in Humanplasma (Plasmacharge: (h)020.504; $S_0 = 1,00$ mM; $t_i = 30$ min und 20 min, Interner Standard Decansäure: 18,33 und 16,56 ng/ μ l; Extraktionsmittel: Ethylacetat)

5.4.4 Plasmapool und Lagerdauer

Die Studie erforderte die Gewinnung mehrerer Pools von Ratten- und Humanplasma. Die je Pool gewonnene Vollblutmenge wurde limitiert durch einen mit zunehmendem Blutvolumen steigenden Arbeitsaufwand. Nach maximal 2 Stunden sollte der Pool vorliegen und das Plasma bei -84°C gelagert sein. Im Anschluss wurde zur Überprüfung des Pools die spezifische Esteraseaktivität bestimmt. Auf diesem Wege konnte die Vergleichbarkeit der Pools hinsichtlich ihrer spezifischen Enzymaktivität sichergestellt werden. Die Kenntnis um die physiologische Variation einzelner Plasmapools sowie der Einfluss der Lagerdauer in Hinblick auf die

Haltbarkeit von Plasma für Enzymaktivitätsuntersuchungen spielte bei der Beurteilung der Vergleichbarkeit von Messdaten aus mehreren Pools eine bedeutende Rolle (Abschnitt 5.3). Ebenso musste eine allgemeine Lagerdauer des Plasmas bei -84°C festgelegt werden. Die Haltbarkeit von Plasma wurde definiert als Zeitraum, in dem keine wesentlichen Veränderungen in der Plasma-Zusammensetzung zu erwarten waren und demnach die Aktivität der Enzyme als konstant angesehen werden kann.

Bekannt ist, dass sich gereinigte Isoenzyme bei -80°C über Monate ohne Aktivitätsverlust lagern lassen (Hosokawa, 1990). Für Plasma- und Serumproben wird bei einer Lagertemperatur von -25°C eine maximale Aufbewahrungsdauer von 6 Monaten angegeben (Englhardt, 1974). Südhof und Wötzel (1960) haben eine außerordentlich rasche Inaktivierung der Esteraseaktivität von Serumproben festgestellt: 48 h bei 25°C bis zu -62% ; 4°C bis -42% . Demnach verlangsamt die Lagerung unter Kühlung den Aktivitätsabfall deutlich. Feissli (1966) untersuchte die temperaturbedingte Alterungsgeschwindigkeit von Plasmaproben und beobachtete ein deutlich verringertes Absinken der Enzymaktivität: 4°C : nach 3 Tagen Abnahme um 10% ; 25°C : nach 3 Tagen Abnahme um 20% . Der Normalbereich für Unterschiede wurde für verschiedene Enzyme mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Abb. 30 (Anhang IV, Tab. 43) zeigt den Verlauf der Esteraseaktivität von 1:100 verdünntem Rattenplasma während eines Arbeitstages bei 4°C . Die Abbildung zeigt, dass bei der gekühlten Lagerung von Rattenplasma bei 4°C über einen Zeitraum von 12 Stunden nicht mit einem merklichen Abfall der Hydrolyseaktivität gegenüber Phenylacetat zu rechnen ist. Dieses Ergebnis kann auf andere Substrate übertragen werden. Wir können daher Einflüsse während der Durchführung der Hydrolyseexperimente auf das Hydrolysemedium Plasma als nicht messbar vernachlässigen. Das Plasma zum Zeitpunkt $t = 1,00\text{ h}$ wird im Folgenden als „frisch“ bezeichnet. „Frisches Plasma“ wurde unmittelbar nach der Aufarbeitung von Vollblut gewonnen. Dieser Vorgang erforderte eine Arbeitszeit von ca. einer Stunde.

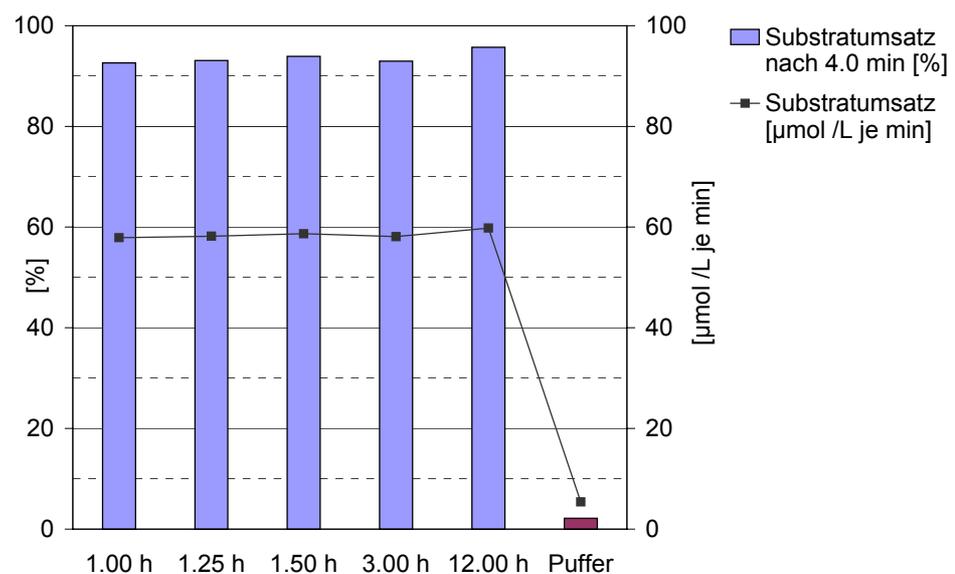


Abb. 30: Substratumsatz von Phenylacetat in Rattenplasma Pool (r) 015.004, 1:100 verdünnt

Zeitpunkt der Plasmagewinnung (1.00 h - „frisch“; $n = 1$) über einen Zeitraum von 12 h im Vergleich mit Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) $n = 5$, $S_0 = 0,25\text{ mM}$ (Lagerung bei 4°C)

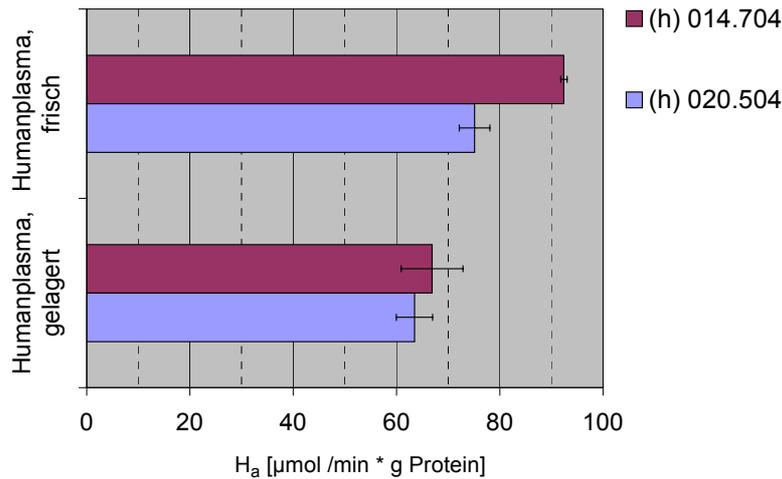


Abb. 31: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei Phenylacetat in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei -84°C

Pool (h) 014.704: „frisch“ und 8 Wochen gelagert; Pool (h) 020.504: „frisch“ und 12 Wochen gelagert

Die dargestellten Werte stellen Einzelbestimmungen dar, die einen Trend anzeigen. Über einen Zeitraum von 12 h wurde kein Abfall der Esteraseaktivität beobachtet. Im Vergleich dazu wurde jeweils ein Wert für Krebs-Henseleit-Puffer ($n = 5$) bestimmt. Die Umsatzrate im Puffer lag nach 4 min bei durchschnittlich 2,2 %; im Plasma bei 93,2 %. Die Hydrolyseaktivität verringert sich demnach bei der Lagerung über 12 h bei 4°C nicht. Die Veränderung der Enzymaktivität bei der Lagerung bei -84°C über mehrere Wochen hinweg zeigt Abb. 31 (Anhang IV, Tab. 42). Zu erkennen ist ein deutlicher Abfall der Hydrolyseaktivität um 27,6 % (h) 014.704 bzw. 15,5 % (h) 020.504. Am Beispiel der Hydrolyse von Phenylacetat in „frischem“ Humanplasma der Pools (h) 014.704 und (h) 020.504 wurden Aktivitätsunterschiede von bis zu 18,7 % nachgewiesen. Abb. 32 (Anhang IV, Tab. 42) weist auf einen substratspezifischen Abfall der Esteraseaktivität mit zunehmender Lagerdauer hin.

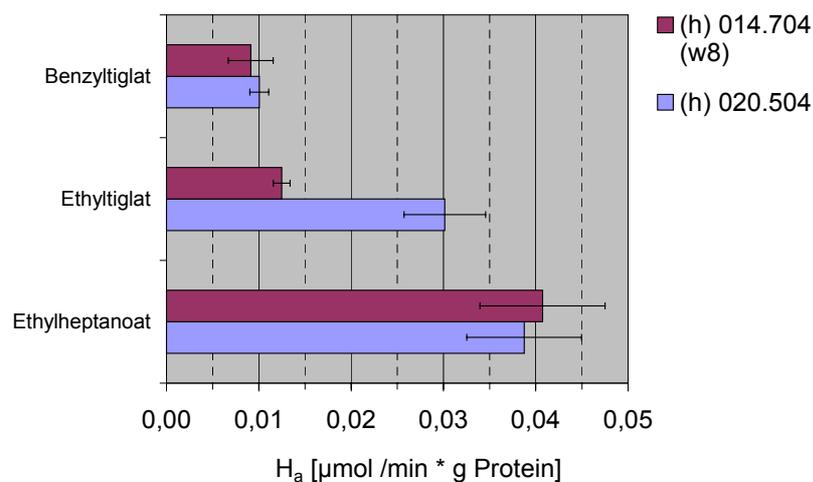


Abb. 32: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Pool (h) 020.504: „frisch“, Pool (h) 014.704: 8 Wochen gelagert bei -84°C , $n = 4$, $S_0 = 0,25\text{ mM}$

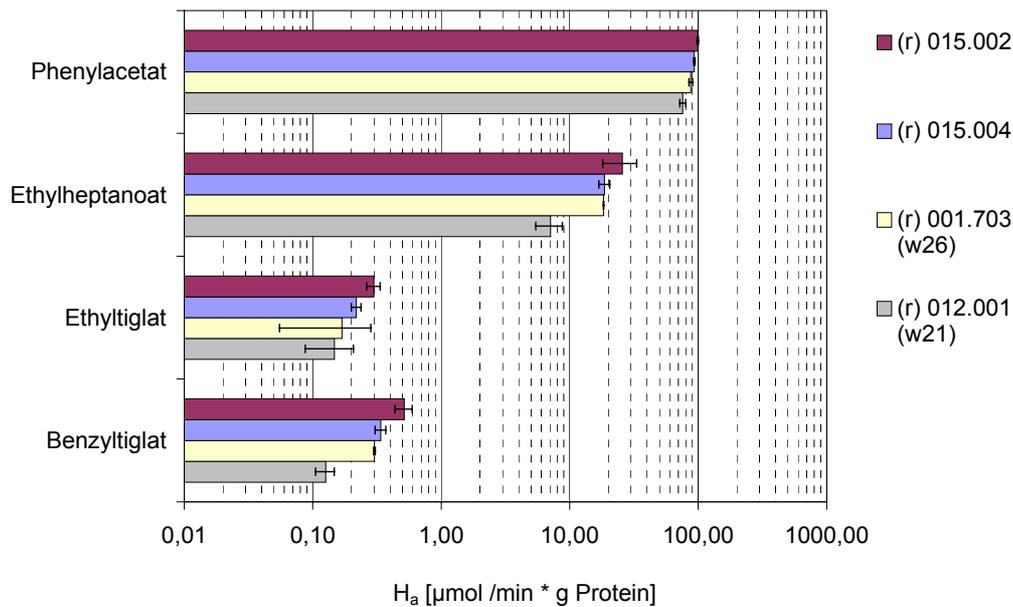


Abb. 33: Spezifische Hydrolyseaktivität von Rattenplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Logarithmische Darstellung (n = 4; S₀ = 0.25 mM): Pool (r) 015.004 sowie (r) 015.002 „frisch“, Pool (r) 001.703: 26 Wochen gelagert, Pool (r) 012.001: 21 Wochen gelagert, Lagertemperatur: -84°C.

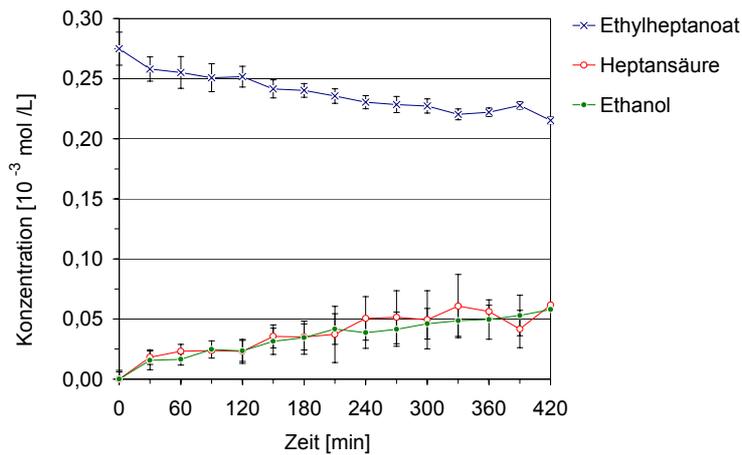
Diese kann bei einer Lagertemperatur von -84°C und einer Lagerdauer von 8 Wochen bis zu 59,7 % für Ethyltiglat betragen. Für Benzyltiglat und Ethylheptanoat wurde ein geringerer Abfall von 9,1 % und 10,9 % ermittelt.

Der mit zunehmender Lagerdauer substratspezifische Abfall der Hydrolyseaktivität wurde auch bei der Lagerung von Rattenplasma beobachtet. Abb. 33 (Anhang IV Tab. 41) zeigt eine im Mittel stets geringere Hydrolyseaktivität der 21 Wochen gelagerten Plasma-Charge (r)012.001 im Vergleich mit Charge (r)001.703, die 26 Wochen gelagert wurde. Diese Befund deutet auf interindividuelle Unterschiede beider Chargen hin, da eine höhere Esterase-Aktivität bei der Charge mit geringerer Lagerzeit - (r)012.001 - erwartet wurde. Insgesamt wurde der interindividuelle Anteil im Vergleich zur absoluten Differenz der Esterase-Aktivität verschiedener Substrate gemäß Abb. 33 als vernachlässigbar gering interpretiert. Bei einer Lagerung von mehr als 20 Wochen wurden für Phenylacetat, Ethyl- und Benzyltiglat sowie Ethylheptanoat deutlich verringerte Werte der Hydrolyseaktivität von Rattenplasma gefunden. Der Effekt ist im Vergleich mit der Lagerdauer von 8 Wochen bei Humanplasma deutlicher ausgeprägt. Zur Minimierung von Enzymaktivitätsverlusten bei der Plasmagewinnung wurden daher folgende Bedingungen festgelegt:

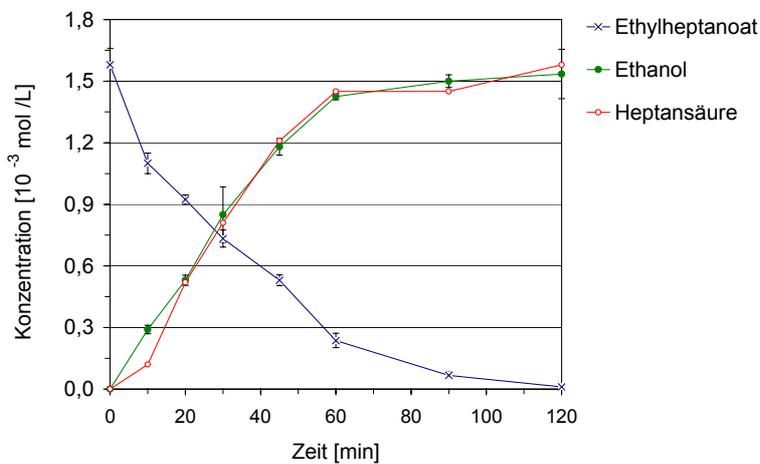
- Die Aufbewahrung von Blutplasma erfolgte unter Tiefkühlbedingungen bei -84°C.
- Die Lagerzeit für Blutplasma, das für Enzymaktivitätsuntersuchungen verwendet wurde, ist unter o.g. Bedingungen auf maximal 15 Wochen begrenzt worden.
- Die kritischen Phasen, die Enzymaktivitätsverluste besonders induzieren können, treten beim Einfrieren und Auftauen auf (Lindl, 1994). Um Aussalzeffekte im Plasma zu vermeiden, wurde besondere Sorgfalt auf diese Arbeitsschritte gelegt.

5.4.5 Generieren der Rohdaten

Im Rahmen der Validierung wurde die Vollständigkeit der Hydrolyse im biologischem Medium nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Substratkonzentration mit der äquimolaren Zunahme der Metaboliten einhergeht. Am Beispiel von Ethylheptanoat wurde der Hydrolyseverlauf zeitgleich mit der Abnahme der Esterkonzentration (Ethylheptanoat) und der Zunahme der Hydrolyseprodukte (Ethanol und Heptansäure) verfolgt. Die Hydrolysen wurden in Rattenplasma und künstlicher Magenflüssigkeit durchgeführt (Abb. 34, Tab. 35 und Tab. 36 in Anhang III).



Künstliche Magenflüssigkeit (pH 1,2), n = 3, S₀ = 0.25 mM



Rattenplasma, 1:100 verdünnt (pH 7,4), n = 3, S₀ = 0.25 mM

Abb. 34: Hydrolyse von Ethylheptanoat in künstlicher Magenflüssigkeit und 1:100 verdünntem Rattenplasma

Die Hydrolyse in künstlicher Magenflüssigkeit verläuft im Vergleich mit Rattenplasma nicht-enzymatisch und damit sehr langsam, da Pepsin proteolytisch wirkt und keine esterspaltende Aktivität besitzt. Für die zu untersuchenden Ester wurden Esterspaltprodukte mit guter Wiederfindung im proteinhaltigen und –freien Medium bestimmt (Anhang II, Tab. 33). Die Hydrolyseverläufe wurden anhand der Bildung eines Hydrolyseproduktes (Carbonsäure und/oder Alkohol)

quantifiziert. Eine Ausnahme bildet Phenylacetat, bei dessen Hydrolyse der Substratabbau anhand der Abnahme der Phenylacetat-Konzentration bestimmt wurde. Phenylacetat wird dabei in Phenol und Essigsäure gespalten. Phenylacetat war im Vergleich zu Essigsäure mit besserer Auflösung und niedrigerer Nachweisgrenze gaschromatographisch detektierbar.

5.5 Pharmakokinetische Parameter

5.5.1 Allgemeines

Die Messdaten wurden, vorbehaltlich anderer Angaben, als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten angegeben. In der Literatur wird oftmals der Standardfehler des Mittelwertes *Standard Error of the Mean (SEM)* verwendet (Bernhardt, 1996; Gad, 1994; Haber, 1993; McCracken, 1993; Williams, 1989; Saghir et al., 1999).

Die Angabe des SEM ist umstritten und wird entsprechend kritisch diskutiert (Bartko, 1985; Hopkins, 2000; Montgomery, 1994). SEM beschreibt die Variabilität von Mittelwerten aus Stichproben mit gleichem Stichprobenumfang (n) und ist ein Maß für die Präzision der Schätzung des Erwartungswertes durch den Mittelwert. Er wird berechnet aus der Standardabweichung (s) nach Division durch \sqrt{n} . Somit ist SEM stets kleiner als s , was vermutlich zu seiner „Beliebtheit“ beiträgt. Er lässt jedoch für die Beschreibung von Daten aus einer Stichprobe, im Gegensatz zu Quantilen oder s , keine unmittelbare Interpretation zu (Lange & Bender, 2001).

5.5.2 Berechnung der spezifischen Hydrolyseaktivität

Die spezifische Hydrolyseaktivität gemäß Abschnitt 2.5.1 wurde aus dem Gesamtsubstratumsatz (mol je Zeiteinheit) berechnet. Mit ansteigender Initialkonzentration S_0 wurde für jeden Ester eine zunehmende Umsatzrate beobachtet (Abb. 35, Anhang II, Tab. 31).

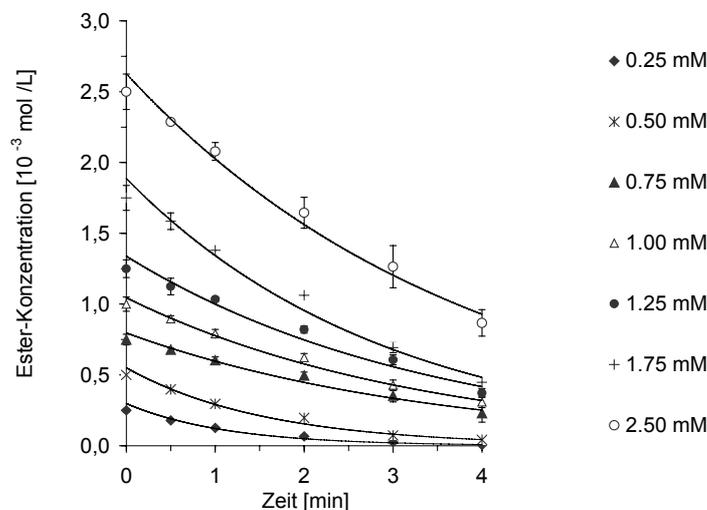


Abb. 35: Hydrolyseverlauf von Isoamylbutyrat in Humanplasma in Abhängigkeit von der Initialkonzentration des Esters

Die Proteinkonzentration des Blutplasmas verhält sich direkt proportional zur Enzymmenge mit hydrolytischer Aktivität. Daher wird die Umsatzrate auf die Proteinkonzentration bezogen. Die spezifische Hydrolyseaktivität wird mit der Einheit [mol /min · g Protein] angegeben.

Die Gesamthydrolysezeit wurde für jeden Ester in Abhängigkeit von der Produktbildungsgeschwindigkeit individuell unter folgenden Maßgaben bestimmt:

- Die Konzentration des ersten Messpunktes t_1 muss über der Bestimmungsgrenze der Methode liegen.
- Der Konzentrationsunterschied zwischen aufeinander folgenden Messpunkten muss so groß sein, dass keine Überschneidung der Vertrauensbereiche aus $n = 4$ resultiert.

5.5.3 Berechnung der Halbwertzeit

Die Berechnung der Halbwertzeit erfolgt entsprechend dem in Abschnitt 2.5.2 geschilderten Linearisierungsverfahren. Abb. 36 (Anhang II, Tab. 31) zeigt repräsentativ für alle Substrate eine mit zunehmender Substratkonzentration abnehmende Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma. Gemäß Gleichung 1 (Abschnitt 2.4.2) steigt damit die Halbwertzeit des Substrates im Hydrolysemedium.

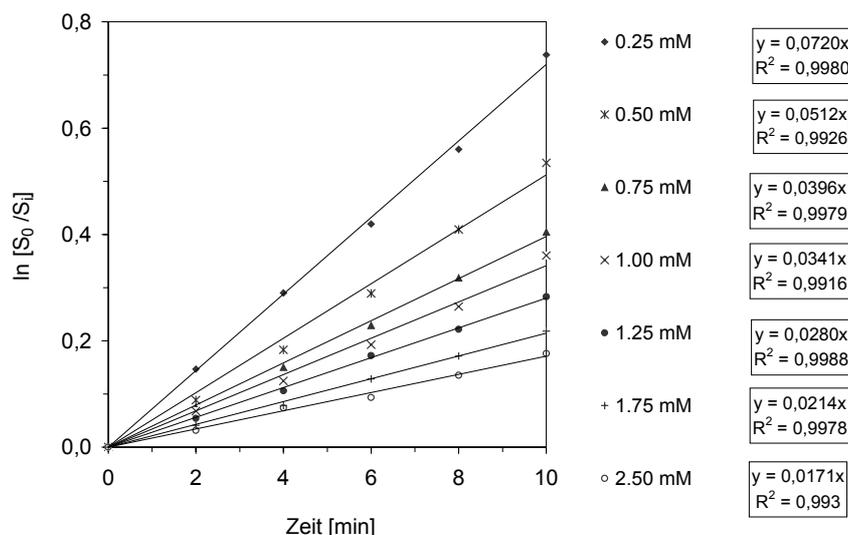


Abb. 36: Ableitung der Geschwindigkeitskonstanten aus der enzymatischen Hydrolyse von Ethylvalerat in Humanplasma in Abhängigkeit von der Initialkonzentration

5.5.4 Berechnung der kinetischen Parameter nach *Michaelis-Menten*

Die Initialgeschwindigkeit wurde nach der Reaktionsgleichung $S_i = S_0 \cdot e^{-k \cdot t_i}$ für jeden Hydrolyseverlauf nach dem Näherungsverfahren nach Gauß berechnet und daraus, in Abhängigkeit von der Initialkonzentration S_0 , die Initialgeschwindigkeit der Reaktion als negativer Anstieg der Tangente zum Zeitpunkt t_i abgeleitet (mathematischer Algorithmus aus

Abschnitt 2.5.3). Häufig wird in der Literatur der Zeitpunkt der Ableitung t_i unspezifisch mit „kurz nach Reaktionsstart“ angegeben. Bergmeyer (1979) schlug $t_i = 0.00$ vor.

Für unsere Studie wurde der Ableitungszeitpunkt $t_i = 0,10$ min wie folgt hergeleitet:

Abb. 37 illustriert den Tangentenverlauf für vier Zeitpunkte t_i : 0,00; 0,10; 0,20 sowie 0,50 min. Die Darstellung zeigt einen mit zunehmender Zeit stetig fallenden Anstieg bzw. abnehmende Initialgeschwindigkeit als Indikator für den Übergang der Reaktion 1. Ordnung in eine Reaktion nullter Ordnung. Die Initialzeit $t_i = 0.50$ min führt nach Extrapolation zu einer erheblichen Differenz zwischen S_0 und $S_{0.50}$. Sie kann demnach nicht als „Zeitpunkt kurz nach Reaktionsstart“ angesehen werden.

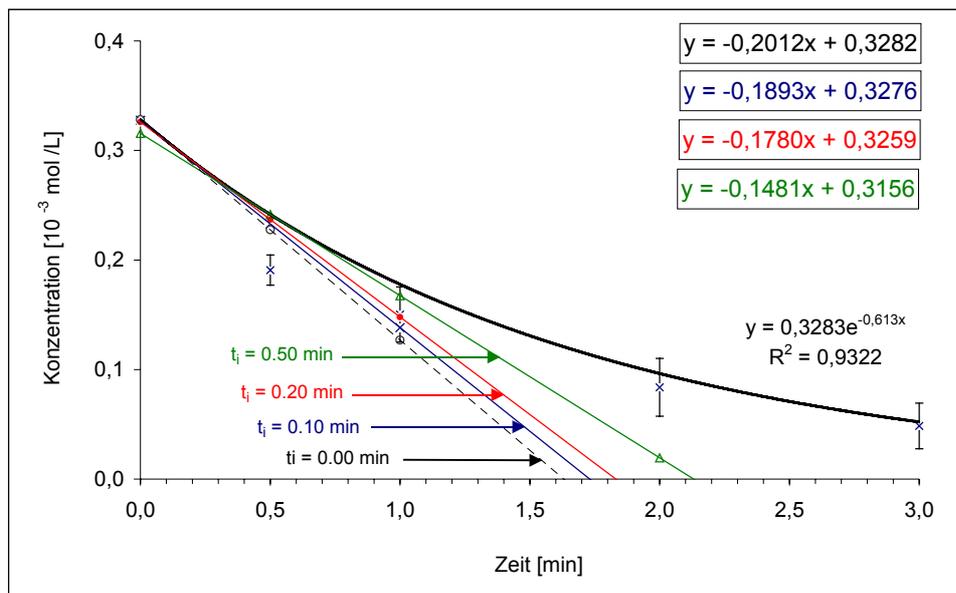


Abb. 37: Ableitung der Initialgeschwindigkeit für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma

($t_i = 0,00; 0,10; 0,20$ und $0,50$ min) in 1:100 verdünntem Humanplasma; $S_0 = 0,50$ mM

Die experimentelle Ausführung der Hydrolysen erforderte einen Zeitraum von ca. 6 Sekunden, um nach Substratzugabe ($t_i = 0,00$ min) und dem damit eingeleiteten Hydrolysestart eine gleichmäßige Verteilung des Esters im Hydrolysemedium zu gewährleisten. Die Substratverteilung im Hydrolysemedium war nach höchstens 6 Sekunden hergestellt. Aus diesen praktischen Erwägungen heraus und dem Ziel, die Zeit zur Ableitung der Tangente zu minimieren, wurde dieser Zeitpunkt auf einheitlich $t_i = 0,10$ min festgelegt.

Der Lineweaver-Burk-Plot in Abb. 38 (Anhang III, Tab. 39) lässt einen mit fortschreitender Initialzeit (0,00 min bis 0,50 min) zunehmenden Anstieg der Geraden um bis zu 32,4 % erkennen. Daraus resultiert ein Anstieg von K_m um 22,4 % sowie der Abfall von V_{max} um 14,8 %. Weitaus deutlicher sinkt dagegen der Quotient V_{max}/K_m (um -47,9 %).

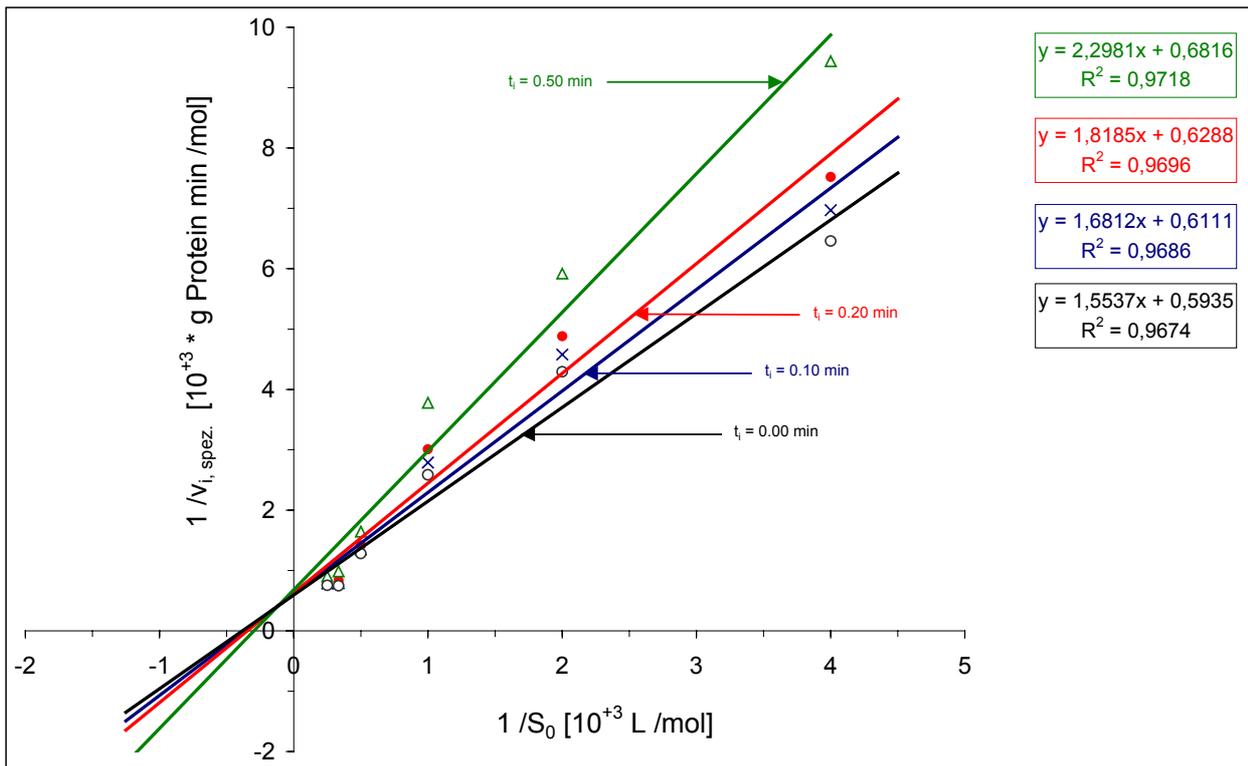


Abb. 38: Lineweaver-Burk-Plot für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma als Funktion der Initialzeit

Abb. 39 ermöglicht den direkten Vergleich kinetischer Parameter in Abhängigkeit der Initialzeiten 0,00 bis 0,50 min. Vergleicht man $t = 0,00 \text{ min}$ und $t = 0,10 \text{ min}$ miteinander, so wird eine geringfügige Differenz der *Michaelis-Menten*-Parameter deutlich. Diese hebt sich im Vergleich der Ester untereinander auf und bleibt ohne Einfluss auf die Interpretation der Hydrolysierbarkeit. Der Anstieg der Regressionsgeraden in der Lineweaver-Burk-Darstellung nimmt um 7,6 % zu, was zu einem Anstieg von K_m um 4,9 % sowie Abfall von V_{max} bzw. V_{max}/K_m um 2,9 % bzw. 8,2 % führt.

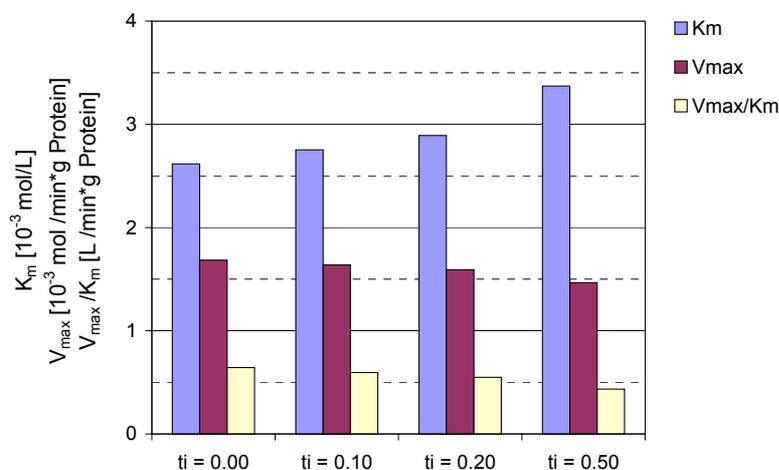


Abb. 39: Michaelis-Menten-Parameter für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma als Funktion der Initialzeit nach Lineweaver-Burk

Im Folgenden beziehen sich alle ermittelten kinetischen Parameter auf die **Initialzeit 0,10 min**. Abb. 40 und Abb. 41 (Tab. 37 und Abb. 38) zeigen verschiedene Regressionsverfahren zur Ableitung von *Michaelis-Menten*-Parametern. Der dargestellte Trend ist repräsentativ und lässt sich auf alle untersuchten Carbonsäureester übertragen.

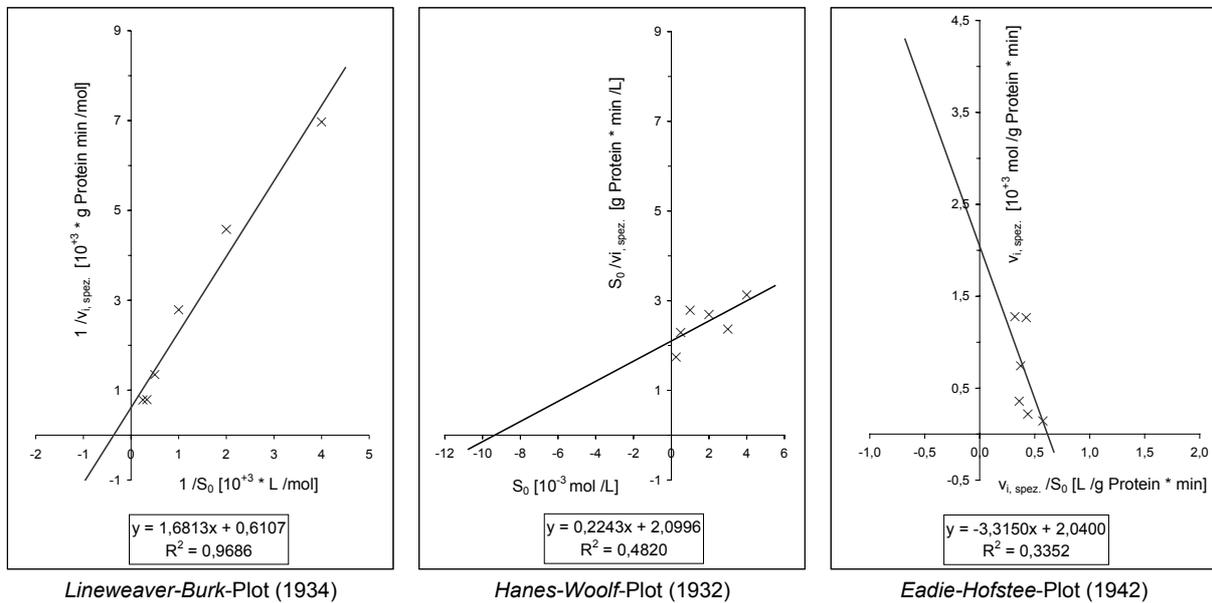


Abb. 40: Linearisierungsverfahren für die Hydrolyse von Phenylacetat in Humanplasma

Die Darstellung nach Cornish-Bowen erlaubt ausschließlich eine grobe Schätzung der K_m -Werte (Abszissenwert des gemeinsamen Schnittpunktes) und für V_{max} (Ordinatenwert des gemeinsamen Schnittpunktes). Abb. 41 zeigt jeweils ein Beispiel für einen schwer auswertbaren (Phenylacetat) und gut auswertbaren (Ethylphenylacetat) Plot.

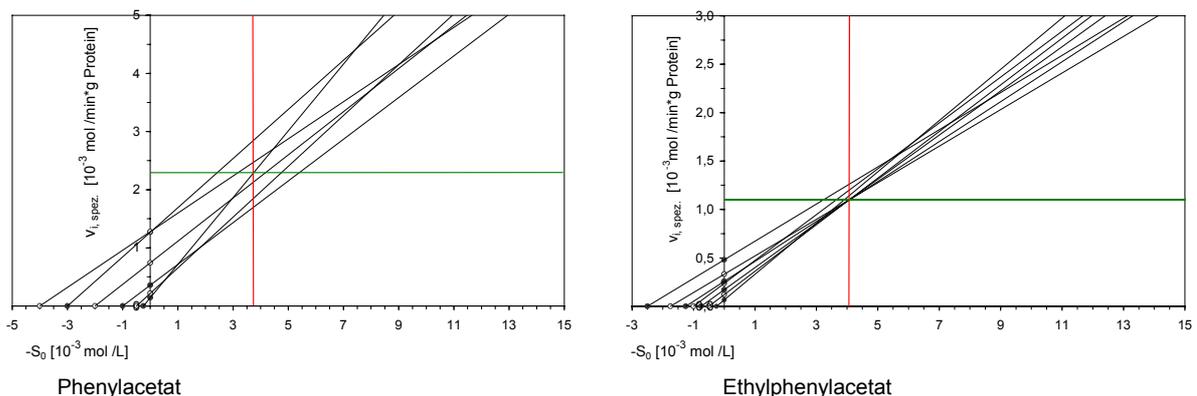


Abb. 41: Cornish-Bowen-Plot für die Hydrolyse in Humanplasma

Der resultierende Einfluss auf die Berechnung kinetischer Parameter ist in Abb. 42 (Tab. 38 und Tab. 39) dargestellt. Phenylacetat und Ethylphenylacetat geben einen Überblick über die Übereinstimmung der errechneten *Michaelis-Menten*-Parameter nach Lineweaver-Burk, Hanes-

Woolf, Eadie-Hofstee sowie Cornish-Bowen. Ungeachtet der großen Schwankungsbreite der K_m -Werte stimmen die berechneten Quotienten V_{max}/K_m aus allen Plots mit einem Variationskoeffizienten von 11,6 % (Phenylacetat) und 5,9 % (Ethylphenylacetat) gut überein.

Als Korrelationsparameter wurde das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden (R^2) herangezogen. R^2 ist das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten, ein dimensionsloser Index mit dem Wertebereich $-1,0 \leq r \leq 1,0$. Er ist ein Maß dafür, inwieweit zwischen zwei Datensätzen eine lineare Abhängigkeit besteht. Der Lineweaver-Burk-Plot zeigte für alle untersuchten Ester die beste Übereinstimmung und wurde daher einheitlich zur Berechnung der *Michaelis-Menten*-Parameter verwendet.

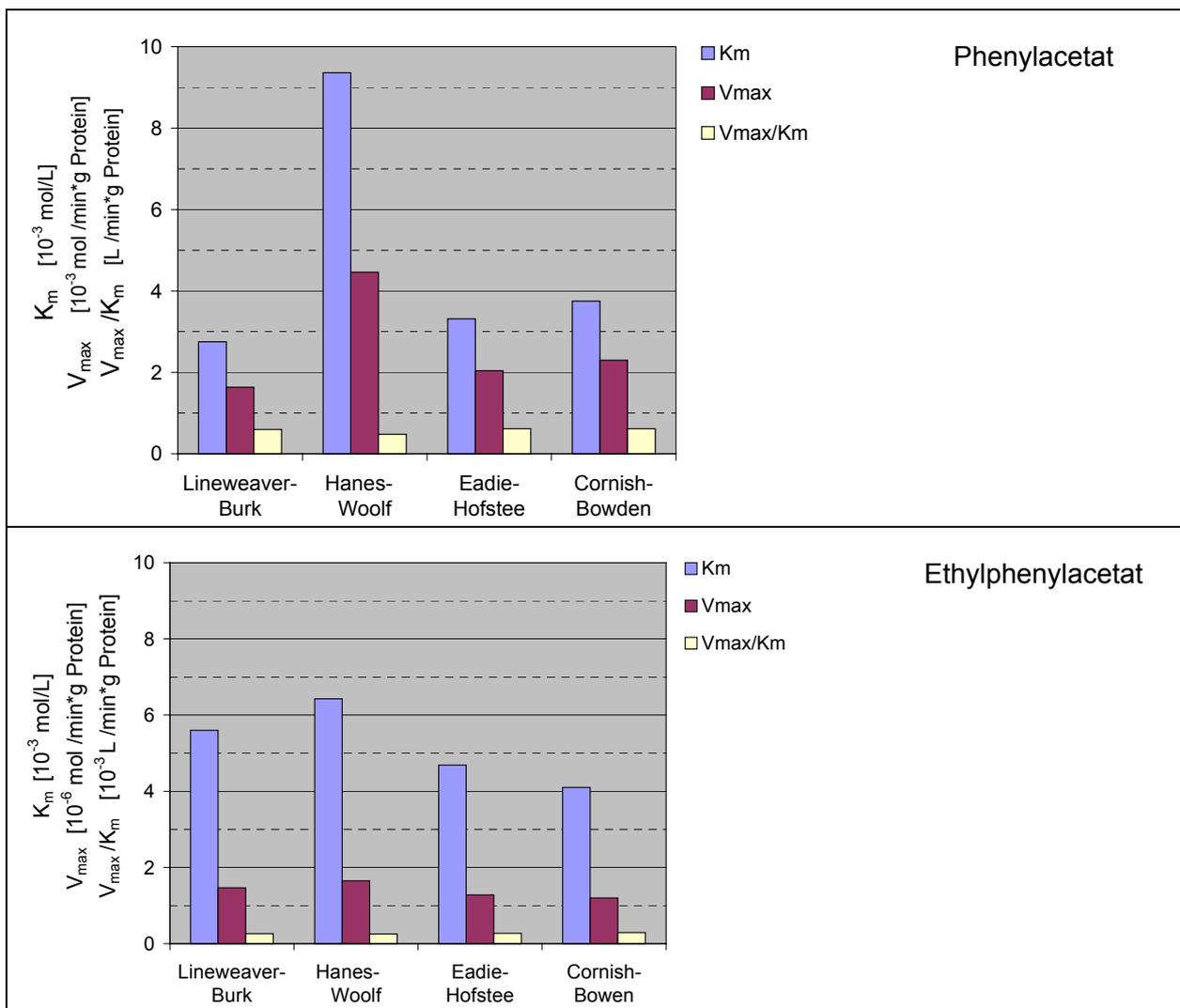


Abb. 42: Kinetische Parameter in Abhängigkeit von der Darstellungsform für die Hydrolyse von Phenylacetat und Ethylphenylacetat in Humanplasma

Nach dem beschriebenen Verfahren wurde im Vorversuch die Methode validiert. Die Abhängigkeit kinetischer Parameter von der Enzymkonzentration ist bekannt. V_{max} steigt mit zunehmender Enzymmenge je Volumeneinheit. Dagegen ist K_m als substratspezifische Größe unabhängig von der Enzymkonzentration. Der Quotient V_{max}/K_m kann aufgrund seiner Unab-

hängigkeit von der Enzymkonzentration als besonders geeigneter Parameter zur Beschreibung der Hydrolysierbarkeit angesehen werden. In der Literatur ist er als gebräuchliche Kenngröße für die Substratempfindlichkeit innerhalb eines enzymatischen Systems verbreitet (McCarthy & Witz, 1996). Diese Zusammenhänge konnten in Voruntersuchungen experimentell bestätigt und grafisch dargestellt werden (Abb. 43, Anhang III, Tab. 40).

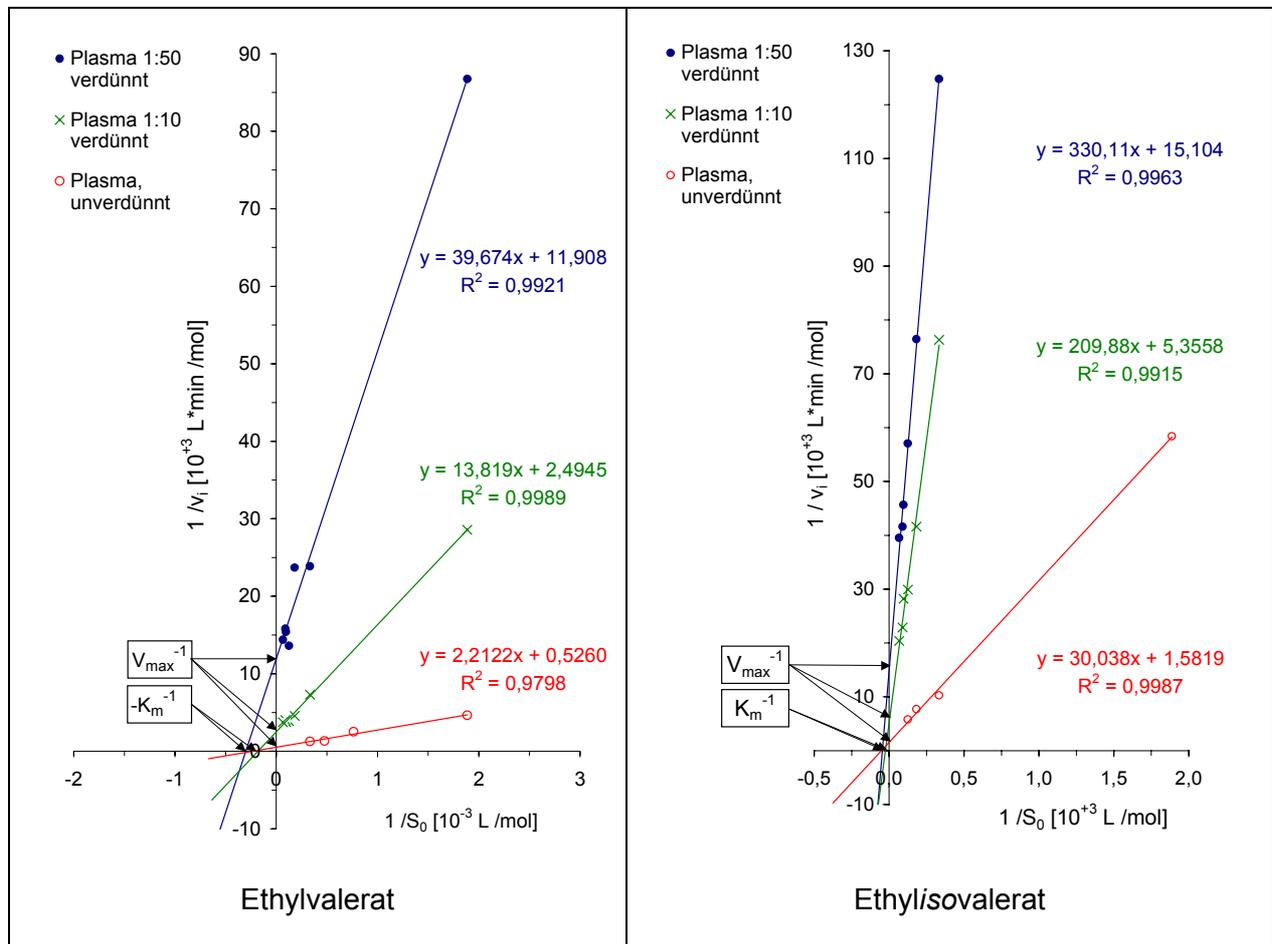


Abb. 43: Lineweaver-Burk-Plot für die Hydrolyse von Ethylvalerat und Ethylisovalerat in Rattenplasma in Abhängigkeit von der Plasma-Verdünnung

Die schnellere Hydrolysierbarkeit von Ethylvalerat kommt im Vergleich mit Ethylisovalerat im erhöhten Wert für V_{\max} zum Ausdruck. Dagegen zeigt Ethylisovalerat einen deutlich erhöhten Wert für K_m (Abb. 44, Anhang III, Tab. 40).

Folgende Zwischenergebnisse zur Methode der Messdaten-Auswertung wurden festgehalten:

- Die Initialzeit „kurz nach Reaktionsstart“ wurde einheitlich mit $t_i = 0.10$ min festgelegt.
- Als geeigneter Algorithmus zur Berechnung der kinetischen Parameter nach *Michaelis-Menten* wurde das doppeltreziproke Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk herangezogen ($1/v_i$ über $1/S_0$).

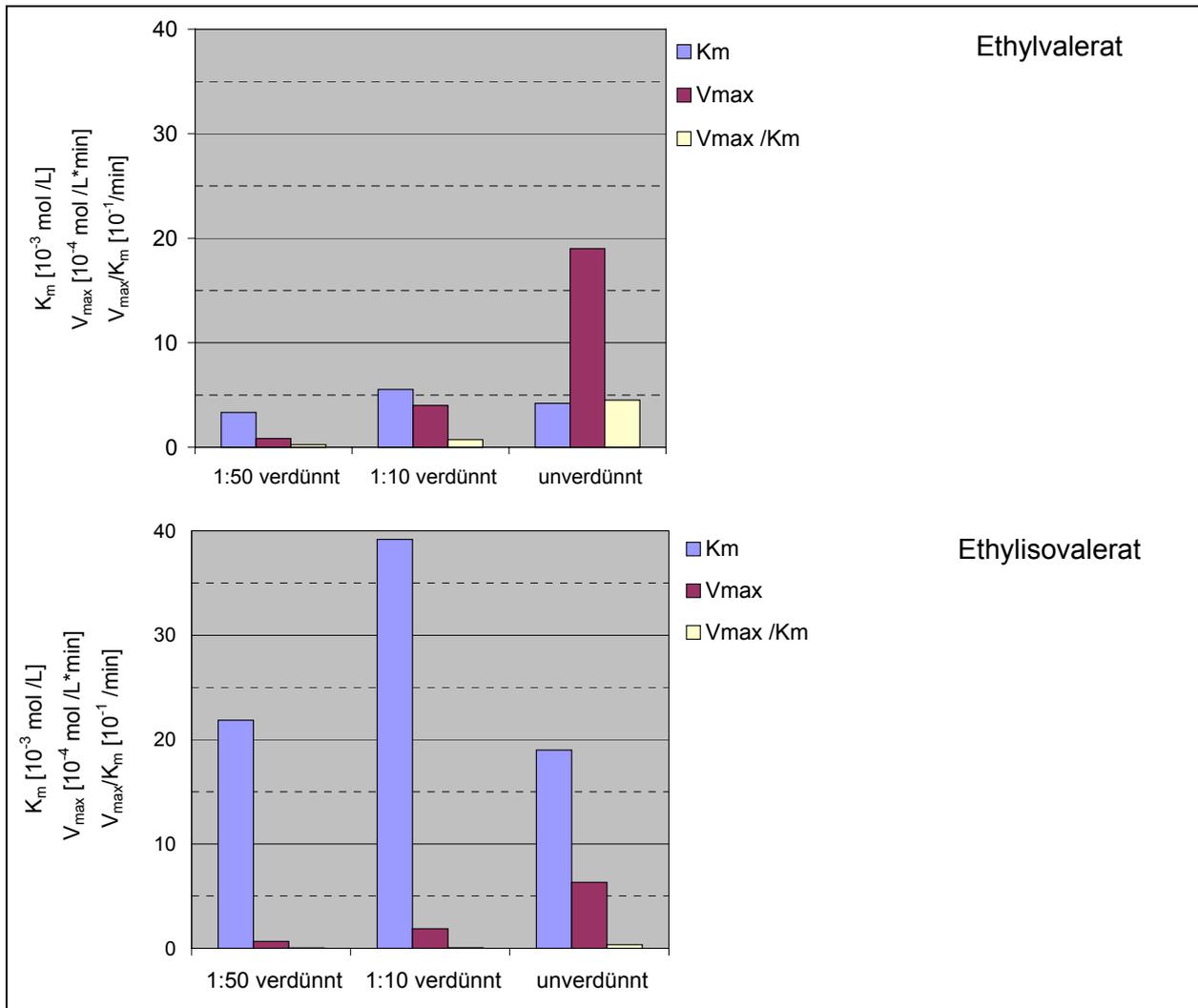


Abb. 44: *Michaelis-Menten-Parameter* für die Hydrolyse von Ethylvalerat und Ethylisovalerat in Rattenplasma in Abhängigkeit von der Plasma-Verdünnung (nach *Lineweaver-Burk*)

5.5.5 Phenylacetat als Referenz mit schnellster Hydrolysierbarkeit

Phenylacetat wird aufgrund seiner guten Hydrolysierbarkeit als Marker für Arylesteraseaktivität im biologischen Medium verwendet (Child et al., 1971; Dahl & Miller, 1985; Mutch et al., 1992; Stoops et al., 1969). In dieser Studie wurde Phenylacetat als Vergleichssubstanz eingesetzt, da aufgrund seiner schnellen Hydrolysierbarkeit bereits geringe Änderungen der Esteraseaktivität von Ratten- und Humanblutplasma sowie Rattenleberhomogenat angezeigt wurden.

Biologisches Material wurde verworfen, wenn ein statistisch gesicherter Abfall der Esteraseaktivität ($n = 4$) um 10 % detektiert wurde. Der Hydrolyseansatz aus Blutplasma oder Rattenleberhomogenat wurde generell 1:100 mit Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) verdünnt. Die Aufzeichnung eines Hydrolyseverlaufs mit höherer Enzymkonzentration war nicht möglich, da die Vollständigkeit der Hydrolyse vor der ersten Probenahme (0,5 min) bereits erreicht war. Ein Vergleich mit anderen Substraten war möglich, da die Ergebnisse aus der Berechnung der Hydrolyseaktivität und V_{max} auf den Proteingehalt des Hydrolysemediums bezogen wurden. Die Parameter lauten entsprechend spezifische Aktivität und spezifische Geschwindigkeit.

Tab. 15: Pharmakokinetische Parameter für Phenylacetat in Humanplasma

S_0 [min]	spezifische Hydrolyseaktivität $H_{a, \text{spez.}}$ [mol /min g Protein]	Halbwertszeit ⁴ $t_{1/2}$ [min]
0,25	$0,67 \pm 0,03 \cdot 10^{-4}$	$0,80 \pm 0,23$
0,50	$1,31 \pm 0,04 \cdot 10^{-4}$	$0,91 \pm 0,15$
1,00	$2,73 \pm 0,02 \cdot 10^{-4}$	$0,67 \pm 0,05$
2,00	$4,96 \pm 0,11 \cdot 10^{-4}$	$1,13 \pm 0,07$
3,00	$7,45 \pm 0,55 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \pm 0,23$
4,00	$8,66 \pm 0,25 \cdot 10^{-4}$	$2,06 \pm 0,21$

Michaelis-Menten-Parameter: $(S_0 = 0,25 - 2,50 \text{ mM})$ $V_{\text{max}} = 1,66 \pm 0,35 \cdot 10^{-3} \text{ mol /min g Protein}$ $K_m = 2,83 \pm 0,78 \text{ mM}$

Die Substratanfangskonzentration von 0,25 mM bis 4,00 mM wurde in Anlehnung an eine Studie mit Lebermikrosomen und Lebercytosol übernommen (McCracken et al., 1993 und 1993a). Enzymatisch katalysierte Hydrolysereaktion, die einer Reaktionsordnung ersten Grades gehorchen, gehen in der Regel bei $S_0 > 5K_m$ in eine Reaktion nullter Ordnung über. Oberhalb dieser Konzentration hat die Substratkonzentration kaum noch Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Rappoport, 1987). Der für K_m ermittelte Durchschnittswert von 2,83 mM ergibt, multipliziert mit dem Faktor 5, eine Substratanfangskonzentration von 14,1 mM. Darüber hinaus stellten Dahl & Miller (1985) bei $S_0 > 10 \text{ mM}$ keinen weiteren Anstieg der Initialgeschwindigkeit fest, was als beginnende Substrathemmung interpretiert werden kann.

5.6 Vergleich verschiedener physiologischer Medien

Im Körper von Menschen und Säugetieren tragen alle Gewebe und Körperflüssigkeiten mehr oder weniger zur enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern bei. Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt und Blut verfügen dabei über die größte hydrolytische Aktivität (Boyer, 1971; Fabelbum & James, 1979, Knaak, 1995; Silverman, 1995). Charakteristisch und umfangreich untersucht sind speziesspezifische Unterschiede (Buchwald & Bodor, 1999; Dahl, 1987; Hosokawa et al., 1990; McCracken et al., 1993; Minagawa et al., 1995; Satoh, 1998). Die dabei geläufigsten biologischen Medien wurden bereits in Abschnitt 3.3 erläutert.

Ein Ziel unserer Studie war der Vergleich unserer Methode mit Literaturangaben zu Hydrolysestudien aus verschiedenen biologischen Systemen. In künstlicher Magenflüssigkeit, Blutplasma von Mensch und Ratte sowie in Rattenleberhomogenat konnte die unterschiedliche Hydrolysierbarkeit von Ethyl- und Benzyltiglat sowie der Referenzsubstanz Phenylacetat gezeigt werden (Abb. 45, Anhang III Tab. 44). Phenylacetat wird in Rattenplasma um 2 Zehnerpotenzen schneller hydrolysiert. Der Unterschied zu Humanplasma betrug 3 Zehnerpotenzen.

Mit Hilfe von künstlicher Magenflüssigkeit und Rattenleberhomogenat kann zusätzlich zur Hydrolyse in Blutplasma der Anteil unterschiedlicher biologischer Systeme am Metabolismus von Estern abgeschätzt werden.

⁴Humanplasma 1:100 verdünnt

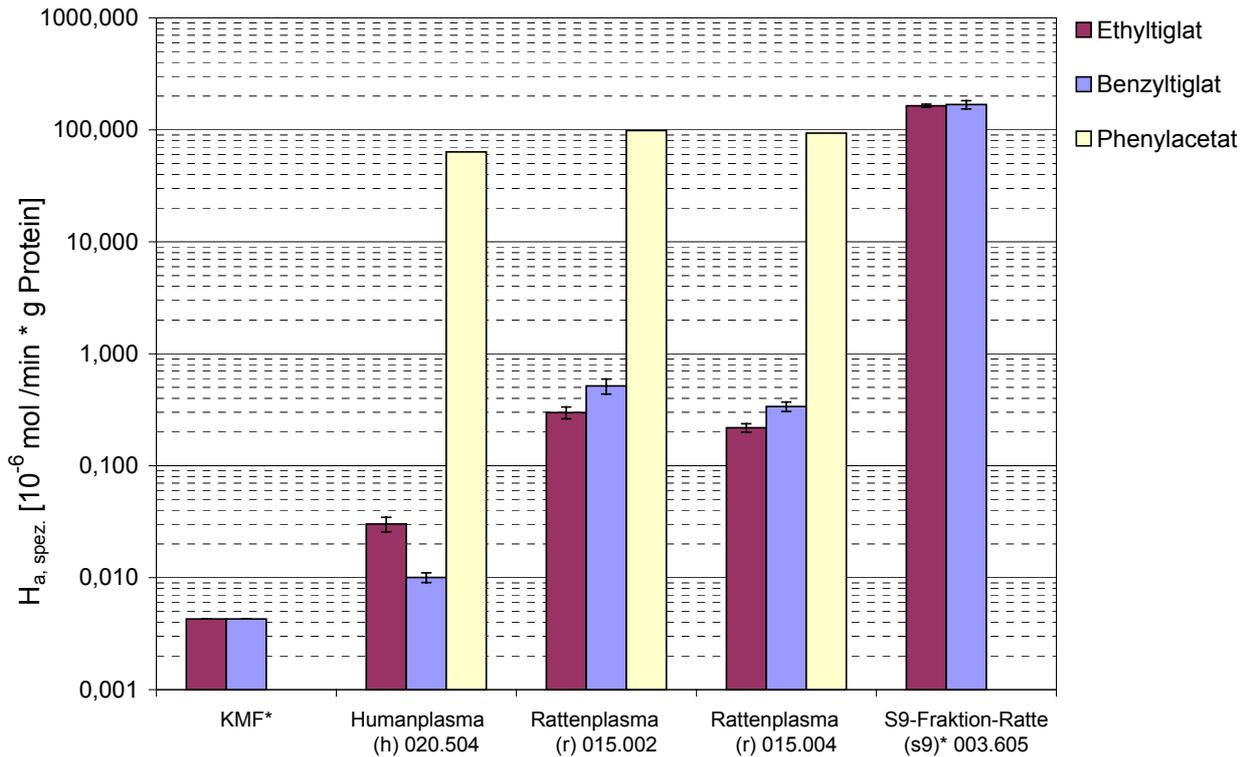


Abb. 45: Hydrolyseaktivität künstlicher und physiologischer Körperflüssigkeiten bei Ethylglutrat und Benzylglutrat

KMF (künstliche Magenflüssigkeit, pH 1,2); Human- und Rattenplasma „frisch“; S9-Fraktion aus Rattenleber (19 Monate bei -84°C Wochen gelagert) – logarithmische Darstellung. $S_0 = 0,25 \text{ mM}$ (*: für Phenylacetat keine Daten vorhanden).

Erwartungsgemäß wurde für künstliche Magenflüssigkeit die geringste Hydrolyseaktivität nachgewiesen. Die Umsatzrate war vergleichbar mit der nichtenzymatischen, sauer katalysierten Hydrolyse. Der Vergleich von Humanplasma mit künstlicher Magenflüssigkeit ergab für Ethyl- und Benzylglutrat eine um den Faktor $> 7,0$ und $> 2,3$ erhöhte Umsatzrate. Bereits Aldridge (1952) und Savary & Constantin (1970) konnten zeigen, dass der Hauptanteil der enzymatischen Spaltung des Gastrointestinaltraktes im Dünndarm stattfindet.

Anzumerken ist, dass die Angaben zur Zusammensetzung von künstlicher Magenflüssigkeit in der Literatur gelegentlich widersprüchlich und unvollständig sind (Longland, 1977). Schließlich wurde für unsere Untersuchungen eine Zusammensetzung gewählt, die sich mit den häufigsten Angaben (Castle, 1993; CEN/TC, 2000; Cooper et al., 1995; DIN EN 73-1, 1994) unter Berücksichtigung physiologischer Daten zum menschlichen Magensaft (Bergmeyer, 1970; Dokumenta-Geigy, 1975; Pschyrembel, 2001) decken.

Die Hydrolyseaktivität in Blutplasma wird maßgeblich durch die Carboxylesterasemenge bestimmt. Ursache für diese speziesspezifischen Unterschiede ist das im Vergleich zum Menschen hohe Carboxylesteraselevel im Rattenplasma. Die hohe Cholinesteraseaktivität im Humanplasma trägt nur in einem geringen Maß zur hydrolytischen Spaltung von Carbonsäureestern im Plasma bei (McCracken et al., 1993 und 1993a). Mehrere Studien wiesen in Rattenplasma, bzw. -vollblut eine gegenüber dem Menschen signifikant erhöhte Hydrolyseaktivität nach (Aldridge, 1953; Buchwald & Bodor, 2000; Saghir et al., 1999). Minagawa et al. (1995) wiesen anhand der Hydrolyse von Isocarbazylmethyl ester eine

gegenüber Humanblut in Rattenblut erhöhte Esteraseaktivität um den Faktor 400 nach. Die Ergebnisse in Abb. 45 zeigen, dass die Hydrolyse von Carbonsäureestern in Rattenplasma gegenüber Humanplasma deutlich schneller abläuft. Ethyltiglat wurde in Rattenplasma um den Faktor 7,2 bis 9,9 und Benzyltiglat um den Faktor 33,7 bis 51,3 schneller umgesetzt. In Rattenleberhomogenat wurde im Vergleich zu Rattenplasma eine ca. 600fach (Ethyltiglat) und ca. 350fach (Benzyltiglat) erhöhte Hydrolyseaktivität gemessen. Auch diese Ergebnisse stimmen mit publizierter Studien überein (Fahelbum & James, 1977; McCracken et al., 1993).

Dahl (1987) untersuchte die Umsatzrate von Pentyl- und Phenylacetat in Leber-S9-Fraktion (250 und 510 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ Protein). Der Schwerpunkt der Hydrolyseaktivität von Rattenleber liegt mit einem Anteil von ca. 70 % in den parenchymalen Zellen (Gaustad et al., 1992). McCracken et al. (1993) konnten Differenzen in der Hydrolyseaktivität von Mikrosomen und Cytosol von Leber und Plasma bei der Ratte nachweisen. Lebermikrosomen hydrolysieren Phenylacetat 16-mal schneller als Lebercytosol. Dagegen wird Phenylacetat in Plasmacytosol 4-mal schneller als in Lebercytosol umgesetzt. Der Vergleich Ratte-Mensch ergab einen dreifach so schnellen Phenylacetat-Abbau in Lebermikrosomen. Die Hydrolyse in Lebercytosol erfolgte dagegen beim Menschen fast 6-mal schneller als bei der Ratte (McCracken et al., 1993a).

5.7 Hydrolyseuntersuchungen in Humanplasma

5.7.1 Ethylester mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest

Spezifische Hydrolyseaktivität

Die Bestimmung der Spezifischen Hydrolyseaktivität von Humanplasma für Ethylpropionat, -valerat, -heptanoat, -undecanoat und -myristat erfolgte mit Substratanfangskonzentrationen von 0,25 bis 2,50 mM.

Für alle Ester wurde ein mit zunehmender Substratkonzentration steigender Umsatz je Zeiteinheit festgestellt. Diese Art der Substrateliminierung folgt der in Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Reaktion 1. Ordnung. Die Konzentration, bei der ein Übergang in die Reaktionsordnung nullter Ordnung (Umsatz je Zeiteinheit ist konstant und unabhängig von der Substratkonzentration) erfolgt, wurde demnach nicht erreicht und liegt somit bei $S_0 > 2,50$ mM.

Abb. 46 (Anhang II, Tab. 29) zeigt einen typischen Hydrolyseverlauf in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration. Die Reihenfolge der Ester im Hinblick auf ihre relative spezifische Hydrolyseaktivität ändert sich innerhalb des Konzentrationsbereiches 0,25 bis 2,50 mM nicht. Von den untersuchten Substanzen zeigte Ethylvalerat als Pentylester ein Maximum in der Umsatzrate.

Die spezifische Hydrolyseaktivität steigt von Ethylpropionat (C_3) beim Übergang zu Ethylvalerat (C_5) zunächst an. Eine Verlängerung des Acylrestes bis C_{14} (Ethylmyristat) geht jedoch mit dem rapiden Abfall des Substratumsatzes je Zeiteinheit einher.

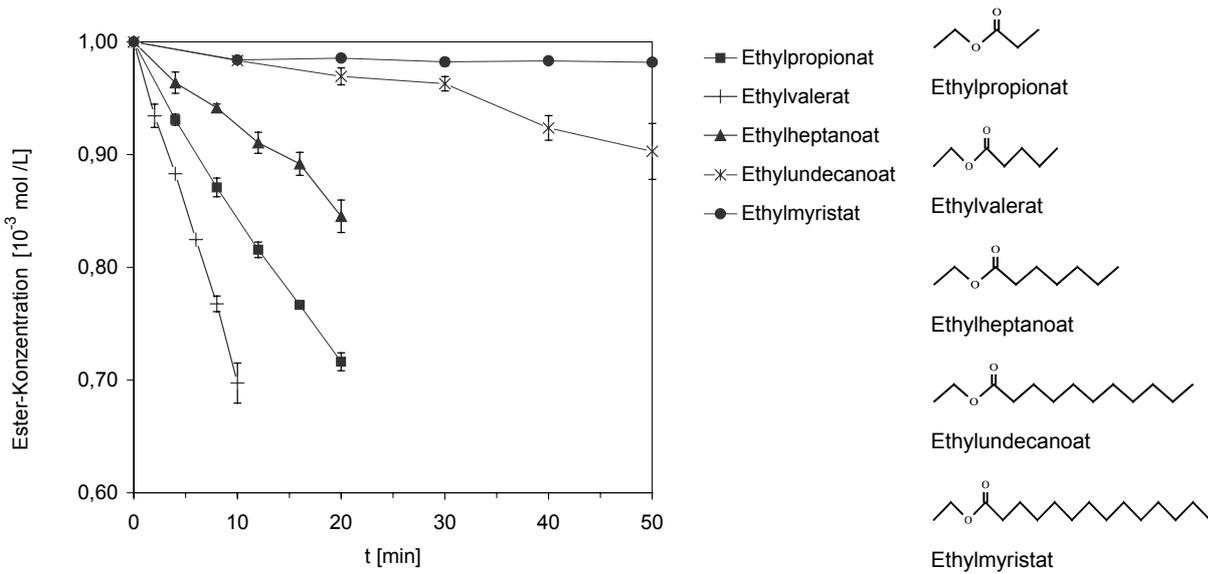


Abb. 46: Hydrolyseverlauf von Ethylestern mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest in Humanplasma

$$S_0 = 1,00 \text{ mM}, n = 4$$

Die spezifische Hydrolyseaktivität von Ethylmyristat im Vergleich mit Ethylvalerat steigt um den Faktor 41,5 ($S_0 = 0,50 \text{ mM}$) bzw. 88,9 ($S_0 = 1,25 \text{ mM}$). Die Umsatzrate der enzymatischen Esterspaltung im Blutplasma wird beeinflusst durch die Hydrophobizität bzw. Löslichkeit der Ethylester und deren Hydrolyseprodukte im wässrigen Medium. Abb. 47 und Abb. 48 (Anhang II, Tab. 29) zeigen in der Gegenüberstellung die Freisetzungsrates der Carbonsäure in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration des Esters.

Abb. 47 zeigt mit zunehmender Substratkonzentration (0,25 mM bis 2,50 mM) eine steigende Bildungsrate von Valeriansäure je Zeiteinheit. Diese Beobachtung weist auf den typischen Verlauf einer Reaktion 1. Ordnung hin.

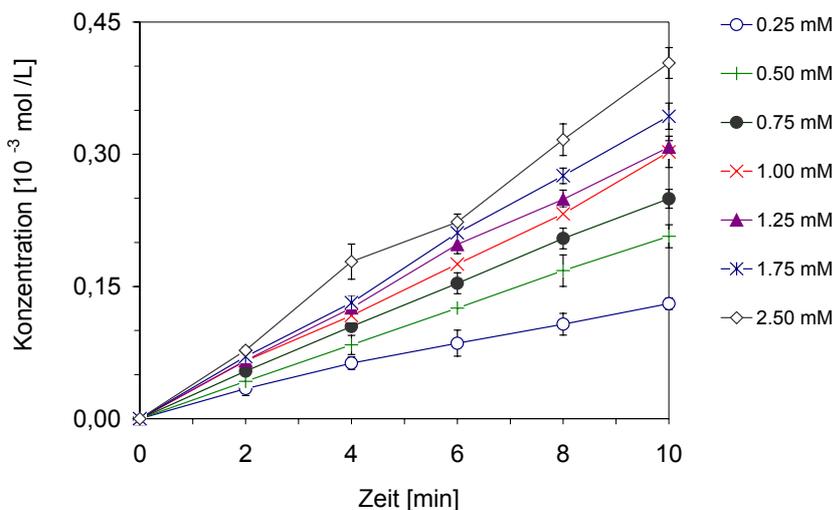


Abb. 47: Bildung von Valeriansäure bei der Hydrolyse von Ethylvalerat in Humanplasma

$$(n = 4)$$

Weiterhin konnte in diesem Konzentrationsbereich weder Abfall noch Stagnation der Umsatzrate festgestellt werden. Ein Abfall oder Stagnieren der Hydrolyseaktivität würde auf den Effekt der Substrathemmung hinweisen. Ein Übergang in die Reaktion nullter Ordnung ist ebenso auszuschließen. Diese Phänomene sind bei Substratanfangskonzentrationen $> 2,5 \text{ mM}$ zu vermuten.

Die Hydrolyse von Ethylmyristat zeigt für ansteigende Substratanfangskonzentrationen signifikant verringerte Hydrolyseraten (Abb. 48). Wir nehmen an, dass aufgrund der geringen Löslichkeit dem Enzym nur eine konstant geringe Anzahl von im Plasma bei 37 °C gelösten Substratmolekülen zur Verfügung steht. Die daraus resultierende geringe konstante Sättigungskonzentration ermöglicht nur einen minimalen enzymatisch katalysierten Substratumsatz. Eine identische Substratanfangskonzentration führt zu einer konstanten Umsatzrate je Zeiteinheit. Die Nähe der Messdaten zur Bestimmungsgrenze von Myristinsäure zeigte auch bei der Vierfachbestimmung einen weiten und sich überlappenden Vertrauensbereich. Statistisch abgesicherte Differenzen der Hydrolyseaktivität konnten für Ethylmyristat im gegebenen Konzentrationsbereich ($0,25 \text{ mM}$ bis $2,50 \text{ mM}$) nicht detektiert werden.

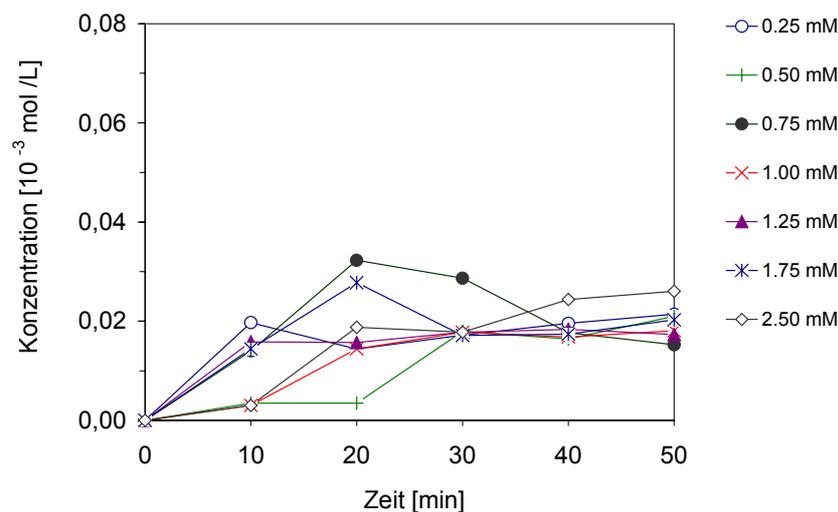


Abb. 48: Bildung von Myristinsäure bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylmyristat in Humanplasma

n = 4

Abb. 49 (Anhang IV, Tab. 45) gibt eine zusammenfassende Übersicht über die spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern. Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich aus der zunehmenden Acylkettenlänge und deren Verzweigung (Ethylisovalerat) ableiten.

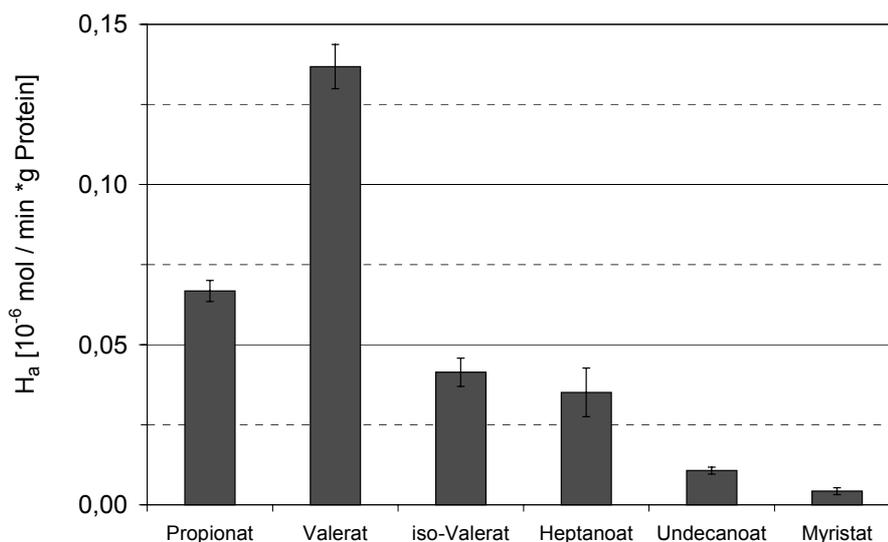


Abb. 49: Spezifische Hydrolyseaktivität bei Ethylestern mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest in Humanplasma

$S_0 = 0,25$ mM, $n = 4$

Zu diskutieren ist die Verfügbarkeit des Substrats aufgrund der mit der Acylkettenlänge positiv korrelierenden Hydrophobizität des Esters in Verbindung mit sterischen Hinderungen, die einen Abfall der spezifischen Hydrolyseaktivität induzieren. Eine Ausnahme stellt Ethylvalerat dar; ein Effekt der eine ideale Passform des Substrates in der Mehrheit reaktiven Zentren vermuten lässt.

Die signifikant verschiedenen spezifischen Hydrolyseaktivitäten von Ethylvalerat und -isovalerat lassen sich nicht durch Unterschiede in der Hydrophobizität ($\log P_{OW}$) und Löslichkeit erklären, da sich beide Ester diesbezüglich sehr ähneln. Die niedrigere Hydrolyseaktivität bei Ethylisovalerat muss demnach auf sterische Effekte zurückgeführt werden.

Halbwertszeit

Der Verlauf von spezifischer Hydrolyseaktivität und Halbwertszeit unter identischen Reaktionsbedingungen sollte negativ korrelieren. Die hohe spezifische Hydrolyseaktivität lässt auf eine geringe Halbwertszeit der Ester im Hydrolysemedium schließen. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 1. Ordnung leitet sich aus dem Anstieg der Darstellung in Abb. 50 ab (Anhang II, Tab. 29). Ein steiler Anstieg der Regressionsgeraden ergibt einen geringen Wert für die Halbwertszeit, die wiederum eine schnelle Elimination des Substrats aus dem Hydrolysemedium vermuten lässt.

Der in dieser Studie vorgenommene Vergleich verschiedener Substrate anhand der Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen aus Hydrolyseparametern erfordert die Bestimmung von initialen Parametern in Abhängigkeit identischer Substratanfangskonzentrationen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Studie ausschließlich die initiale Halbwertszeit ermittelt. Ein anschaulicheres Bild der Eliminierung eines Substrats aus einem Hydrolysesystem zeichnen auch mittlere und terminale Halbwertszeit, deren Werte um ein Vielfaches höher sein können und sich daher besonders zur Charakterisierung eines einzelnen Substrats eignen (Abschnitt 2.5.2).

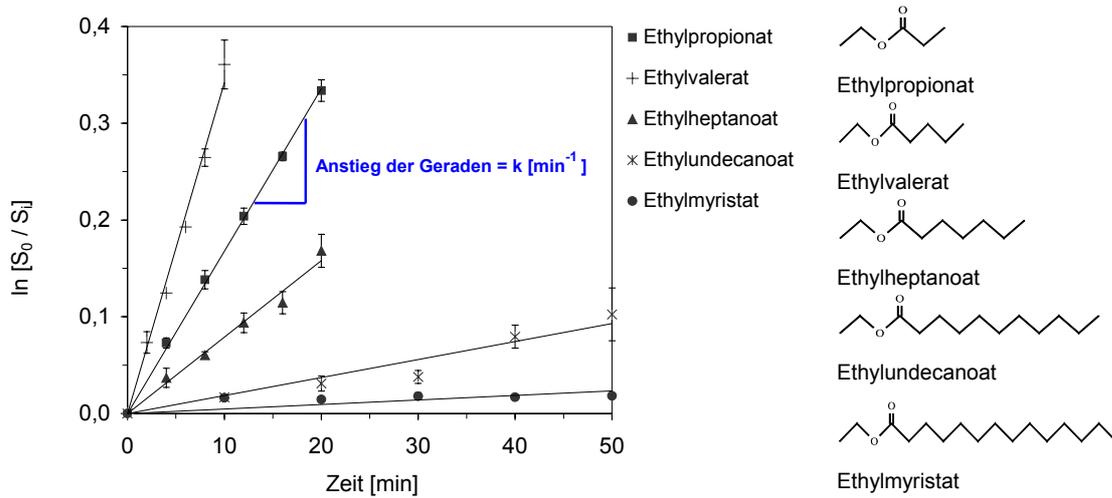


Abb. 50: Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten aus der Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma

$S_0 = 0,25 \text{ mM}$, $n = 4$

Die initiale Halbwertszeit von Ethylestern mit unterschiedlicher Acylkettenlänge korreliert gut mit der ansteigenden spezifischen Hydrolyseaktivität (Abb. 51, Anhang II, Tab. 46). Auffällig für Substanzen mit zunehmend geringer Löslichkeit im Wässrigen ist die steigende Schwankungsbreite der Ergebnisse. Ethylvalerat weist für jede Substratanfangskonzentration von 0,25 mM bis 2,50 mM die geringste Halbwertszeit auf. Die Vertrauensbereiche schwanken im Bereich 4,8 % (Ethylpropionat) bis 21,3 % (Ethylmyristat). Die Reihenfolge der Substanzen in Abb. 51 ist bei allen untersuchten Substratkonzentrationen identisch. Die Halbwertszeit für Ethylmyristat von 341 min (0,25 mM) ist gegenüber Ethylvalerat (9,7 min; 0,25 mM) um den Faktor 66 erhöht.

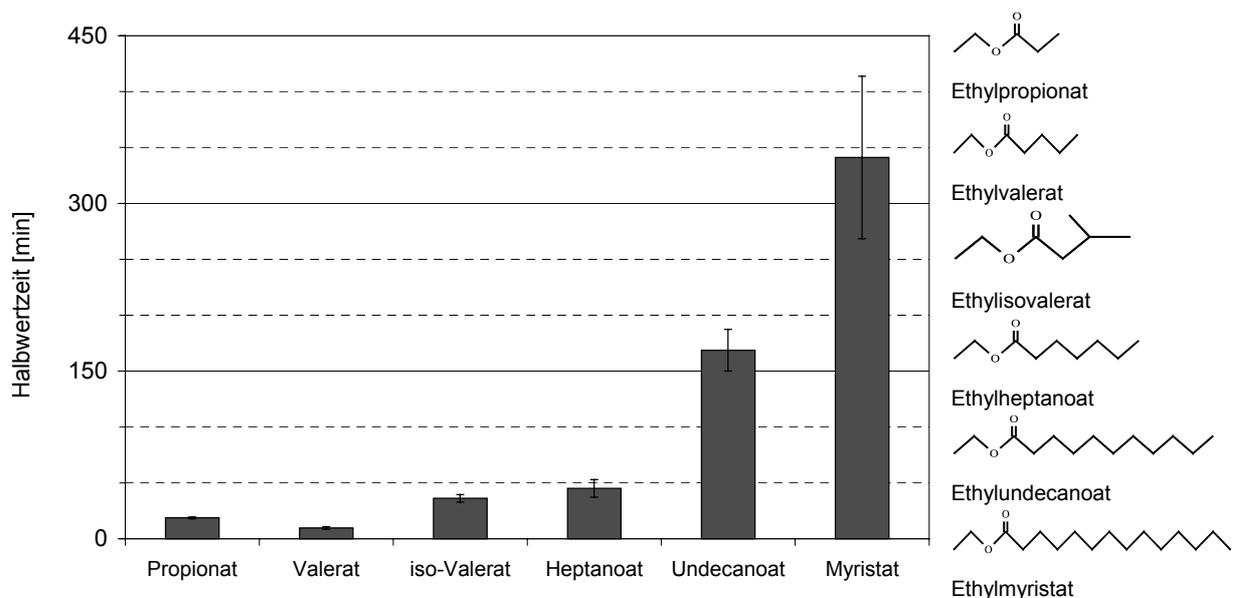


Abb. 51: Halbwertszeit von Ethylestern mit aliphatisch linear unverzweigtem Acylrest sowie Ethylvalerat in Humanplasma

$S_0 = 0,25 \text{ mM}$, $n = 4$

In Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration nimmt die Halbwertszeit von $S_0 = 0,25$ mM bis 2,50 mM für Ethylvalerat um den Faktor 4,2 (9,7 min \rightarrow 40,5 min) und für Ethylmyristat um den Faktor 9,3 (341 min \rightarrow 3177 min) zu.

Ethylisovalerat besitzt bis zu der Substratanfangskonzentration von 0,75 mM eine ähnliche Halbwertszeit wie Ethylheptanoat. Diese Konzentration entspricht ungefähr der Löslichkeit von Ethylheptanoat (0,69 mM) im wässrigen Medium bei 37 °C. Die Löslichkeit von Ethylisovalerat liegt mit 13,9 mM deutlich darüber. Bei höheren Substratkonzentrationen stagniert die Elimination von Ethylheptanoat anhand der Halbwertszeit zunehmend. Bei einer Substratanfangskonzentration von 2,50 mM liegt die Halbwertszeit von Ethylheptanoat mit 239 min um einen Faktor von ca. 1,6 über der Halbwertszeit von Ethylisovalerat. Dieser Zusammenhang deutet erneut auf den Einfluss der Löslichkeit des Substrates bei enzymatischen Reaktionen hin.

Die Halbwertszeiten von Ethylvalerat und -isovalerat bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma unterscheiden sich deutlich. Die Halbwertszeit von Ethylisovalerat ist gegenüber Ethylvalerat um den Faktor 3,7 höher ($S_0 = 0,25$ mM). Diese Differenz steigt sukzessive mit zunehmender Substratanfangskonzentration bis Faktor 5,9 bei $S_0 = 2,50$ mM.

Kinetische Parameter

Die *Michaelis-Menten*-Parameter V_{\max} und K_m wurden mit dem linearen Plot nach Lineweaver & Burk ermittelt (Abb. 52, Anhang II, Tab. 47). Eine sehr gute Korrelation bei der linearen Regression der mittleren Messergebnisse zeigen Ethylpropionat, -valerat sowie -heptanoat. Dagegen traten bei Ethylundecanoat und -myristat starke Abweichungen von der Trendlinie auf. Die *Michaelis-Menten*-Parameter zeigten Variationskoeffizienten von bis zu 55,3 % (Tab. 19, Abschnitt 6.4.4).

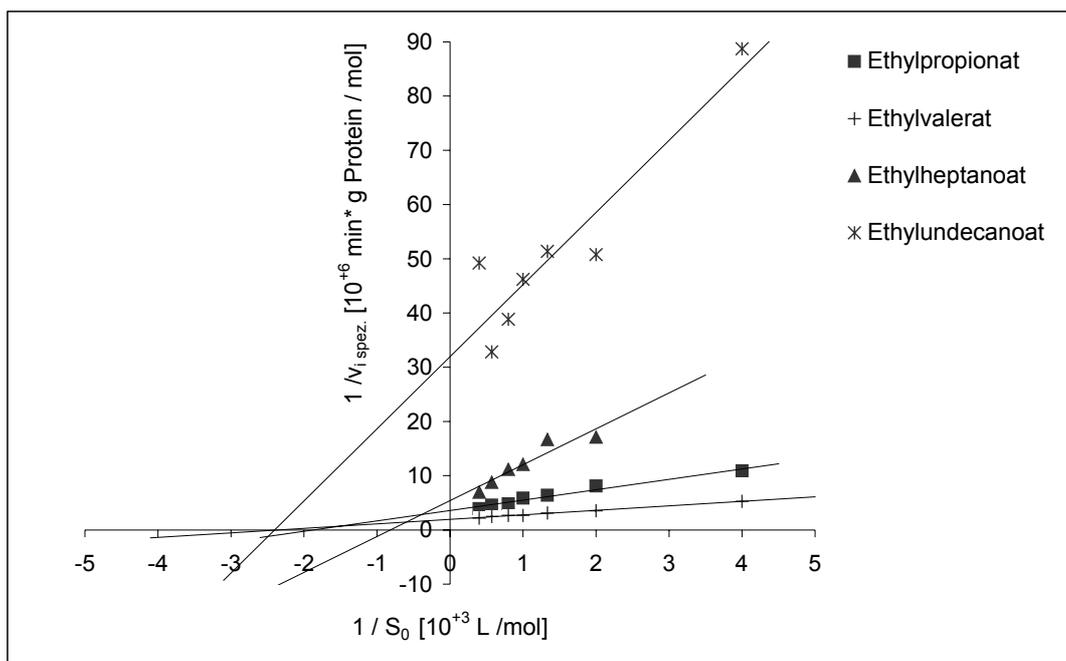


Abb. 52: Lineweaver-Burk-Plot: Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma

Aus dem Lineweaver-Burk-Plot für Ethylundecanoat lässt sich eine Abweichung von der linearen Regressionsgeraden ableiten. Gemäß Arndt (1973) werden mit zunehmender Substratkonzentration kleinere Werte für die Initialgeschwindigkeit bestimmt. Dieser Effekt wird im Lineweaver-Burk-Plot als Abweichung von der Trendlinie angezeigt und gilt als Indikator für substratinhibierende Effekte.

Die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse bestätigt die Reihenfolge der spezifischen Hydrolyseaktivität von Humanplasma gegenüber den untersuchten Ethylestern (Abb. 53, Tab. 19). Im Vergleich mit der spezifischen Hydrolyseaktivität bei 2,50 mM (jeweils höchste spezifische Aktivität) liegt der berechnete Wert für V_{\max} bis zu einem Faktor von ca. 10 über dem experimentell bestimmten Wert. Ähnlich verhält sich der Quotient V_{\max}/K_m . Der oben abgeleitete Trend setzt sich fort. Eine Ausnahme bildet Ethylisovalerat.

Die spezifische Hydrolyseaktivität ($H_{a,\text{spez.}}$) zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,25 mM bis 2,50 mM einen Trend zur asymptotischen Annäherung an den konstanten Wert für V_{\max} (Anhang IV, Abb. 82). Bei Ethylundecanoat und Ethylmyristat tangiert der Vertrauensbereich für $H_{a,\text{spez.}}$ den Wert für V_{\max} . Somit kann der Übergang der Reaktionsordnung in eine nullte Ordnung ab einer Substratkonzentration von 1,75 mM für Ethylundecanoat nicht ausgeschlossen werden. Die Schwankung der $H_{a,\text{spez.}}$ -Werte für Ethylmyristat ist so hoch, dass selbst bei einer Substratkonzentration ab 0,5 mM eine Reaktion nullter Ordnung angenommen werden muss. Der daraus resultierende Sättigungseffekt wurde bei Estern mit höherer Löslichkeit nicht beobachtet.

Aufgrund des geringen K_m -Wertes kann aus dem geringeren V_{\max}/K_m -Wert eine geringere Hydrolysierbarkeit abgeleitet werden. Erwartungsgemäß deckt sich diese Interpretation mit der geringen spezifischen Hydrolyseaktivität und großen Halbwertszeit. Die Berechnung der konventionellen Parameter Halbwertszeit und Hydrolyseaktivität kann demnach durch die Ermittlung kinetischer Parameter abgesichert werden.

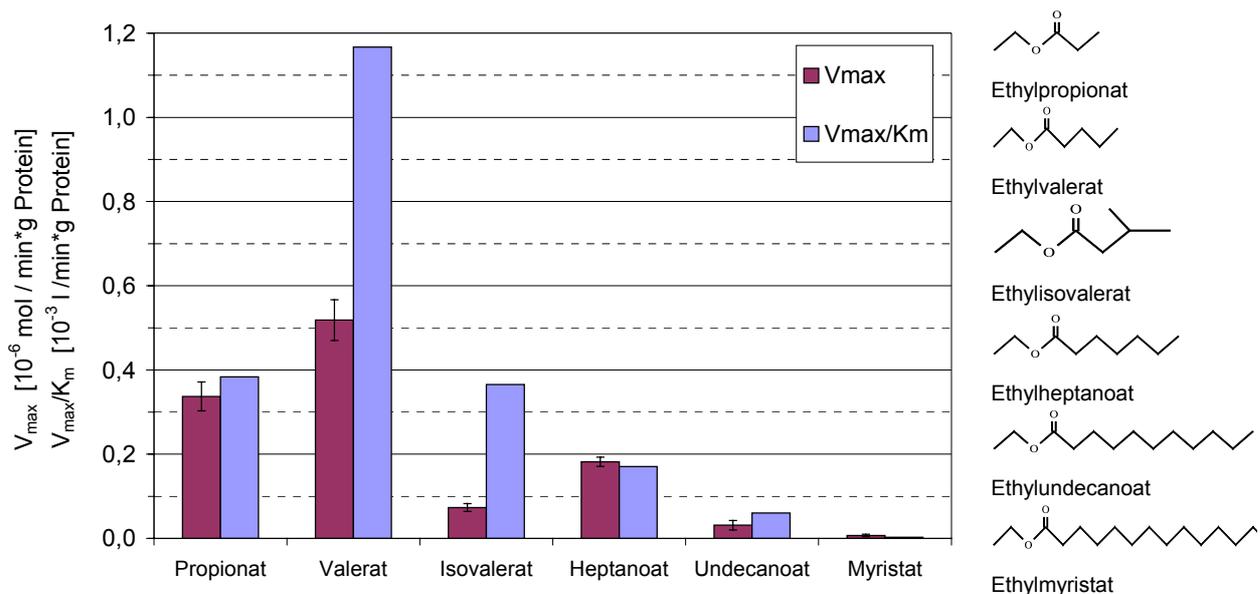


Abb. 53: Maximalgeschwindigkeit und V_{\max}/K_m der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma

K_m ist ein Maß für die Affinität des Enzyms oder Enzymsystems gegenüber einem Substrat, unabhängig von der Substratanfangskonzentration und besitzt die Dimension einer Konzentration (mol/L). Bei geringem K_m -Wert erreicht das Enzymsystem bei kleinen Substratkonzentration die erforderliche Substratsättigung, während bei hohen *Michaelis-Menten*-Konstanten entsprechend höhere Substratmengen dem Enzym aktiv vorliegen müssen, damit die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden kann (Abb. 54, Tab. 19).

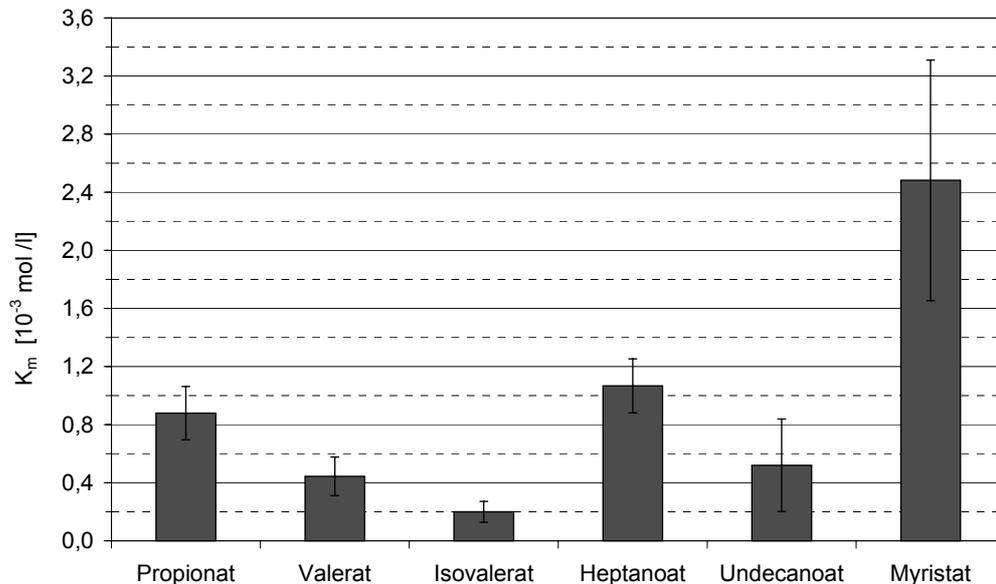


Abb. 54: *Michaelis-Menten*-Konstante K_m der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma

Die ermittelten K_m -Werte erfüllen die experimentelle Vorgabe, wonach gesicherte Ergebnisse zu erwarten sind, wenn sich die Substratanfangskonzentrationen im Bereich $0,1 \cdot K_m$ bis $10 \cdot K_m$ befinden. Alle errechnete K_m -Werte liegen im Bereich $0,1 \cdot K_m < S_0 < 5 \cdot K_m$. Die detektierten Hydrolyseverläufe sind gemäß dieser Anforderungen an die *Michaelis-Menten*-Kinetik einer Reaktion 1. Ordnung zuzuordnen.

Von einem signifikanten Unterscheid in der Affinität gegenüber verschiedenen Substraten spricht man, wenn sich die K_m -Werte mindestens um eine Größenordnung von 10^{+2} bzw. 10^{-2} unterscheiden.

Unter Berücksichtigung der sich überschneidenden Vertrauensintervalle ist die Größe der bestimmten K_m -Werte von vergleichbarer Größe. Die Affinität des Enzymsystems Humanblutplasma gegenüber Ethylestern mit einem Acylkettenlänge von C_3 bis C_{14} ist somit annähernd gleich. Die Mittelwerte für pK_m und V_{max} aus $n = 4$ wurden in Abhängigkeit der Acylkettenlänge aufgetragen (Abb. 55). Die pK_m -Werte zeigen für die dargestellten Acylkettenlängen ähnliche Werte und damit einen plateauförmigen Verlauf in der Abbildung.

Für Humanplasma wurde der Maximalwert für V_{max} bei der Acylkettenlänge C_5 (Ethylvalerat) gemessen. Werden für die zu vergleichenden Substrate annähernd gleiche K_m -Werte aus dem Verlauf der Maximalgeschwindigkeit ermittelt, so ergibt sich der für die Hydrolysierbarkeit des Substrats maßgebliche Parameter.

Ein ähnlicher Verlauf ist der Studie von Arndt & Krisch (1973) zu entnehmen. Die Hydrolyse von Methylestern mit linear gesättigt unverzweigtem Acylrest unterschiedlicher Kettenlänge (C_2 bis C_7) in Rattenlebermikrosomen lieferte ebenso für die Acylkettenlänge C_4 (Methylbutyrat) ein signifikantes Maximum für V_{\max} .

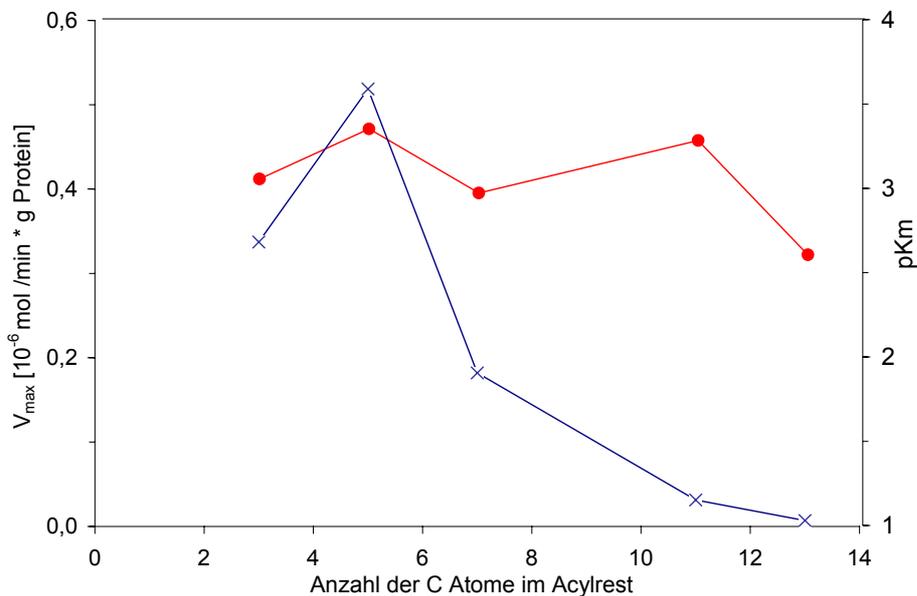


Abb. 55: Verlauf der Maximalgeschwindigkeit und dem negativen dekadischen Logarithmus von K_m (pKm) in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Acylrests von Ethylestern bei der Hydrolyse in Humanplasma

(x) V_{\max} ; (●) pKm

Grundsätzlich gilt, dass sich aus der Interpretation von K_m -Werten für Enzymsysteme, wie hier Blutplasma, nur ein allgemeines und unspezifisches Enzym-Substrat-Verhalten ableiten lässt. Es steht für die mittlere Enzymaffinität des Enzymsystems und ist wenig aussagekräftig. Eine Differenzierung in der Affinität einzelner Hydrolysen kann nicht erfolgen, da die Interpretation der Enzym-Substrat-Affinität das Isolieren und Aufreinigen der charakteristischen Hydrolasen voraussetzt.

5.7.2 Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem oder aromatischem Acylrest

Spezifische Hydrolyseaktivität

Der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylester weist deutliche Unterschiede auf. Abb. 56 (Anhang II, Tab. 29 und Tab. 30) zeigt den Substratumsatz innerhalb verschiedener Gesamthydrolysezeiten für eine Substratanfangskonzentration ($S_0 = 1,00$ mM). Mit zunehmender Substratanfangskonzentration steigt im Bereich 0,25 mM bis 2,50 mM die freigesetzte Carbonsäuremenge kontinuierlich an (Abb. 56).

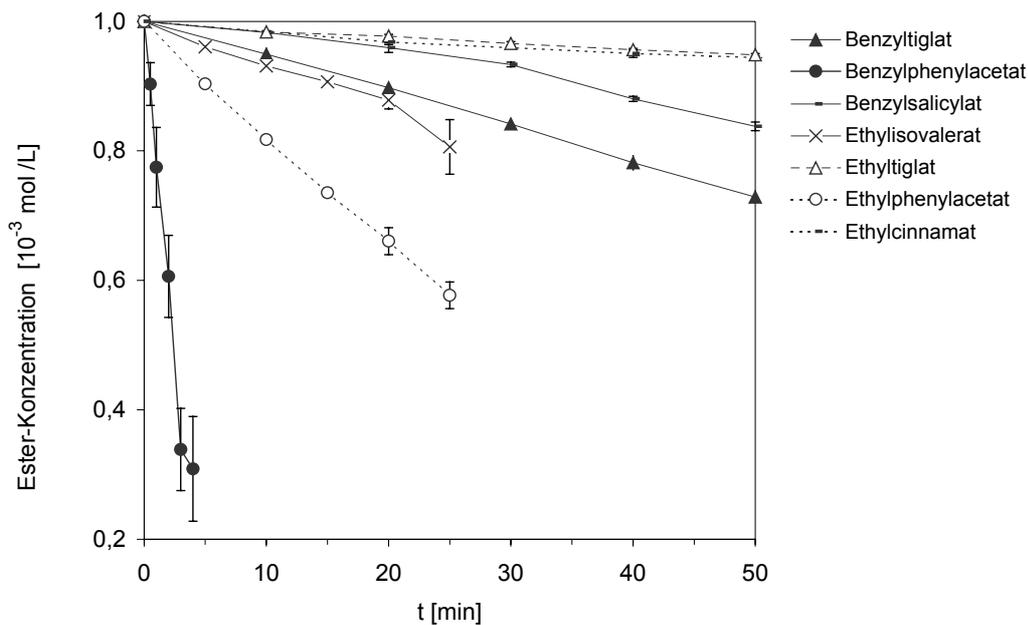


Abb. 56: Hydrolyseverlauf von Ethyl- und Benzylestern bei der Hydrolyse in Humanplasma
($S_0 = 1,00 \text{ mM}$; $n=4$)

Die höchste Umsatzrate zeigten die Phenylacetatester. Die geringste Umsatzrate wurde bei Ethyltiglat und -cinnamat nachgewiesen. Die spezifische Hydrolyseaktivität stieg mit zunehmender Substratanfangskonzentration. Die Reihenfolge der Ester im Vergleich der spezifischen Hydrolyseaktivität von Humanplasma untereinander änderte sich nicht (Abb. 57).

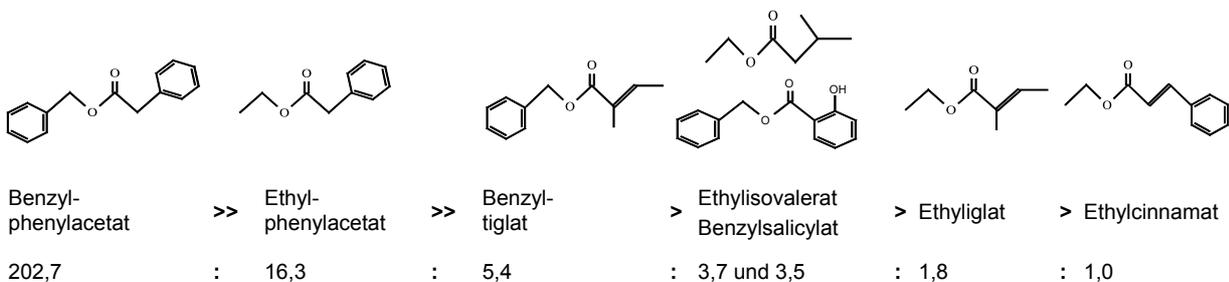


Abb. 57: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei Ethyl- und Benzylestern mit verzweigten oder aromatischem Acylrest
($S_0 = 1,00 \text{ mM}$; $n=4$)

Verzweigungen im Acylrest von Ethyl- und Benzylestern der Tiglinsäure (*trans*-2-Methyl-2-butensäure) führten zu signifikant niedrigeren Umsatzraten. Ethylisovalerat wurde doppelt so schnell hydrolysiert wie Ethyltiglat.

Aromatische Acylreste rufen ein unterschiedliches Hydrolyseverhalten hervor. Am Beispiel der *Benzylester* lässt sich in Abhängigkeit vom Acylrest folgende Reihenfolge für die spezifische Hydrolyseaktivität für Humanplasma festlegen:

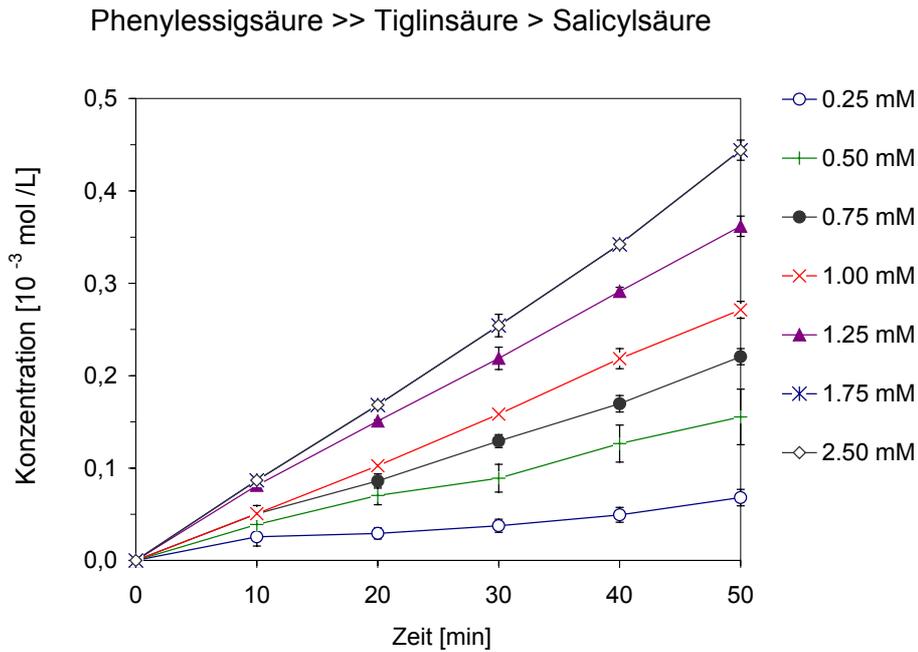


Abb. 58: Bildung von Benzylalkohol bei der enzymatischen Hydrolyse von Benzyltiglat in Humanplasma

Für *Ethylester* ergibt sich folgende Abfolge:

Phenyllessigsäure >> Isovaleriansäure > Tiglinsäure > Zimtsäure

Benzylalkohol und Tiglinsäure sind gaschromatographisch nebeneinander detektierbar (siehe Abb. 28). In Abb. 58 und Abb. 59 ist die Bildungsrate von Benzylalkohol und Tiglinsäure in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration dargestellt.

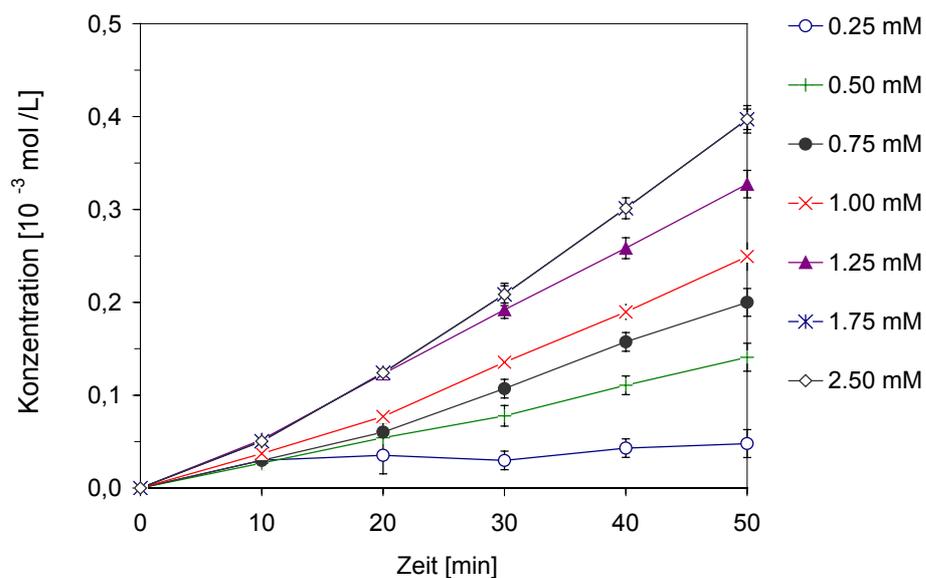


Abb. 59: Bildung von Tiglinsäure bei der enzymatischen Hydrolyse von Benzyltiglat in Humanplasma

Die Wertepaare zeigen eine gute Übereinstimmung, insbesondere bei Daten aus fortgeschrittener Hydrolysezeit ($t \geq 30$ min). Die freigesetzte Tiglinsäure-Menge stieg bei der Substratanfangskonzentration von 0,25 mM mit zunehmender Hydrolysezeit nur sehr langsam an. Im Vergleich mit der zeitgleich zunehmenden korrespondierenden molaren Benzylalkoholkonzentration lässt sich eine Differenz ableiten. Tiglinsäure besitzt bei der gaschromatographischen Analyse mit identischer stationärer FFAP-Phase (Polyethylenglycol-2-Nitroterephthalsäureester) im Vergleich zum Benzylalkohol einen höheren Responsefaktor. Daraus resultierte eine niedrigere Bestimmungsgrenze für Benzylalkohol. Damit konnten bereits geringere molare Mengen an Benzylalkohol mit besserer Reproduzierbarkeit bestimmt werden.

Die Substratanfangskonzentration bestimmt die Höhe der spezifischen Hydrolyseaktivität der einzelnen Ester sehr unterschiedlich. Während diese sich im Bereich von $S_0 = 0,25$ mM bis 2,50 mM für Ethyltiglat annähernd verdoppelt, steigt sie bei Benzyltiglat um den Faktor 10. Die geringste Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit erfährt Ethylcinnamat (Faktor 1,5). Der Maximalwert wird bei Ethylphenylacetat erreicht (Faktor 18,8).

Derartige Schwankungen weisen auf substratspezifische Sättigungskonzentrationen hin. Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von Ethylcinnamat liegt etwas über dem Wert für Ethylphenylacetat (Abschnitt 5.2). Die Hydrophobizität ist demnach nicht so signifikant verschieden, als dass ein unterschiedliches Hydrolyseverhalten ableitbar wäre. Vielmehr deuten strukturelle Merkmale auf eine sterische Hinderung bei der enzymkatalysierten Umsetzung hin. Zimtsäure besitzt wie Phenyllessigsäure eine Phenylgruppe und verfügt zusätzlich über eine *trans*-Doppelbindung. Dieser Funktion werden sterisch hemmende Eigenschaften zugeschrieben, wenn sie sich in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms befindet. Ein ähnliches Verhalten zeigt die Hydroxy-Gruppe im Acylrest von Benzylsalicylat (2-Hydroxybenzolcarbonsäurebenzylester).

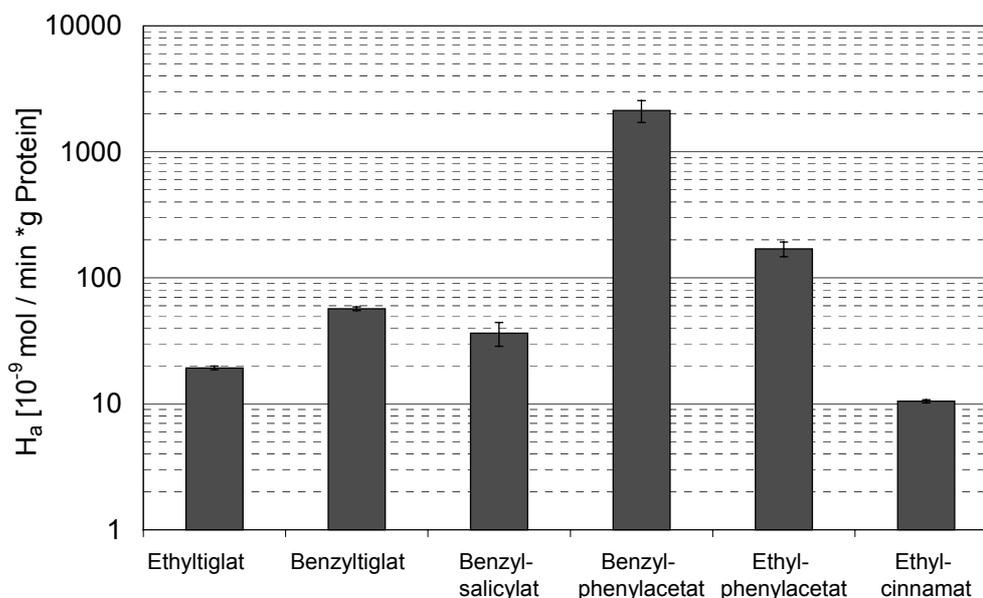


Abb. 60: Spezifische Hydrolyseaktivität von Ethyl- und Benzylestern mit verzweigtem und/oder aromatischem Acylrest in Humanplasma

$S_0 = 1,00$ mM, $n = 4$; logarithmische Darstellung

Die Betrachtung des Alkylrestes im Estermolekül lässt keine schlüssige Vorhersage auf das Hydrolyseverhalten des Esters zu (Abb. 60, Anhang II, Tab. 45). Es wurden Ethyl- und Benzylester mit identischem Acylrest gefunden, die in Humanplasma anhand der spezifischen Hydrolyseaktivität als schnell hydrolysierbar eingestuft werden, wie die Phenylacetate. Dagegen zeigten Ethyl- und Benzyltiglat ein nur langsames Hydrolyseverhalten.

Halbwertszeit

Die Halbwertszeit zeigt erwartungsgemäß im Vergleich von Ethyl- und Benzylestern eine negative Korrelation zur spezifischen Hydrolyseaktivität. Die Messwerte aus dem Hydrolyseverlauf zur Berechnung der Halbwertszeit aus der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 1. Ordnung korrelieren sehr gut mit der linearen Regressionsgeraden (Abb. 61).

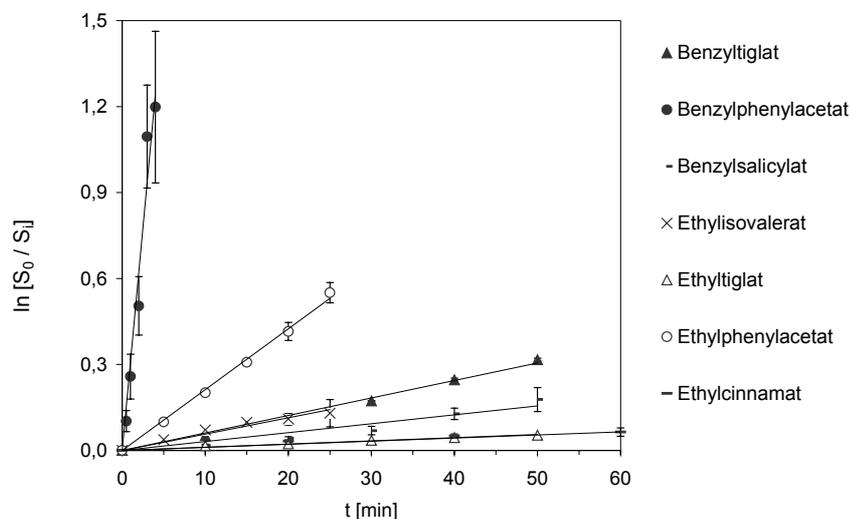


Abb. 61: Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern bei der Hydrolyse in Humanplasma

($S_0 = 1.00 \text{ mM}$; $n=4$)

Aus dem größten Anstieg der Geraden für Benzylphenylacetat ergibt sich die höchste Geschwindigkeitskonstante k und damit die geringste Halbwertszeit. Annähernd deckungsgleiche Regressionsgeraden wurden für Ethyltiglat und -cinnamat sowie Ethylisovalerat und Benzyltiglat ermittelt. Für die untersuchten Ethyl- und Benzylester ergibt sich für die Halbwertszeit folgende Reihenfolge (Abb. 62, Tab. 46).

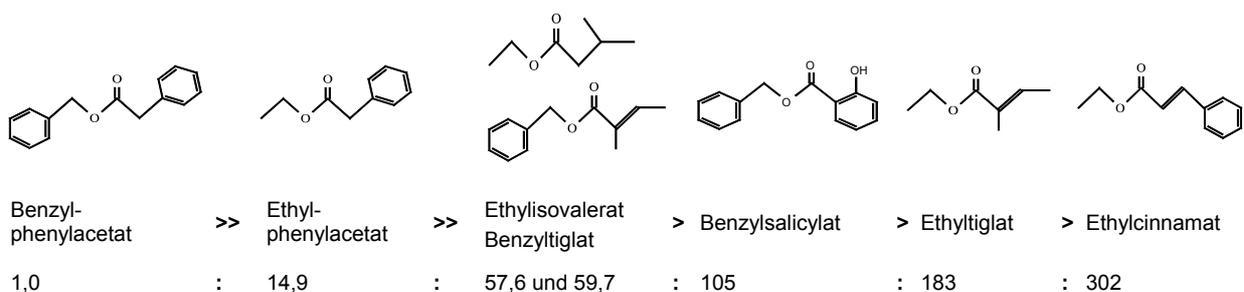


Abb. 62: Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern mit verzweigtem oder aromatischem Acylrest in Humanplasma

Mit Ausnahme von Benzyltiglat wurde mit zunehmender Substratkonzentration eine Erhöhung der Halbwertzeit festgestellt; die in Abb. 62 dargestellte Reihenfolge der Ester hinsichtlich der Halbwertzeiten änderte sich nicht. Die Substratkonzentration wurde von 0,25 mM bis 2,50 mM um das 10fache erhöht. Die Halbwertzeit stieg maximal um den Faktor 7,5 für Ethylcinnamat (232 min → 1733 min) und minimal um den Faktor 1,5 für Benzylsalicylat (192 min → 279 min).

Für Benzyltiglat konnte im Konzentrationsbereich 0,25 mM bis 2,50 mM kein signifikanter Anstieg oder Abfall der Halbwertzeiten beobachtet werden. Die Werte schwanken plateauförmig im Bereich 95 min bis 131 min.

Deutliche Abweichungen im Vergleich zum einheitlichen Verlauf der Ethylester zeigen (Abb. 63, Tab. 46):

- Ethylphenylacetat ($S_0 = 1,00$ mM, mäßiger Abfall der Halbwertzeit),
- Benzylphenylacetat ($S_0 = 2,50$ mM, auffallend starker Anstieg der Halbwertzeit) sowie
- Benzylsalicylat (sehr schwacher Anstieg der Halbwertzeit und weite, sich überlappende Vertrauensintervalle).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Vertrauensbereiche der Halbwertzeiten auffallend deutlich unter den Werten für die spezifische Hydrolyseaktivität liegen. 80 % aller Variationskoeffizienten liegen unterhalb von 15 %. Der maximale Wert wurde mit 23,4 % berechnet. Dem entsprechend zeigt Abb. 63 eine scharfe Trennung der Ergebnisse.

Benzylphenylacetat besitzt die geringste Halbwertzeit (2,2 min). Seine Hydrolysierbarkeit wird daher als schnell eingestuft. Die Eliminierungsgeschwindigkeit ist am höchsten. *Ethylphenylacetat* weist mit 33 min eine mittlere Hydrolysierbarkeit auf. Die Halbwertzeiten der verbleibenden Ester liegen oberhalb von 100 min.

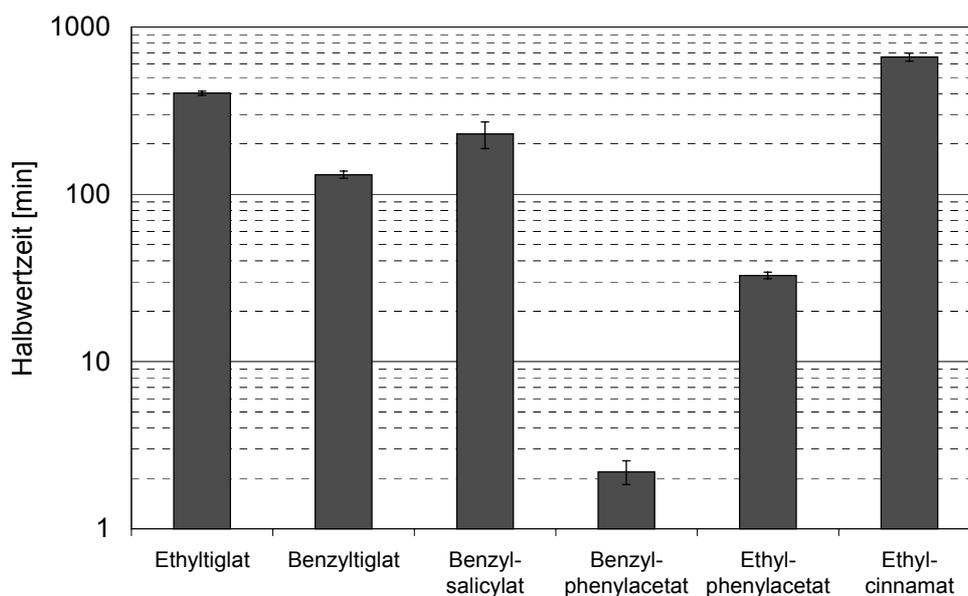


Abb. 63: Halbwertzeit von Ethyl- und Benzylestern mit verzweigtem und/oder aromatischem Acylrest in Humanplasma

($S_0 = 1,00$ mM, $n = 4$)

Tiglate, Ethylsalicylat, -cinnamat und -isovalerat werden als vergleichsweise langsam hydrolysierbar charakterisiert. Diese Reihenfolge zeigt eine annähernd identische Übereinstimmung mit den Schlussfolgerungen aus der spezifischen Hydrolyseaktivität. Ethyl- und Benzylester mit aromatischen und/oder verzweigten Acylresten zeigen ein uneinheitliches Hydrolyseverhalten. Die Ableitung einer Aussage zur Hydrolysierbarkeit aus dem Einfluss des Alkylrestes ist daher nicht möglich. Den wesentlichen Einfluss besitzt dagegen der Acylrest. Beide Phenylacetatester sind schnell hydrolysierbar. Tiglinsäureester werden dagegen langsam abgebaut.

Aus den Messdaten ließ sich keine Beeinträchtigung der enzymatischen Hydrolyse durch das Überschreiten der Löslichkeit von Benzylphenylacetat (0,21 mM) ableiten. Ethyltiglat besitzt mit einer Löslichkeit von 16,10 mM merklich hydrophilere Eigenschaften, ohne das die dadurch erzielbare Verfügbarkeit von Estermolekülen eine schnellere Hydrolysierbarkeit zur Folge hätte.

Kinetische Parameter

Der *Lineweaver-Burk*-Plot für Ethyl- und Benzylester zeigt in Abb. 64 (Tab. 47) deutliche Unterschiede hinsichtlich der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} der enzymatischen Hydrolyse (reziproker Wert aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse). Demnach besitzen Substanzen, deren Regressionsgeraden bei höheren Werten für $1/v_{i, \text{spez.}}$ die Ordinate schneidet, eine geringe V_{\max} . Entsprechend erreicht Benzylphenylacetat die höchste und Ethyltiglat die geringste Maximalgeschwindigkeit. Die lineare Korrelation der einzelnen Messwerte zeigt mit Bestimmtheitsmaßen von $R^2 > 0,90$ für alle untersuchten Ester eine gute Übereinstimmung. Substratinhibierende Effekte wurden nicht festgestellt. Bei Ethyl- und Benzyltiglat sowie Benzylsalicylat konnte eine Abweichung vom linearen Verlauf für hohe Werte für $1/S_0$ (geringe Substratkonzentration: < 0.50 mM) nicht nachgewiesen werden.

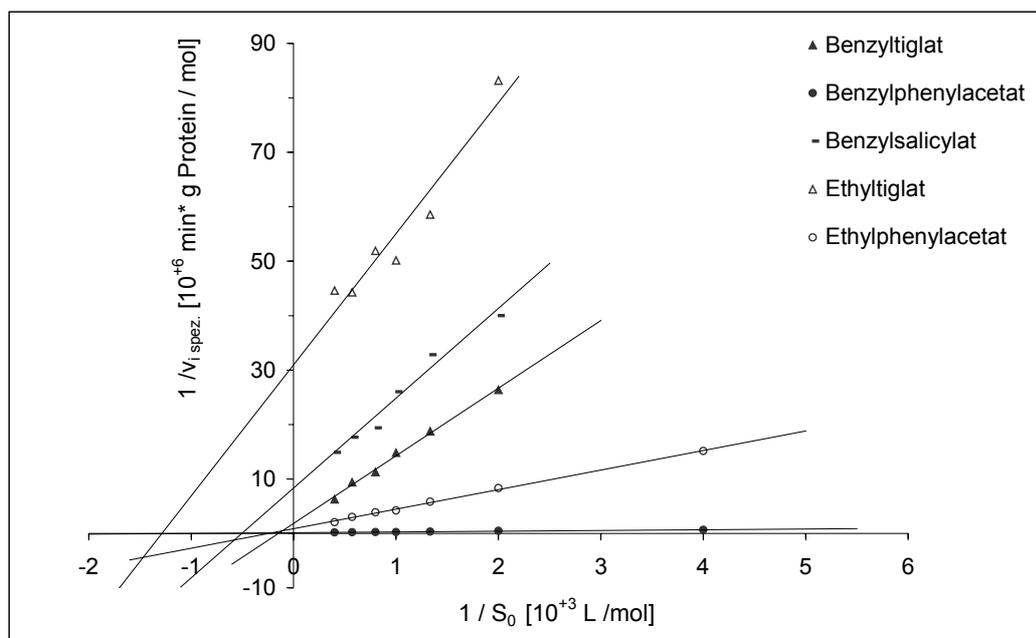


Abb. 64: *Lineweaver-Burk*-Plot: Hydrolyse von verschiedenen Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma

Die Variation der Alkylreste führte bei den untersuchten Benzyl- und Ethylester zu uneinheitlichen Verläufen der Regressionsgeraden im *Lineweaver-Burk*-Plot. Gemäß Abb. 64 lässt sich auf dem *Lineweaver-Burk*-Plot für die Phenylacetatester eine schnelle Hydrolysierbarkeit mit hohen Werten für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} ableiten. Die Tiglin-säureester zeigen dagegen geringe Werte für V_{\max} .

Bei Ethyl- und Benzylestern lässt sich aus dem Alkylrest allein kein Zusammenhang zwischen der Struktur des Carbonsäureesters und seiner enzymatischer Hydrolysierbarkeit in Humanplasma herstellen. Um den Einfluss ausgewählter Acyl- und Alkylreste detaillierter interpretieren zu können, wurden die grafischen Verläufe für Ethylvalerat- und isovalerat sowie Ethyl- und Benzylphenylacetat und –tiglat einzeln dargestellt. Nach Abb. 65 bis Abb. 67 konnten folgende Ergebnisse abgeleitet werden:

Aus dem unterschiedlichen Verlauf der Trendlinien in Abb. 65 resultieren verschiedene Werte der *Michaelis-Menten*-Parameter. V_{\max} ist bei Ethylvalerat gegenüber –isovalerat um das 7,1fache erhöht. Der Wert für die *Michaelis-Menten*-Konstante K_m ist bei Ethylvalerat annähernd doppelt so hoch wie bei Ethylisovalerat. Ethylvalerat und –isovalerat besitzen bei identischem Molekulargewicht eine unterschiedliche chemische Struktur. Sie zeigen ähnliche physikalische Eigenschaften hinsichtlich der Löslichkeit bei 37 °C im Wässrigen ($11,30 \pm 1,25$ mM und $13,90 \pm 0,96$ mM), spezifischer Dichte ($0,87$ und $0,86$ g/cm³) sowie Hydrophobizität ($\log P_{OW}$ von $1,939$ und $1,881$). Der signifikante Unterschied beider Substanzen in der Hydrolysierbarkeit wird somit auf sterische Effekte zurückgeführt.

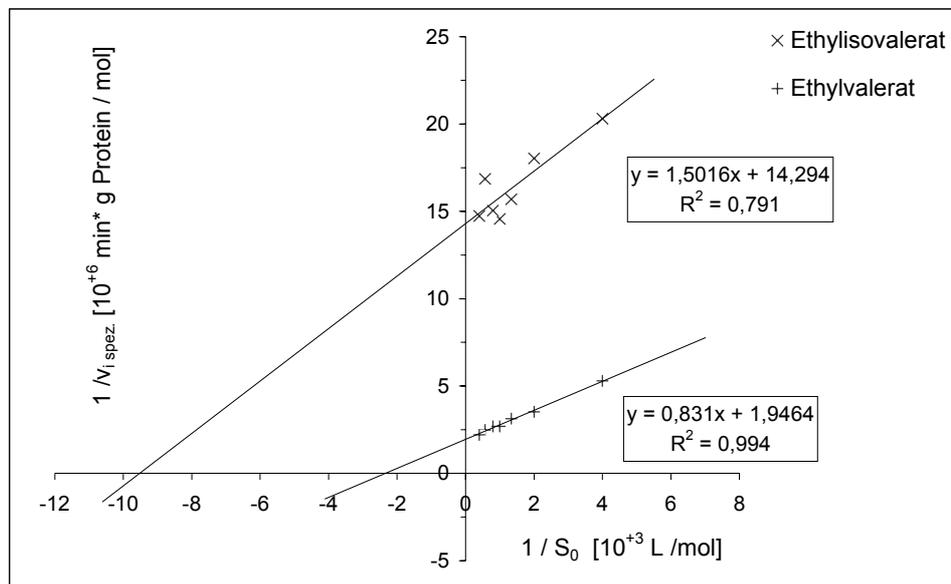


Abb. 65: *Lineweaver-Burk*-Plot: Hydrolyse von Ethylvalerat und –isovalerat in Humanplasma

Die geringere Affinität des Enzymsystem Humanplasma gegenüber Ethylisovalerat führt bereits bei geringen Substratkonzentrationen zum Erreichen der Maximalgeschwindigkeit. Sie ist jedoch im Gegensatz zu Ethylvalerat vergleichsweise gering. Der summarische Effekt lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Eliminierungsgeschwindigkeit maßgeblich durch V_{\max} bestimmt wird und somit Ethylvalerat die schnellere Hydrolysierbarkeit besitzt.

In Abb. 66 und Abb. 67 sind Ethyl- und Benzylester mit verschiedenen Alkylresten gegenübergestellt. Beide Abbildungen deuten auf ein durch den Alkylrest bestimmtes Hydrolyseverhalten hin. Die Benzylester zeigen gegenüber dem Ethylester eine höhere Maximalgeschwindigkeit. Der Unterschied von V_{\max} bei Tiglaten ist mit einem Faktor von 18,1 beträchtlich (Benzyl- \gg Ethyl-), wogegen sich bei Phenylacetaten V_{\max} beim Benzylester nur um den Faktor 4,6 erhöht (Benzyl- $>$ Ethyl-).

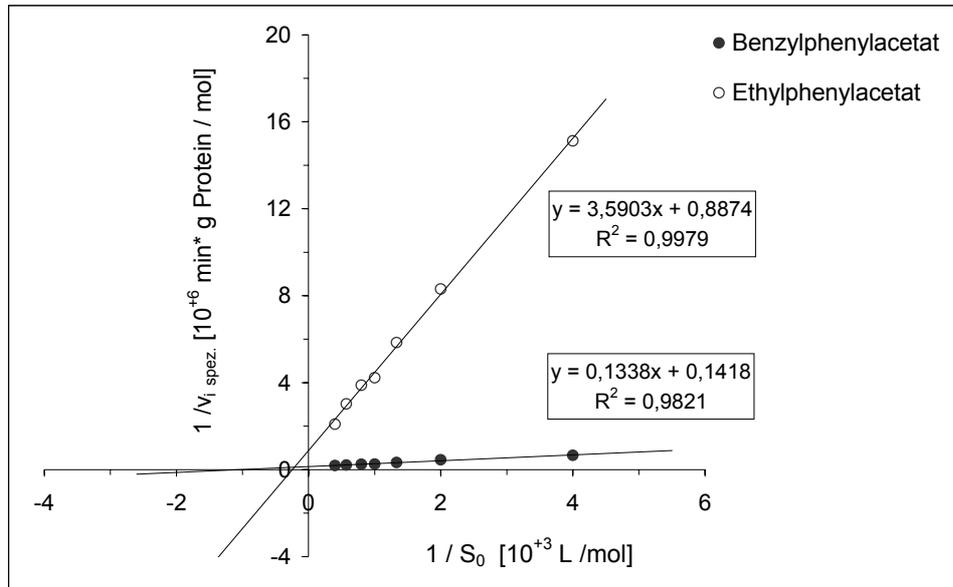


Abb. 66: Lineweaver-Burk-Plot: Hydrolyse von Ethyl- und Benzylphenylacetat in Humanplasma

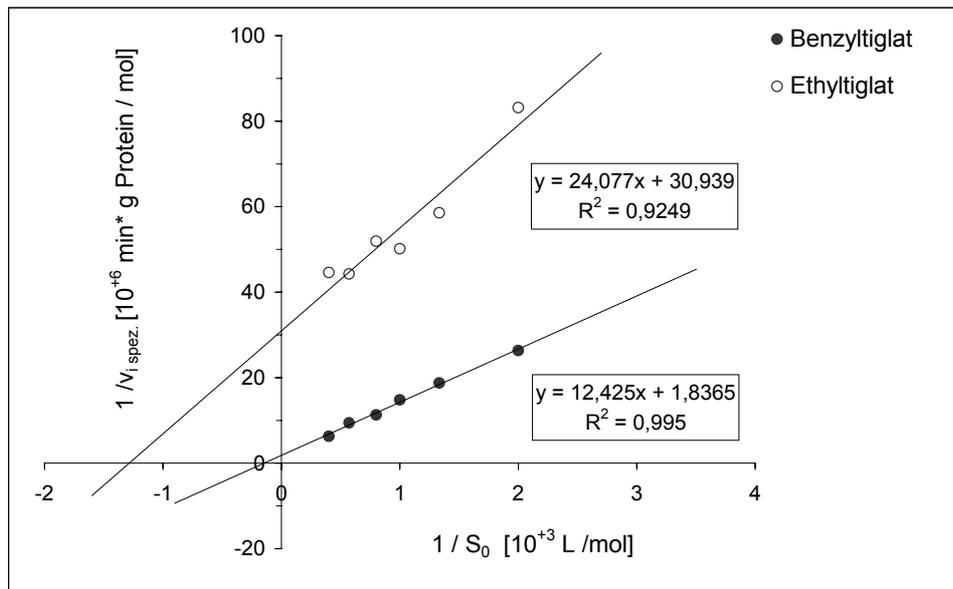


Abb. 67: Lineweaver-Burk-Plot: Hydrolyse von Ethyl- und Benzyltiglat in Humanplasma

Im Konzentrationsbereich 0,25 bis 2,50 mM zeigte die spezifische Hydrolyseaktivität einen Trend zur asymptotischen Annäherung an den konstanten Wert für V_{\max} (Abb. 82). Für Ethylisovalerat und Ethylcinnamat tangiert der Vertrauensbereich für $H_{a, \text{spez.}}$ den Wert für V_{\max} . Der Übergang der enzymatischen Hydrolyse von einer Reaktion erster in eine Reaktion nullter Ordnung kann daher ab einer Substratkonzentration von 2,50 mM für Ethylisovalerat nicht ausgeschlossen werden. Die Schwankung der $H_{a, \text{spez.}}$ -Werte für Ethylcinnamat ist bei Substratkonzentrationen oberhalb von 0,75 mM so hoch, dass ab hier eine Reaktion nullter Ordnung angenommen werden muss. Ein derartiger Effekt wurde bei anderen Estern dieser Strukturklasse nicht festgestellt und die Substratsättigung demzufolge nicht erreicht. Für die *Michaelis-Menten*-Konstante ergibt sich eine entgegengesetzte Reihenfolge. Der K_m -Wert für Benzyltiglat ist mit 7,35 mM ca. 9,4-mal höher als bei Ethyltiglat bestimmt worden. Ethylphenylacetat besitzt gegenüber Benzylphenylacetat einen 6fach erhöhten K_m -Wert.

Gemäß Abb. 67 verläuft der Lineweaver-Burk-Plot bei Tiglaten innerhalb der relevanten Wertepaare annähernd parallel. Die Phenylacetat-Plots schneiden sich in einem spitzen Winkel. Ethylphenylacetat wird anhand von V_{\max} 2,6-mal schneller als Ethyltiglat hydrolysiert. V_{\max} von Benzylphenylacetat ist um das 12fache gegenüber dem Tiglatester erhöht.

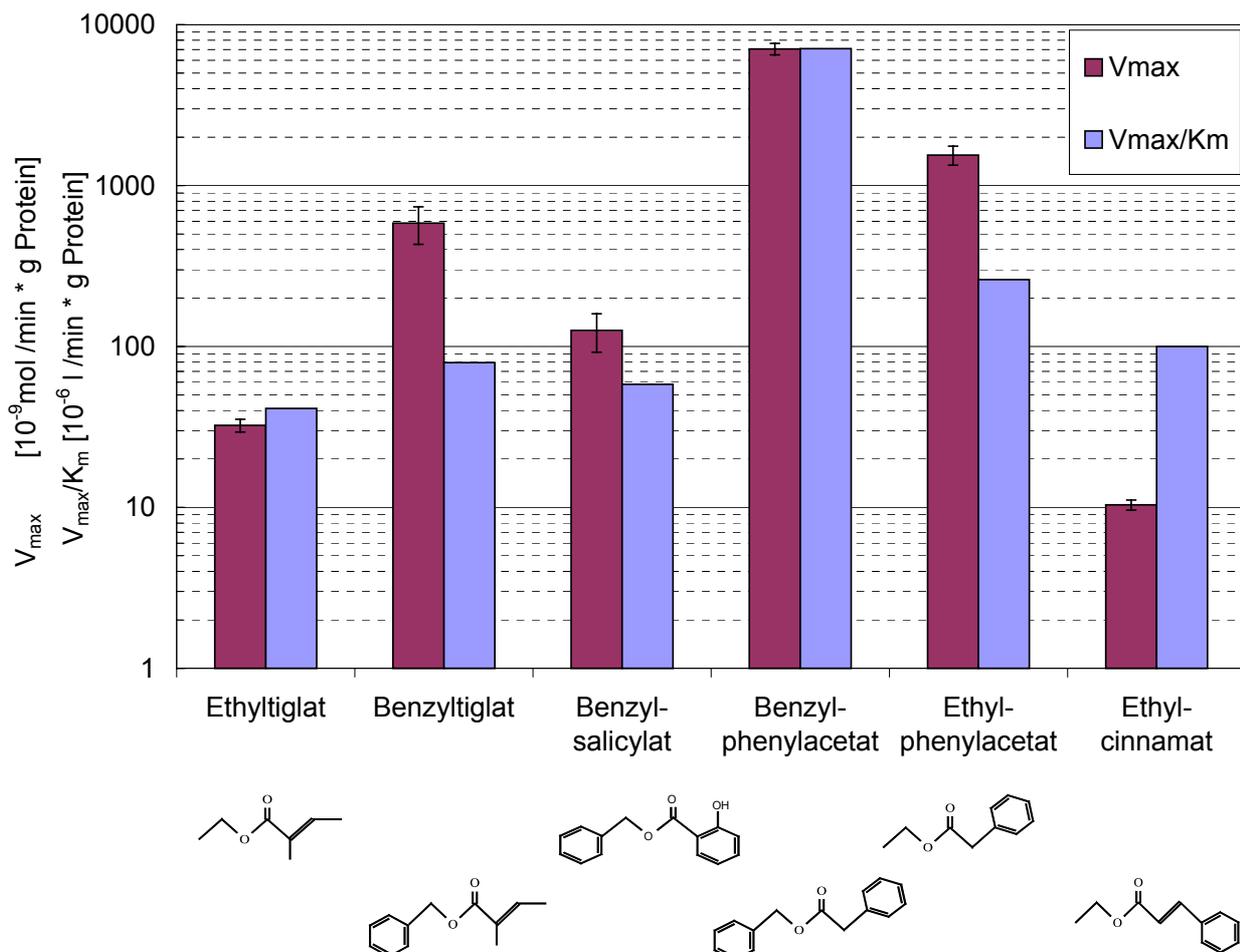


Abb. 68: Maximalgeschwindigkeit und V_{\max}/K_m bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma

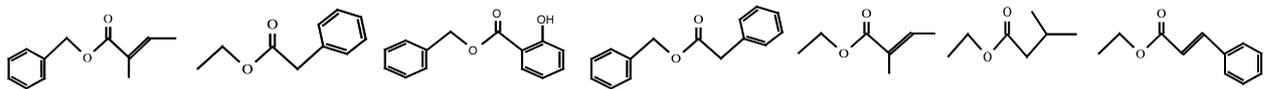
Aus der Maximalgeschwindigkeit ergibt sich folgende Reihenfolge für die Hydrolysierbarkeit:

Benzyl-phenylacetat	>>	Ethyl-phenylacetat	>	Benzyl-tiglat	>	Benzyl-salicylat	>	Ethyl-isovalerat	>	Ethyl-tiglat	>	Ethyl-cinnamat
682	:	149	:	56,3	:	12,1	:	7,1	:	3,1	:	1,0

Der Ethylester der Phenyllessigsäure wird anhand der Maximalgeschwindigkeit 149-mal schneller in Humanplasma hydrolysiert als der Zimtsäureethylester. Diese Reihenfolge stimmt mit den Ableitungen aus der spezifischen Hydrolyseaktivität überein. Bei der Substratanfangskonzentration von 2,50 mM wurde eine um den Faktor 99,6 erhöhte Umsatzrate errechnet. V_{\max}/K_m als Parameter für die Hydrolysierbarkeit ergibt eine veränderte Reihenfolge:

Benzyl-phenylacetat	>>	Ethyl-isovalerat	>	Ethyl-phenylacetat	>	Ethyl-cinnamat	>	Benzyl-tiglat	>	Benzyl-salicylat	>	Ethyl-tiglat
172	:	8,9	:	6,3	:	2,4	:	1,9	:	1,4	:	1,0

Aufgrund des geringen K_m -Wertes wird eine hohe Substrataffinität angenommen, die zur Erhöhung des Koeffizienten führt und als schnellere Hydrolysierbarkeit zu interpretieren ist. Die Substrataffinität für Benzylester nimmt in der Reihenfolge –tiglat > -salicylat > -phenylacetat ab.



Benzyl-tiglat	>	Ethyl-phenylacetat	>	Benzyl-salicylat	>	Benzyl-phenylacetat	>	Ethyl-tiglat	>	Ethyl-isovalerat	>	Ethyl-cinnamat
70,8	:	57,3	:	20,9	:	9,6	:	7,6	:	1,9	:	1,0

Ethylphenylacetat besitzt einen höheren Affinitätsparameter als Ethyltiglat. Die geringste *Michaelis-Menten*-Konstante mit $1,04 \cdot 10^{-3}$ mol/L besitzt Ethylcinnamat. Für die Benzylester sowie Ethyltiglat und –phenylacetat konnte kein signifikanter Unterschied im K_m -Wert nachgewiesen werden. Die Affinität des Enzymsystems Humanplasma ist damit gegenüber den untersuchten Estern annähernd gleich.

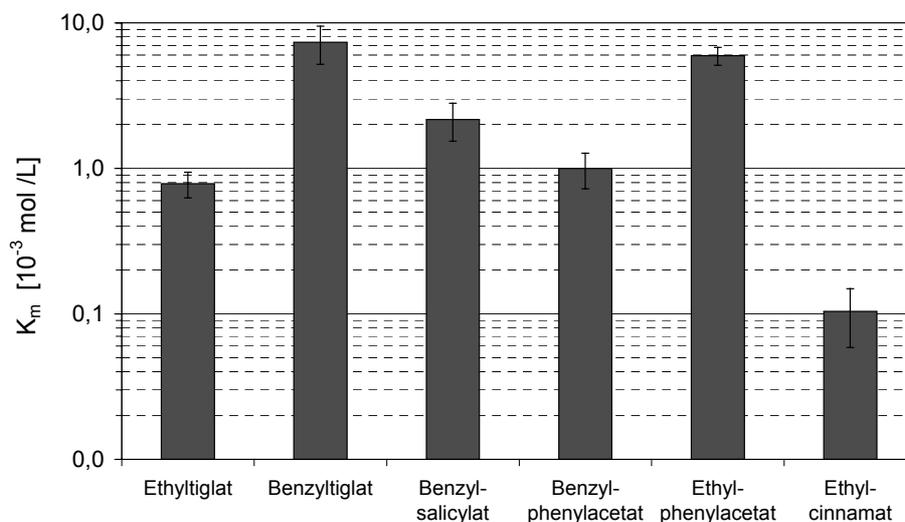


Abb. 69: *Michaelis-Menten*-Konstante K_m der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma

5.7.3 Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur

Spezifische Hydrolyseaktivität

Bei Methyloctanoat und Ethylheptanoat spricht man von inversen Estern, die neben der identischen Summenformel auch eine gleiche Molekülgröße aufweisen. Diese Gemeinsamkeit kann als Ursache für die im folgenden beschriebenen Differenzen zu Isoamylbutyrat mit verzweigtem Alkylrest hinsichtlich der pharmakokinetischen Parameter angesehen werden.

Die spezifische Hydrolyseaktivität wurde in Humanplasma mit einer Substratanfangskonzentration im Bereich von $S_0 = 0,25$ bis $2,50$ mM ermittelt. Ein Anstieg von S_0 ruft bei Isoamylbutyrat, Ethylheptanoat und Methyloctanoat einen sukzessiven Anstieg der spezifischen Hydrolyseaktivität hervor (Anhang II, Tab. 47). Im genannten Konzentrationsbereich erhöhte sich die spezifische Hydrolyseaktivität für Ethylheptanoat um das 3,9fache, für Methyloctanoat um das 5,3fache sowie für Isoamylbutyrat um das 6,6fache.

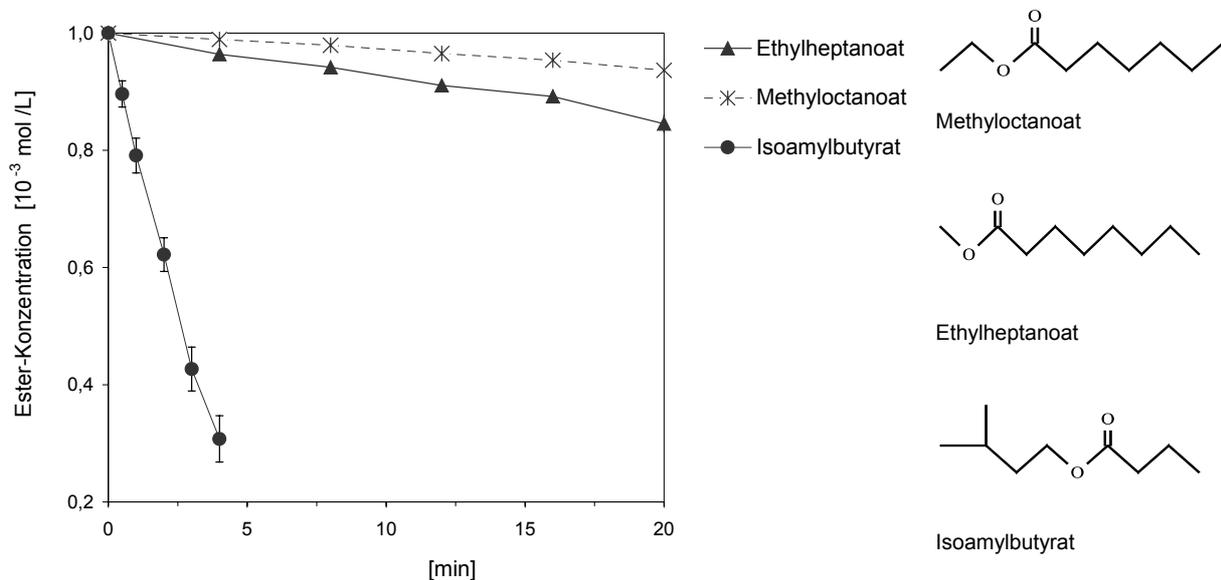


Abb. 70: Hydrolyseverlauf von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

$S_0 = 1,00$ mM; $n = 4$

Isoamylbutyrat wurde mit signifikant höherer Umsatzrate je Zeiteinheit im Vergleich mit Methyloctanoat und Ethylheptanoat im Humanplasma hydrolysiert. Die spezifische Hydrolyseaktivität von Isoamylbutyrat war gegenüber Methyloctanoat und Ethylheptanoat um den Faktor 19 bis 23 erhöht.

Der in Abb. 70 dargestellte Hydrolyseverlauf kennzeichnet diesen Trend und zeigt in Verbindung mit Abb. 71 die resultierende spezifische Hydrolyseaktivität. Der Graf für Isoamylbutyrat zeigt eine hohe Standardabweichung der Ergebnisse. Dieser wird durch die großen Vertrauensintervallen der Messwerte aus gaschromatographischen Buttersäurebestimmung hervorgerufen.

Mit Abb. 71 deutet sich ein Einfluss der Kettenlänge des Acylrestes auf die Hydrolyseaktivität an. Mit zunehmender Kettenlänge des Acylrestes (-butyrat C₄; -heptanoat C₆; -octanoat C₈) wurde ein Abfall der Hydrolyseaktivität in der Reihenfolge -butyrat >> -heptanoat > -octanoat bestimmt. Entsprechend besteht bezüglich der spezifischen Hydrolyseaktivität und Kettenlänge der Alkylreste Methyl- (C₁), Ethyl- (C₂) sowie Isoamyl- (iso-C₅) eine reziproke Reihenfolge: Isoamyl- >> -Ethyl- > Methyl-.

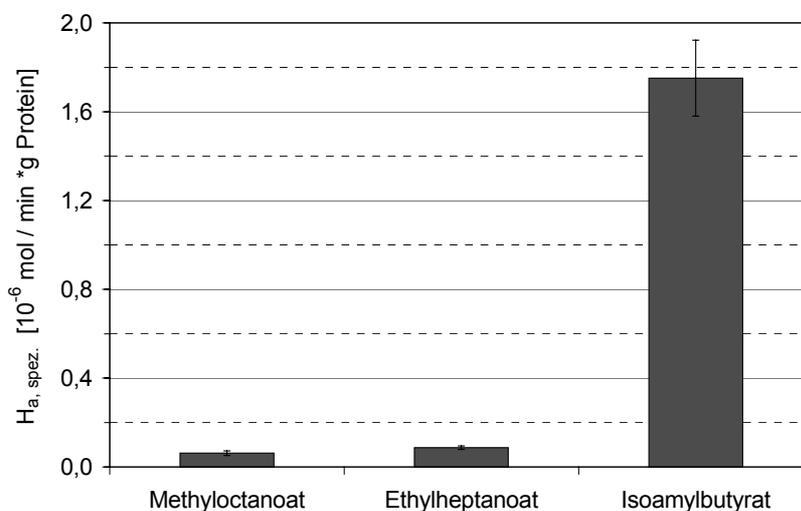


Abb. 71: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

$S_0 = 1,00 \text{ mM}; n = 4$

Halbwertszeit

Abb. 72 zeigt den linearen Plot zur Berechnung der Halbwertszeit für die Reaktion 1. Ordnung. In der Grafik setzt sich der Einfluss des weiten Vertrauensintervalls für die Eduktbildung bei der Hydrolyse von Isoamylbutyrat fort. Ausgehend von der hohen spezifischen Hydrolyseaktivität bei Isoamylbutyrat ergibt sich erwartungsgemäß der geringste Wert für die Halbwertszeit bei der Hydrolyse in Humanplasma. Bei Methyloctanoat und Isoamylbutyrat setzt für Konzentrationen $1,00 \text{ mM} \leq S_0 \leq 2,50 \text{ mM}$ und $0,75 \text{ mM} \leq S_0 \leq 2,50 \text{ mM}$ ein plateauförmiger Verlauf bzw. eine Stagnation der Halbwertszeit ein. Ethylheptanoat zeigt dagegen mit steigender Substratanfangskonzentration einen Anstieg der Halbwertszeit (vgl. Anhang II, Tab. 46).

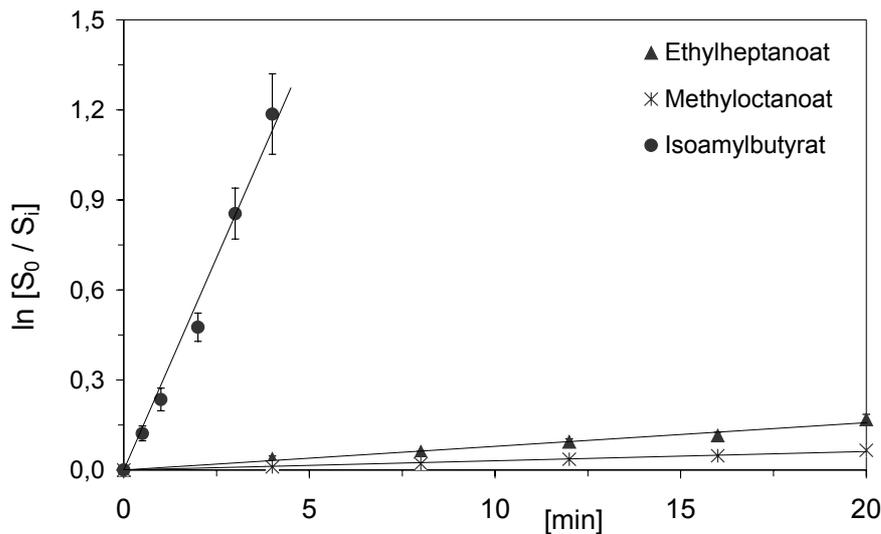


Abb. 72: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k aus Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

$$S_0 = 1,00 \text{ mM}; n = 4$$

Die Halbwertszeit in Humanplasma für die geringste der untersuchten Substratanfangskonzentrationen (0,25 mM) wurde für Isoamylbutyrat (IAB) mit $0,75 \pm 0,13$ min, für Ethylheptanoat (EH) mit $45,0 \pm 7,8$ min sowie für Methyloctanoat (MO) mit $47,7 \pm 3,3$ min bestimmt. Bei dieser Konzentration besitzen Ethylheptanoat und Methyloctanoat annähernd identische Halbwertszeiten. Wird die Substratkonzentration erhöht, so divergieren EH und MO in ihrer Halbwertszeit zunehmend. Bei $S_0 = 1,00$ mM beträgt der Unterschied 21,6 % (EH: $87,9 \pm 4,9$ min und MO: $112,1 \pm 6,6$ min). Die Halbwertszeit für Isoamylbutyrat beträgt dagegen nur $2,47 \pm 0,25$ min (Abb. 73). Bis zu der Substratkonzentration von 2,50 mM erhöht sich die Differenz zwischen EH und MO gering auf 26,3 % (EH: $146,4 \pm 10,0$ min und MO: $108,0 \pm 17,3$ min). Die Halbwertszeit für Isoamylbutyrat beträgt hier $2,87 \pm 0,36$ min.

Die Ester Isoamylbutyrat, Ethylheptanoat und Methyloctanoat haben eine identische Summenformel. Diskutiert man Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der Hydrophobizität, so ergeben sich folgende Aspekte:

Die drei Ester zeigen ähnliche polare Eigenschaften. Steigt mit abnehmender Kettenlänge die Hydrophobie des Alkylrestes, so nehmen in gleichem Maße die hydrophilen Eigenschaften des Acylrestes in der Reihenfolge Methyloctanoat \rightarrow Ethylheptanoat \rightarrow Isoamylbutyrat zu (Abschnitt 5.2). Methyloctanoat, Ethylheptanoat sowie Isoamylbutyrat verfügen bei 37 °C über eine ähnliche Löslichkeit in Krebs-Henseleit-Puffer (siehe Tab. 9). Der davon abweichende Wert für Isoamylbutyrat von 1,52 mM wurde von Longland et al. (1977) bei 37 °C in destilliertem Wasser ermittelt. In vorliegender Studie wurde die Löslichkeit von Isoamylbutyrat mit $0,88 \pm 0,13$ mM in Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) bei 37 °C gemessen.

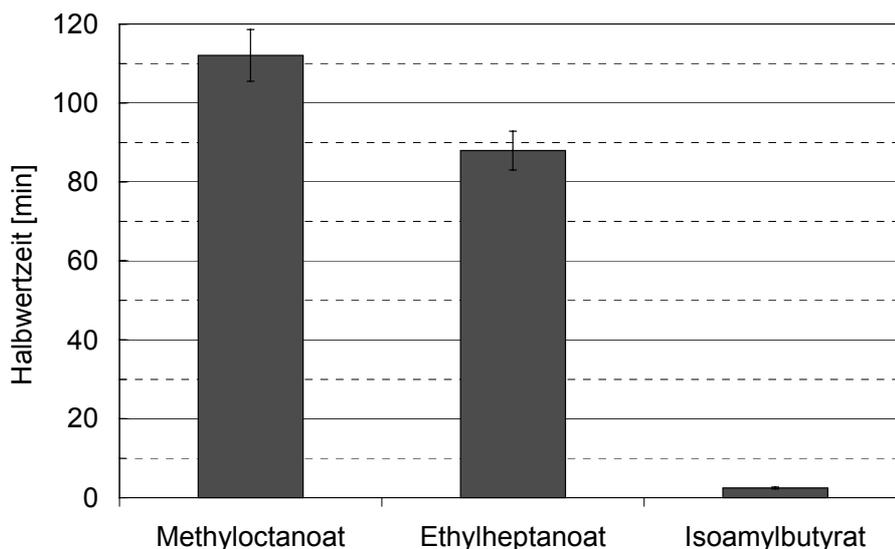


Abb. 73: Halbwertszeit von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

$S_0 = 1,00 \text{ mM}$; $n = 4$

Die stagnierende Halbwertszeit für $S_0 \geq 1,00 \text{ mM}$ und $0,75 \text{ mM}$ für Methyloctanoat und Isoamylbutyrat kann auf die ermittelte Löslichkeitsgrenze zurückgeführt werden. Oberhalb dieser Konzentration liegen keine zusätzlichen Substratmoleküle in Lösung vor, so dass eine enzymatisch katalysierte Umsetzung nicht stattfinden kann. Ein derartiger Effekt wurde für Ethylheptanoat nicht bestimmt.

Kinetische Parameter

Aus den Ergebnissen der spezifischen Hydrolyseaktivität und Halbwertszeit konnte für Ethylheptanoat und Methyloctanoat ein ähnliches Hydrolyseverhalten abgeleitet werden. Diese Tendenz kann anhand der Ableitung von kinetischen Parametern nach *Michaelis-Menten* durch ähnlich verlaufende Lineweaver-Burk-Plots bestätigt werden (Abb. 74 und Abb. 75).

Die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse von Ethylheptanoat liegt unterhalb der von Methyloctanoat. Ein Unterschied um den Faktor 1,7 ist allerdings als nicht signifikant zu bewerten und muss in Verbindung mit Parametern wie Hydrolyseaktivität und Halbwertszeit interpretiert werden.

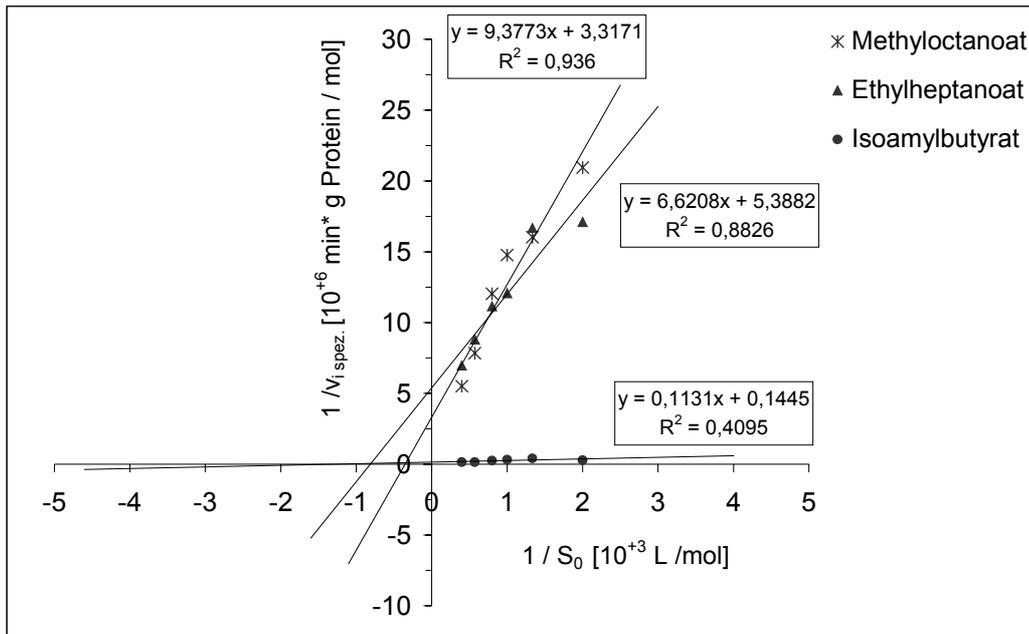


Abb. 74: Lineweaver-Burk-Plot: Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,25 mM bis 2,50 mM wurde die asymptotische Annäherung der spezifische Hydrolyseaktivität ($H_{a,spez.}$) an V_{max} nicht festgestellt (Anhang IV, Abb. 82). Der Übergang der Reaktionsordnung in eine Reaktion nullte Ordnung und Substratsättigung konnte damit nicht nachgewiesen werden. V_{max} für Isoamylbutyrat liegt um das 1,6fache über der spezifischen Hydrolyseaktivität bei $S_0 = 2,50 \text{ mM}$. Für Ethylheptanoat und Methyloctanoat wurden die Faktoren 1,3 und 1,7 berechnet. Die Reihenfolge im Sinne einer schnelleren Hydrolysierbarkeit zeigt Abb. 76.

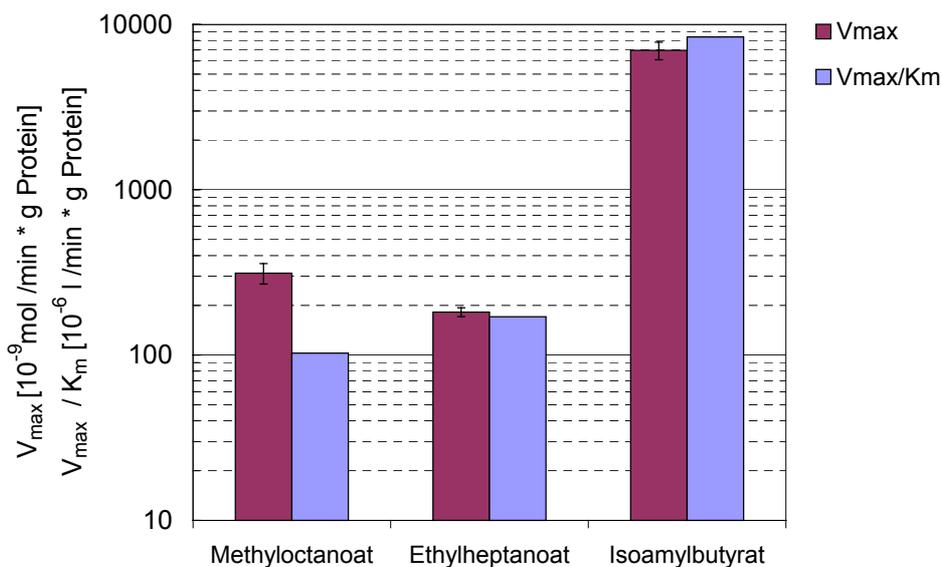


Abb. 75: Maximalgeschwindigkeit und V_{max}/K_m der enzymatischen Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

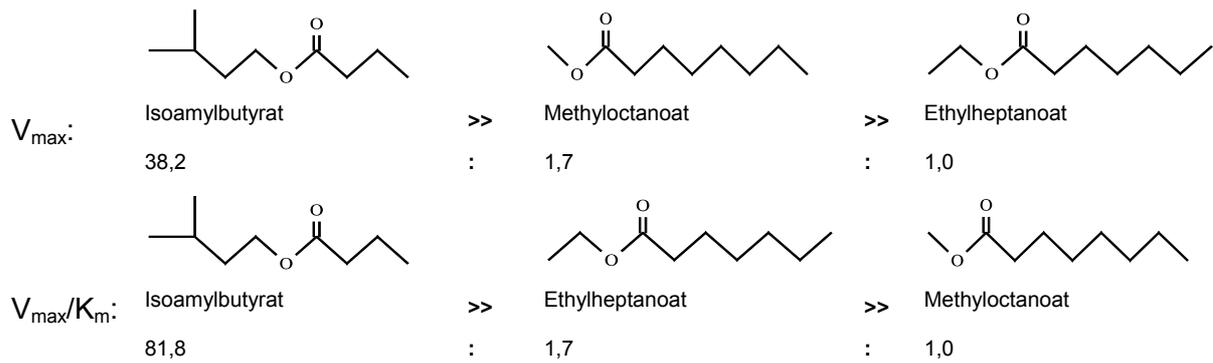


Abb. 76: Maximalgeschwindigkeit und V_{\max}/K_m bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Humanplasma

Der Quotient V_{\max}/K_m bestätigt die Reihenfolge der Hydrolysierbarkeit entsprechend der spezifischen Hydrolyseaktivität und Halbwertszeit. V_{\max}/K_m kann zusätzlich Unterschiede oder Ähnlichkeiten der untersuchten Substanzen im Hinblick auf ihre Hydrolysierbarkeit unter Berücksichtigung des Affinitätsparameters K_m deutlicher hervorheben.

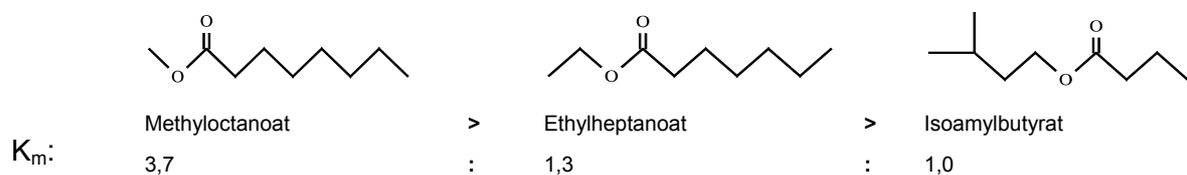
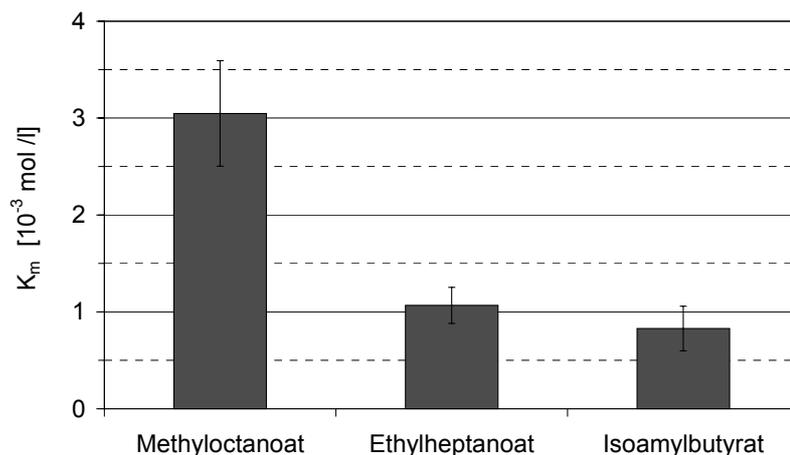


Abb. 77: *Michaelis-Menten*-Konstante der Hydrolyse von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Humanplasma

Methyloctanoat und Ethylheptanoat verfügen als inverse Ester über ähnliche Hydrolyse-eigenschaften. Insbesondere anhand von V_{\max} und V_{\max}/K_m zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Vergleich mit alkylrestverzweigten Isoamylbutyrat. Die Substratanfangskonzentrationen liegen im unteren Soll-Bereich von $0,1K_m$ bis $10K_m$.

Ein signifikanten Unterschied in der Affinität verschiedener Substrate ist gegeben, wenn sich die K_m -Werte um eine Größenordnung von mindestens 10^2 unterscheiden. Somit ist die Affinität zum Enzymsystem Humanblutplasma vergleichbar.

Der maximale Unterschied vom K_m besteht nach Abb. 77 zwischen Methyloctanoat ($3,05 \pm 0,54$ mM) und Isoamylbutyrat ($0,83 \pm 0,23$ mM). Der geringe Unterschied zwischen den Werten führt dazu, dass die Höhe der Maximalgeschwindigkeit um das 10fache überwiegt (Unterschied maximaler Faktor 32,8). Isoamylbutyrat wird unter den untersuchten Reaktionsbedingungen schneller in Humanplasma hydrolysiert. Der Bereich der Substratanfangskonzentration 0,25 mM bis 2,50 mM lag stets unterhalb von $5 \cdot K_m$. Somit wurde die Grenze zur Reaktion nullter Ordnung nicht überschritten.

6 Diskussion

6.1 Metabolismus und Risikobewertung

Für die Bewertung des gesundheitlichen Risikos einer bestimmten Substanz müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Schon Philippus Aureolus Theophrastus Bombast von Hohenheim (1493 – 1541), genannt Paracelsus, stellte fest: „dosis facit venenum“ – „Die Dosis macht das Gift“.

Zunächst benötigt man qualitative Aussagen zum Toxizitätspotential, das heißt der Art des Risikos. Im *zweiten* Schritt sind Informationen zur Wirkungsstärke erforderlich (Dosis-Wirkungsbeziehung). Als *drittes* muss die Exposition des Menschen abgeschätzt werden. Dabei gehen folgende Parameter ein:

- Dosis/Konzentration im Expositionsmedium
- Dauer und Häufigkeit der Exposition
- Einwirkort und Aufnahmewege

Weiter sind Informationen zu Kinetik und Metabolismus erforderlich, zusätzlich müssen Risikogruppen (Kinder, Alte, Kranke, Ethnien) berücksichtigt werden.

In der Regel werden Risikobewertungen auf einer case by case Basis vorgenommen. Bei Aromastoffen, die zum einen sehr zahlreich und zum anderen häufig Naturstoffe sind, hat man sich für ein pragmatisches Bewertungsverfahren ganzer Substanzklassen entschlossen.

Das Munro-Prinzip (Abschnitt 3.2.2) wurde u.a. zur toxikologischen Bewertung von Substanzklassen entwickelt und im Vorfeld unserer Studie bereits auf Ethyl- Isoamyl- und Allylester angewendet (JECFA 1999 und 2000). Bei der Gruppenevaluierung wurden neben der abgeschätzten täglichen Aufnahmemenge auch Daten zur Hydrolysierbarkeit bei der toxikologischen Bewertung berücksichtigt.

Die Aufnahmemenge wurde für Europa und die USA separat abgeschätzt. Der für Europa bestimmte Wert basiert auf den 1995 von der IOFI bereitgestellten Daten. Lebensmittelhersteller stellten hierfür Angaben der Gesamtmenge der Aromastoffe zur Verfügung, die im Laufe eines Jahres zur Aromatisierung ihrer Produkte eingesetzt wurden. Daraus konnte die Menge an Aromastoffen, die in den USA zwischen 1980 und 1987 verwendet wurde, durch Gutachten unter Federführung der National Academy of Sciences (National Research Council) in Zusammenarbeit mit der Food and Drug Administration abgeleitet werden (Semino, 1997).

Die für unsere Studie ausgewählten Substanzen kommen in unterschiedlich hoher Konzentration natürlicherweise in Lebensmitteln vor. Anhang I gibt einen Überblick der wichtigsten Vorkommen und Konzentrationen in verarbeiteten und unverarbeiteten Nahrungsmitteln sowie deren Verwendung in kosmetischen Mitteln.

Die Substanzen werden im Körper vollständig zu Alkohol (Methanol, Ethanol, Isoamylalkohol, Benzylalkohol) und der korrespondierenden Carbonsäure hydrolysiert. Die Hydrolyseprodukte sind endogene Intermediate. Der Metabolismus der Carbonsäuren und Ethanol wurde bereits ausführlich in Abschnitt 2.3 beschrieben.

Die für diese Studie weiterhin relevanten Alkylreste werden wie folgt verstoffwechselt: *Benzylalkohol* wird über Benzaldehyd zu Benzoesäure oxidiert. Diese wird über die Leber nach

mitochondraler Glycinkonjugation unter Hippursäurebildung metabolisiert. *Isoamylalkohol* wird nach Glucuronidierung im Phase II – Metabolismus ausgeschieden. *Phenol* wird in Phase I zu Hydrochinon und Catechol hydroxyliert. Diese werden teilweise zu Benzochinonen oder 1,2,4-Trihydroxybenzol oxidiert, der überwiegende Teil jedoch mit Sulfat oder Glucuronsäure konjugiert. Die Detoxifizierung von *Methanol* erfolgt oxidativ durch Einwirkung von Alkohol- und Formaldehyddehydrogenase, über Formaldehyd zur Ameisensäure. Ameisensäure wird langsam zu Kohlendioxid metabolisiert und kann bei hohen Konzentrationen zur Übersäuerung des Blutes führen (Acidose bei $\text{pH} < 7,35$).

In Obst, insbesondere Südfrüchten, wurden Carbonsäureestern mit Konzentrationen $< 1 \text{ mg/kg}$ nachgewiesen. Die Ester werden direkt in Pflanzen synthetisiert. Das benötigte Acyl-CoA stammt aus der β -Oxidation von Fettsäuren oder aus dem Stoffwechsel von Aminosäuren (Beelitz et al., 2001). Höhere Ester-Mengen ($> 1 \text{ mg/kg}$) werden bei der Verarbeitung oder Zubereitung von Lebensmitteln gebildet und in Konzentrationen von bis zu 50 mg/kg nachgewiesen (siehe Anhang I). Konzentrationen $> 50 \text{ mg/kg}$ können im Enderzeugnis erreicht werden, wenn ein Zusatz von Essenzen erfolgt. Daraus resultiert die Annahme, dass die überwiegende Aufnahme von Carbonsäureestern über den Verzehr entsprechend modifizierter Lebensmittel stattfindet.

6.2 Validierung und Methodik

Für alle in vorliegender Studie zu Hydrolyseuntersuchungen eingesetzten Carbonsäureester wurde zunächst die Löslichkeit in biologischen Medien bestimmt. Dieser Parameter stellt eine wichtige Größe bei der Bewertung von pharmakokinetischen Parametern dar, da letztlich nur in Lösung befindliche Moleküle für die enzymatische Umsetzung zur Verfügung stehen. Als Lösemittel zur Bestimmung wurde Krebs-Henseleit-Puffer ($\text{pH} 7,4$) bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ verwendet. Der Puffer besitzt unter diesen Bedingungen und in seiner chemischen Zusammensetzung mit Ratten- und Humanplasma vergleichbare Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Acylkettenlänge der Ethylester die Hydrophobizität des Gesamtmolekül stark ansteigt und damit die Löslichkeit von 183 mmol/L (für C_3) absinkt auf Werte von unter $0,1 \text{ mmol/L}$ ($> \text{C}_{11}$). Ethylvalerat und -isovalerat besitzen ähnliche polare Eigenschaften; damit haben Verzweigungen in kurzkettigen Acylresten ($< \text{C}_6$) keinen signifikanten Einfluss auf die Polarität des Moleküls.

Aromatische Substituenten verstärken die unpolaren Moleküleigenschaften. Aromatische Reste in Acyl- und Alkylrest von Carbonsäureestern verstärken zusätzlich die hydrophoben Eigenschaften und setzen die Löslichkeit unter oben genannten Bedingungen deutlich herab. Die analysierten Löslichkeiten zeigten eine gute Übereinstimmung mit vorhandenen Daten aus der Literatur. Diese Korrelation konnte zusätzlich durch die Berechnung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{\text{OW}}$) verifiziert werden. Entsprechend wurden die Ester in drei Löslichkeitskategorien eingeteilt und anhand ihres $\log P_{\text{OW}}$ -Koeffizienten in ihrer Tendenz zur Anreicherung im Körper nach der Aufnahme über die Nahrung bewertet.

Als besonders schwer löslich ($< 0,10 \text{ mmol/L}$) erwiesen sich Ethylester mit Acylkettenlängen von mehr als 10 Kohlenstoffatomen (Ethylundecanoat, Ethylmyristat). Löslichkeiten bis

10 mmol/L wurden für Substanzen ermittelt, die mit gleicher Molmasse und unterschiedlicher chemischer Struktur ähnliche polare Eigenschaften aufwiesen (Methyloctanoat, Ethylheptanoat, Isoamylbutyrat). Zu dieser Gruppe gehörten ebenso alle untersuchten Benzylester (-tiglat, -salicylat, -phenylacetat) sowie Ethylcinnamat. Ester mit einer begrenzten Löslichkeit im Wässrigen (Löslichkeit bis 250 mmol/l) besitzen verzweigte oder unverzweigte Acyl- oder Alkylrest und Kettenlängen von maximal fünf Kohlenstoffatomen. Dazu gehören Ethylpropionat, -valerat, -isovalerat. Das Vorhandensein einer trans-Doppelbindung (Ethyltiglat) oder eines aromatischen Rings (Ethylphenylacetat, Phenylacetat) verringert die Löslichkeit nicht signifikant.

Außer Ethylpropionat, -valerat und -isovalerat besitzen alle untersuchten Ester einen $\log P_{O/W}$ -Koeffizienten von > 2 und damit die starke Tendenz, sich im Körper anzureichern, wodurch wiederum die Resorption der Substanzen gehemmt wird. Bei Ethylpropionat, -valerat und -isovalerat ist dagegen mit $0,5 < \log P_{O/W} < 2$ eine gute Resorption und eine nur leichte Tendenz zur Anreicherung gegeben.

Das für die Hydrolyseexperimente verwendete Ratten- und Humanplasma wurde nach den in Abschnitt 8.4.1 und 8.4.2 beschriebenen Methoden gewonnen. Eine Wichtung der Einflüsse, die eine Veränderung der originären Hydrolyseaktivität beider Plasmaarten bewirken, wurde ausführlich in Abschnitt 5.3 diskutiert. Es wurden einheitliche Verfahren erarbeitet, um Einflussfaktoren wie interindividuelle Schwankungen, geschlechtsspezifische und krankheitsspezifische Unterschiede, Tagesschwankungen sowie altersabhängige Schwankungen zu minimieren.

Zusätzlich wurden der Bearbeitungszeitraum der Plasmagewinnung, Proteingehalt und Hämolyse vereinheitlicht, um die Wiederholbarkeit der Hydrolyseaktivität einzelner Pools zu erreichen. Die entsprechende Verifizierung wurde anhand von *Ethylheptanoat*, *Ethyltiglat*, *Benzyltiglat* sowie *Phenylacetat* geführt. Die Voruntersuchungen ermöglichten die Quantifizierung der Methodenreproduzierbarkeit und deren Einflussfaktoren.

Als hilfreich erwies sich die Verwendung von Phenylacetat als Referenzsubstanz. Phenylacetat wurde in Leberhomogenat oder Blutplasma von Mensch oder Ratte durch das Einwirken von unspezifischer Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) und Arylesterase (EC 3.1.1.2) am schnellsten hydrolysiert. Diese Ergebnisse belegen vorhandene Literaturangaben (McCracken, 1993a). Durch die schnelle Hydrolyse konnten bei der Plasmapool-Validierung hemmende Einflüsse auf die Hydrolyseaktivität wie Aussalzeffekte, Denaturierung oder Hämolyse rasch erkannt werden.

Die Ester wurden in 1,4-Dioxan gelöst und aus einer definierten Stammlösung heraus dem Hydrolysemedium zudosiert. Im Hydrolyseansatz konnte damit eine hinreichend genaue Substratanfangskonzentration (S_0) eingestellt werden. Die sich ergebende Schwankung resultierte aus der Skalierung der verwendeten Mikroliterspritze und wurde mit maximal 0,10 μ l abgeschätzt. Aus diesem Volumen wurde eine maximale Konzentrationsdifferenz für S_0 von 1,25 % ($4,00 \pm 0,05$ mmol/l) bis 5 % ($0,25 \pm 0,013$ mmol/l) errechnet. Als geeignetes Lösemittel für Plasma und Leberhomogenat wurde Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) verwendet. Er besitzt in Bezug auf pH-Wert und mineralische Zusammensetzung ähnliche Eigenschaften und minimiert damit den Einfluss auf die Proteinkonformation der Enzyme.

Individuelle Einflüsse wie Alter, Geschlecht oder Tageszeit auf die Enzymkonstitution bei der Plasmagewinnung wurden gemittelt. Die erhaltenen Plasmapools von Ratte und Mensch repräsentierten eine mittlere Enzymkonstitution, die einen Vergleich der Hydrolysierbarkeit der

Ester untereinander erlaubt. Als Indikator dafür diente die spezifische Hydrolyseaktivität von Phenylacetat, Ethylheptanoat, Ethyl- sowie Benzyltiglat. Es konnte gezeigt werden, dass die Schwankung der spezifischen Hydrolyseaktivität der Pools gegenüber den einzelnen Substanzen deutlich unter deren interindividuellen Schwankungen lag (Abschnitt 5.4.4).

Weiterhin wurde der Einfluss der Lagerdauer bei -84°C auf die spezifische Hydrolyseaktivität von Blutplasma untersucht. Während die Lagerung von Plasma bis zu 12 Stunden bei 4°C keinen signifikanten Einfluss auf dessen Aktivität hatte, wurden langsam fallende Werte bei der Lagerung bei -84°C über einen Zeitraum von bis zu 21 Wochen festgestellt. Die Lagerdauer für Plasma, das für Hydrolyseexperimente zum Einsatz kam, wurde daher auf 15 Wochen begrenzt. Es wurde die Vermutung bestätigt, dass insbesondere der Auftauprozess zu starken Aktivitätsverlusten des Plasmas führen kann. Vom kommerziellen Erwerb von Humanplasma für Hydrolysestudien ist abzuraten. Die im Rahmen unserer Studie gewonnene Erfahrung hat gezeigt, dass die einschlägigen Anbieter nur über lückenhafte Informationen in Bezug auf Herkunft, Alter oder Anzahl der Spender verfügen.

Zwingende Voraussetzung für die Darstellung der Hydrolyseeigenschaften nach *Michaelis-Menten* für eine enzymatische Reaktion 1. Ordnung ist die Bestimmung der Enzymaktivität „kurz nach Reaktionsstart“ möglichst innerhalb des *pre-steady-state* und *steady-state* Bereichs. Die Gesamthydrolysezeit wurde für jeden Ester in Abhängigkeit von der Produktbildungsgeschwindigkeit individuell bestimmt.

Folgende Maßgaben wurden festgelegt:

- Die Konzentration des ersten Messpunktes t_1 musste über der Bestimmungsgrenze der jeweiligen Analyten liegen.
- Der Konzentrationsunterschied zwischen aufeinander folgenden Messpunkten musste so groß sein, dass keine Überschneidung der Vertrauensbereiche aus $n = 4$ resultierte.

Zur Beschreibung des Hydrolyseverlaufs wurden die Esterhydrolyseprodukte Alkohol und/oder Carbonsäure gaschromatographisch quantifiziert. Eine Übersicht der wichtigsten Validierungsparameter wie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie Wiederfindungsraten sind in Anhang II zusammengefasst.

Die Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse wurde anhand der Produktbildungs- und Eduktabbaugeschwindigkeit in künstlicher Magenflüssigkeit und Rattenplasma nachgewiesen. Die zu analysierenden Hydrolyseprodukte wurden als Kontrollsubstanzen mit bekanntem Reinheitsgrad käuflich erworben. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde hitzeinaktiviertes Humanplasma sowie Krebs-Henseleit-Puffer dotiert, die Konzentration des Analyten gemessen und daraus die Wiederfindungsrate berechnet. Wiederfindungsraten der Esterhydrolyseprodukte wurden im Bereich von 90,8 bis 113,5 % errechnet. Auf die Einführung von Korrekturfaktoren konnte daher verzichtet werden. Die Abwesenheit des Analyten in den verwendeten Stammlösungen wurde durch Nachweis in den Lösungen mit höchster Substratkonzentration (2,50 mM) belegt. Freie Hydrolyseprodukte (Alkohol oder Carbonsäure) wurden in keiner Stammlösung nachgewiesen.

Die Zeitpunkte der Probenahme wurden für jeden Carbonsäureester individuell bestimmt. Dabei wurde die Gesamthydrolysezeit nach dem Reaktionsstart (Substratzusatz) so kurz wie möglich gehalten. Unerwünschte Einflüsse, die zur Abnahme der Enzymaktivität führen, wurden dadurch minimiert. Relevant waren hierbei Denaturierungsprozesse des Enzyms, Produkt-

hemmung sowie die mit fortschreitender Hydrolysezeit ansteigende Produktkonzentration, wodurch die Rückreaktion sukzessive zunehmenden Einfluss an der Gesamtreaktion gewinnt.

Die kinetischen Parameter nach *Michaelis-Menten*, V_{\max} und K_m , wurden aus dem doppelreziproken Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk abgeleitet. Die Initialzeit „kurz nach Reaktionsstart“ zur Ableitung des Tangentenanstiegs wurde einheitlich mit $t_i = 0,10$ min determiniert. Vorteile dieser Darstellung gegenüber anderen Linearisierungsverfahren waren:

- beste Übereinstimmung der linearen Korrelation sowie
- Möglichkeit des Erkennens von substratinhibierenden Eigenschaften durch Abweichung der Messpunkte von der Geraden bei Überschreitung einer substratspezifischen Konzentration.

Bei der Festlegung der verwendeten Substratanfangskonzentrationen (S_0) wurden vorangegangene Studien zur Orientierung herangezogen. McCracken et al. 1993 und 1993a arbeiteten bei der Untersuchung der hydrolytischen Eigenschaften von Lebercytosol und Lebermikrosomen im Konzentrationsbereich von 0,25 mM bis 4,00 mM. Es wurde berücksichtigt, dass eine Reaktion 1. Ordnung ab $S_0 > 5 K_m$ in eine Reaktion nullter Ordnung übergeht, bei der die Substratkonzentration keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat (Rappoport, 1987). Ab einer Substratkonzentration $> 10 K_m$ wurde durch Dahl & Miller (1985) Substrathemmung festgestellt. Daraus wurde für alle untersuchten Ester ein einheitlicher Konzentrationsbereich von 0,25 mM bis 2,50 mM festgelegt.

Zusätzlich wurde der Zusammenhang von Plasmakonzentration und Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse dargestellt. Die Initialgeschwindigkeit der Hydrolyse von Ethylvalerat und -isovalerat in 1:50, 1:10 sowie unverdünntem Rattenplasma zeigt die in dieser Reihenfolge stetig zunehmende Hydrolyseaktivität (Abb. 44, Tab. 40).

6.3 Esterhydrolyse in verschiedenen biologischen Medien

Ein nächster Abschnitt der Studie führte zu allgemeinen Aussagen, die eine Einordnung der hydrolytischen Aktivität von Humanblutplasma im Vergleich mit anderen physiologischen Medien gegenüber ausgewählten Estern erlauben. Vorangegangene Studien wurden zur Prüfung der Plausibilität der Ergebnisse herangezogen.

Als Hydrolysemedien wurden verwendet:

- Rattenblutplasma,
- Krebs-Henseleit-Puffer als Leerwert für Plasma,
- künstliche Magenflüssigkeit sowie
- Rattenleberhomogenat.

Neben der Referenzsubstanz Phenylacetat wurden Ethylheptanoat, Ethyltiglat, Benzyltiglat untersucht.

Bestimmend für die Hydrolyserate in biologischen Medien ist die Carboxylesterasemenge (EC-Nr. 3.1.1.1). Ursache für deutliche speziesspezifische Unterschiede ist die jeweils vorhandene Enzymmenge. Seit langem ist bekannt, dass die Ratte im Gegensatz zum Menschen über einen erhöhten Carboxylesterase-Level verfügt (McCracken et al. 1993/1993a). Verschiedene

Studien konnte diese Eigenschaften anhand einer Gegenüberstellung von Mensch und Ratte belegen (Aldridge, 1953; Buchwald & Bodor, 2000; Saghir et al., 1999). Minagawa et al. wiesen 1995 anhand der Hydrolyse von Isocarbazylmethylester eine gegenüber Humanblut in Rattenblut erhöhte Esteraseaktivität um den Faktor 400 nach.

Den Einfluss des speziesspezifischen Verteilungskoeffizienten im Blutplasma beschrieb Kaneko (1994). Die Verteilungskoeffizienten von Acetatestern zeigten in Rattenplasma eine gegenüber Humanplasma um den Faktor 2,8 erhöhte Löslichkeit. Daraus resultiert eine erhöhte Verfügbarkeit des Substrats am reaktiven Zentrum der Enzyme im Rattenplasma und gewährleistet damit die schnellere Umsetzung. Entsprechend wurde erwartet, dass die Hydrolyse in künstlicher Magenflüssigkeit mit deutlich geringerer Umsatzrate verläuft. Quinn et al. (1999) beschrieben die katalytische Wirkung von Esterasen im Vergleich zur nichtenzymatischen Hydrolyse. Sie konnten am Beispiel von Acetylcholinesterase gegenüber Acetylcholin zeigen, dass die enzymatische Hydrolyse bei pH 7,0 einen 10^{13} -fach schnelleren Reaktionsablauf aufweist.

Der Gastrointestinaltrakt besitzt einen wichtigen Einfluss auf die Eliminationsgeschwindigkeit von Carbonsäureestern. Die enzymatische Spaltung findet hauptsächlich im Dünndarm und nicht im Magen statt (Aldridge, 1953; Savary & Constantin, 1970). Die Hydrolyse in der Leber läuft mit deutlich höherer Geschwindigkeit ab. Demnach erhöht sich die Halbwertszeit von z.B. Ethylheptanoat in Leberhomogenat im Vergleich zu künstlicher Magenflüssigkeit um einen Faktor von ca. $2,8 \cdot 10^6$. In unserer Studie konnte die beschriebene Reihenfolge der spezifischen Hydrolyseaktivität anhand von Ethyl- und Benzyltiglat bestätigt werden:

	Rattenleber- homogenat	>>	Rattenplasma Pool (r)015.002	>	Humanplasma Pool (h)020.504	>>	künstliche Magenflüssigkeit
Ethyltiglat	$3,8 \cdot 10^4$:	69	:	7,0	:	1
Benzyltiglat	$3,9 \cdot 10^4$:	120	:	2,3	:	1

Die Ergebnisse der methodischen Vorversuche sind plausibel. Es sollte deshalb möglich ein, mit den ausgearbeiteten Methoden mit Hilfe von Studien in Humanplasma allgemeine Aussagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung der Hydrolyse von Estern im Hinblick auf den Metabolismus von Aromastoffen abzuleiten.

6.4 Hydrolyse in Humanplasma

6.4.1 Ethylester mit aliphatisch linear verzweigtem und unverzweigtem Acylrest

Ethylester durchlaufen bei der enzymatischen Hydrolyse den in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Additions-Eliminations-Mechanismus mit einem Übergangszustand in Form des tetrahedralen Intermediats. Mit zunehmender Acylkettenlänge nimmt die Säurestärke mit stärker werdenden Induktionseffekt (+I-Effekt) der korrespondierenden Säure in der Richtung Propionsäure, Valeriansäure, Heptansäure, Undecansäure sowie Myristinsäure ab. Die Säurestärke der Abgangsgruppe nimmt entsprechend zu und stabilisiert den Übergangszustand. Die Säurestärke von Valeriansäure ist gegenüber Isovaleriansäure, aufgrund des zunehmenden +I-Effekts, erhöht.

Die enzymatische Hydrolyse wird durch die Bildung des tetraedrischen Intermediats besonders von sterischen Effekten behindert (Radhakrishnamurti, 1971). Die Verlängerung des Acylrestes von Ethylestern um ein oder zwei Methylgruppen (z.B. Ethylacetat → Ethylpropionat) lässt einen signifikanten Abfall der Hydrolysegeschwindigkeit erwarten. Dieser Trend setzt sich mit zunehmender Kettenlänge nicht fort (Mitzner, 1981; Vollhardt & Schore, 1994).

Verzweigungen führen nur in unmittelbarer Nähe der Carbonylfunktion zum Abfall der Hydrolysegeschwindigkeit. Je weiter sich diese Funktion von der funktionellen Gruppe entfernt, umso geringer ist der Einfluss auf den Reaktionsablauf. Voluminöse Substituenten in α -Position beeinträchtigen die Reaktivität der Carbonylfunktion (Barton, et al. 1994). Wird das Reaktionszentrum durch benachbarte Substituenten sterisch abgeschirmt, verringert sich die Geschwindigkeitskonstante (F-strain-Effekt).

Diese sterischen Effekte bewirken eine Hemmung der intermolekularen Beweglichkeit sowie eine steigende Spannung im Übergangszustand, was dessen Bildungsgeschwindigkeit herabsetzen oder ausschließen kann (Saleh, 1981; DeTar et al., 1980). Den sterischen Substituenteneinfluss beschreibt Saleh (1981) anhand der sauren Hydrolyse von n- und iso-Propylacetat. Die zunehmende Kettenlänge des Alkylrestes bei Acetaten führte zum Abfall der Geschwindigkeitskonstante in der Reihenfolge Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, n-Amyl- und iso-Amylacetat. In Anlehnung an Taft wurde berechnet, dass die Werte für die sterische Substituentenkonstante (E_s) in der Reihenfolge Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, n-Butyl-, iso-Propyl-, iso-Butyl- und tert-Butylacetat abnehmen. In gleichem Maße wurde bei der sauren Hydrolyse eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstante beobachtet (Hancock, 1961).

Der α -Methylsubstitution wird ein geringer Einfluss auf K_m und V_{max} zugeschrieben (Hosokawa et al., 1990). Die Einführung von Verzweigungen im Estermolekül wird mit einer Erhöhung der Toxizität der jeweiligen Substanz beschrieben (Taylor & Dormedy, 1998). Für die zusammenfassende Bewertung der Hydrolysierbarkeit werden im Folgenden die Trends für die berechneten pharmakokinetischen Parameter zusammengestellt (Tab. 16).

Tab. 16: Reihenfolge der untersuchten Ethylester mit zunehmender Hydrolysierbarkeit und Substrataffinität in Humanplasma

spezifische Hydrolysierbarkeit	Halbwertszeit	Maximalgeschwindigkeit	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante	Maximalgeschwindigkeit / <i>Michaelis-Menten</i> -Konstante
$H_{a, \text{spez.}}$ - steigend	$t_{1/2}$ - fallend	V_{max} - steigend	K_m - fallend	V_{max}/K_m - steigend
Myristat	Myristat	Myristat	Myristat	Myristat
Undecanoat	Undecanoat	Undecanoat	Heptanoat,	Undecanoat
Heptanoat	Heptanoat	Isovalerat	Propionat,	Heptanoat
Isovalerat	Isovalerat	Heptanoat	Undecanoat	Isovalerat /Propionat
Propionat	Propionat	Propionat	/Valerat/Isovalerat	
Valerat	Valerat	Valerat		Valerat

Mit zunehmender Hydrolysierbarkeit steigen die Werte für die Parameter, $H_{a, \text{spez.}}$, V_{max} und V_{max}/K_m an und zeigen für die untersuchten Ester einen einheitlichen Trend. Eine negative Korrelation von Hydrolysierbarkeit und Halbwertszeit oder *Michaelis-Menten*-Konstante bestätigt dieses Ergebnis. Auffällig ist die einheitliche Abnahme der Hydrolysierbarkeit mit zunehmender Acylkettenlänge. Longland et al. (1977) konnten diesen Effekt für künstliche Magen- und Pankreasflüssigkeit, Leber- sowie Dünndarmmucosapräparationen belegen (vgl. **Tab. 4**).

Die zunehmende Kettenlänge des Acylrests führt zum Anstieg der hydrophoben Eigenschaften des Esters (**Tab. 9**). Die Abhängigkeit der Hydrolyserate von der Kettenlänge des Acylrestes wurde im Zusammenhang mit der Hydrophobizitätskonstante beschrieben (Dahl & Miller, 1985). Bei der Hydrolyse von Methylestern durch Carboxylesterase (EC-Nr. 3.1.1.1) aus Rattenlebermikrosomen wurde eine Vergrößerung von V_{max} bei ansteigenden Acylkettenlänge von C_1 bis C_5 beobachtet.

Nach dem Erreichen eines Maximums für V_{max} bei der Acylkettenlänge C_5 wurde mit weiter ansteigender Kettenlänge ein Abfall der V_{max} -Werte festgestellt. Anhand unserer Ergebnisse konnte gemäß **Abb. 55** ein ähnlicher Verlauf für die Hydrolyse von Ethylestern in Humanplasma ermittelt werden. Der höchste Wert für V_{max} wurde bei der Acylkettenlänge C_5 (Ethylvalerat) bestimmt. Bis C_{13} (Ethylmyristat) fällt V_{max} auf ein Minimum ab. Damit werden Ethylvalerat und -propionat als schnell in Humanplasma hydrolysierbar eingestuft. Ethylundecanoat und -myristat wurden unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen vergleichsweise langsam hydrolysiert. Ethylheptanoat weist eine mittlere Hydrolysierbarkeit auf.

Aus der hohen Hydrophobizität für Ethylmyristat und -undecanoat lässt sich eine erhöhte Affinität des Enzymsystems bei der Substratbindung ableiten. Daher kann von einer begünstigten lipatischen Hydrolyse der Ester ausgegangen werden. Der Hauptanteil der enzymatischen Hydrolyse ist im Humanplasma jedoch auf die unspezifische Carboxylesterase (EC-Nr. 3.1.1.1) zurückzuführen. Daraus folgt eine geringe Verfügbarkeit der Substrate am reaktiven Zentrum und damit die vergleichsweise niedrige Umsatzrate.

Ethylisovalerat wird gegenüber Ethylvalerat in Humanplasma langsamer hydrolysiert. Am Beispiel der sauren Hydrolyse von Ethylisovalerat konnte Vinnik (1976) zeigen, dass beim Angriff des Nucleophils das Carbonylkohlenstoffatom mit mindestens einem Wassermolekül solvatisiert vorliegt. Die Ursache der verschiedenen Reaktionsmechanismen von geradkettigen und α -verzweigten Alkylestern kann damit der Solvation zugeschrieben werden (Mitzner, 1981).

Buchwald & Bodor (2000) beschreiben die theoretische Ableitung der Halbwertszeit für die enzymatische Hydrolyse unter Berücksichtigung der sterischen Hinderung in der Nähe des

Carbonylsauerstoffatoms. Die sterische Hinderung wird als ein Faktor für die signifikant verringerte Hydrolyserate für Ethylisovalerat im Vergleich zu Ethylvalerat angesehen. Insbesondere die voluminösere Ausdehnung der Isovaleriansäure in α -Position des Esters reduziert die Reaktivität der Carbonylfunktion besonders dann, wenn der betreffende Substituent am Reaktionszentrum oder in dessen Nähe gebunden ist (Barton, et al. 1994).

Sterische Effekte bewirken damit eine Hemmung der intermolekularen Beweglichkeit sowie eine steigende Spannung im Übergangszustand, was dessen Bildungsgeschwindigkeit herabsetzen oder ausschließen kann (Saleh, 1981). Ein Maß für die ausgeübte Abschirmung ist die sterische Substituentenkonstante E_s . Je raumfüllender die Substituenten sind, um so negativer wird E_s und desto langsamer verläuft die Hydrolyse des entsprechenden Esters. Da Abstoßungskräfte auf dem Weg zum Übergangszustand überwunden werden müssen, steigen die Werte für die molare Reaktionsenthalpie entsprechend; die Reaktionsentropie wird negativer. Beide Einflüsse führen über die *Gibbs-Helmholtz-Gleichung* zu einer Erhöhung der molaren Aktivierungsenthalpie.

Die aufeinanderfolgenden Abschnitte der enzymatischen Serin-Esterase-Hydrolyse (Acylation und Deacylation) sind getrennt von einander zu betrachten und zu bewerten (DeTar und Tenpas, 1976 und 1976a). Der zweite Reaktionsschritt der enzymatischen Spaltung, der Angriff des Wassermoleküls nach der Protonierung des Esters, wird besonders durch sterische Faktoren beeinflusst. Der vergleichsweise geringe polare Einfluss auf die Umsatzrate kann vernachlässigt werden.

6.4.2 Ethyl- und Benzylester mit verzweigtem oder aromatischem Acylrest

Die zusammenfassende Gegenüberstellung der Ester zeigt, dass beide untersuchten Phenylacetatester in Humanplasma am schnellsten hydrolysiert wurden (Tab. 17). Für Tiglate, Cinnamate sowie Salicylate wurde einheitlich eine signifikant langsamere Hydrolysierbarkeit bestimmt. Die Hydrolysierbarkeit von Ethylisovalerat ist mit diesen Substanzgruppen vergleichbar.

Phenylacetatester sind die am schnellsten hydrolysierbaren Ester. Unter Berücksichtigung der großen Halbwertzeit und geringen spezifischen Hydrolyseaktivität wurden Ethylisovalerat und Ethylcinnamat trotz eines vergleichsweise hohen V_{max}/K_m -Quotienten als langsam hydrolysierbar bewertet. Geringe *Michaelis-Menten*-Konstanten erlauben das Erreichen der Maximalgeschwindigkeit schon bei geringen Substratanfangskonzentrationen. Der Einfluss des Parameters V_{max} überwiegt und begründet obige Einstufung.

Die untersuchten Substanzgruppen verfügen über voluminöse Substituenten mit Hydroxy-Gruppen und/oder Doppelbindungen in Kombination mit aromatischen Ringen sowie Verzweigungen in der Nähe der Carbonylfunktion. Diese Faktoren bedingen sterische Hinderungen, die wiederum einen hydrolysehemmenden Effekt hervorrufen.

In Verbindung mit der in Tab. 17 beschriebenen Reihenfolge lassen sich sterische Effekte als Ursache für die abfallende Hydrolysierbarkeit ableiten. Diese Effekte wurden anhand verschiedener biologischer Materialien von der Ratte beschrieben. Die langsame Hydrolysierbarkeit von Methylsalicylat wurde von Kakkar & Mayersohn (1998) durch *in vivo* Studien an der Ratte untersucht. Die Plasmahalbwertzeit wurde mit ≈ 36 min angegeben.

Tab. 17: Reihenfolge der untersuchten Ethyl- und Benzylester mit zunehmender Hydrolysierbarkeit und Substrataffinität in Humanplasma

spezifische Hydrolysierbarkeit	Halbwertszeit	Maximalgeschwindigkeit	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante	Maximalgeschwindigkeit / <i>Michaelis-Menten</i> -Konstante
$H_a, \text{spez.} - \text{steigend}$	$t_{1/2} - \text{fallend}$	$V_{\text{max}} - \text{steigend}$	$K_m - \text{fallend}$	$V_{\text{max}}/K_m - \text{steigend}$
Ethylcinnamat	Ethylcinnamat	Ethylcinnamat	Benzyltiglat	Ethyltiglat
Ethyltiglat	Ethyltiglat	Ethyltiglat	Ethylphenylacetat	Benzylsalicylat
Benzylsalicylat und Ethylisovalerat	Benzylsalicylat	Ethylisovalerat	Benzylsalicylat	Benzyltiglat
Ethylisovalerat	Benzyltiglat und Ethylisovalerat	Benzylsalicylat	Benzylphenylacetat	Ethylcinnamat
Benzyltiglat	Ethylisovalerat	Benzyltiglat	Ethyltiglat	Ethylphenylacetat
Ethylphenylacetat	Ethylphenylacetat	Ethylphenylacetat	Ethylisovalerat	Ethylisovalerat
Benzylphenylacetat	Benzylphenylacetat	Benzylphenylacetat	Ethylcinnamat	Benzylphenylacetat

Sterische Effekte werden durch Verzweigungen oder voluminöse Substituenten hervorgerufen. Zusätzlich können elektronische Faktoren wie Hydroxy-Gruppen die Carbonylaktivität der funktionellen Gruppe herabsetzen, da diese eine erhöhte Polarität der Carbonylgruppe bewirken und damit eine verstärkte Ausprägung der Solvathülle verursachen. Letztlich wird dadurch ein Substratangriff auf das reaktive Zentrum der Hydrolyse erschwert (Rakshit & Datta, 1976 und 1979).

Mesomeriehemmung tritt auf, wenn die an der Konjugation beteiligten Atome gehindert werden, in einer Ebene zu liegen und damit der M-Effekt gemindert wird. Substituentenkonstanten σ^* werden erheblich durch Resonanzeffekte beeinflusst. Wird wie bei Phenyl- oder Vinylestern die Resonanz zwischen Carbonylgruppe und Substituent unterbunden, läuft im Vergleich zur sauren Hydrolyse die alkalische schneller ab. Für ungesättigte Gruppen nehmen die Werte für σ^* entsprechend der Entfernung des ungesättigten Restes von der Estergruppe ab (Evans, 1971).

Den Einfluss von oxidierten Acylresten (Alkoxy- und α -Hydroxy-Gruppen) auf die Hydrolyseaktivität von Lipasen beschreiben Adamczyk & Grote (1999). Die erhöhte Anzahl von Sauerstoffatomen im Substratmolekül (Benzylphenoxyacetat im Vergleich zu Benzylphenylacetat) setzt die Hydrolysierbarkeit durch Lipasen herab. Das zusätzliche Sauerstoffatom verstärkt die Elektrophilie der Carbonylgruppe. Die Polarität des Moleküls wird erhöht und eine Hydratation begünstigt. Entsprechend sinkt die Substratbindungswahrscheinlichkeit.

Beide Einflüsse sind besonders wirksam, wenn beeinflussende Moleküle in der Nähe des Carbonylkohlenstoff- und/oder -sauerstoffatoms lokalisiert sind. Zimtsäure besitzt wie Phenyllessigsäure die Phenylgruppe im Acylrest und zusätzlich eine *trans*-Doppelbindung im entsprechenden Molekülrest.

Doppelbindungen oder Ringe in der Nähe der Carbonylfunktion verringern bekanntermaßen die Hydrolyserate. Für die Substituenten *phenyloxypropanoat*, *phenylpropanoat*, *phenylcyclopropanoat* und *trans-3-phenylpropenoat (cinnamat)* wurde ein Abfall der Umsatzrate in der Reihenfolge 85 : 70 : 2 : 1 beschrieben (Basak et al., 1997).

6.4.3 Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur

Die Gegenüberstellung der untersuchten Ester mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur zeigen gemäß Tab. 18 eine einheitliche Reihenfolge in der Hydrolysierbarkeit.

Tab. 18: Reihenfolge der zunehmenden Hydrolysierbarkeit und Substrataffinität bei Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur

spezifische Hydrolysierbarkeit $H_{a, \text{spez.}}$ – steigend	Halbwertszeit $t_{1/2}$ - fallend	Maximalgeschwindigkeit V_{max} - steigend	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante K_m – fallend	Maximalgeschwindigkeit / <i>Michaelis-Menten</i> -Konstante V_{max}/K_m - steigend
Methyloctanoat	Methyloctanoat	Ethylheptanoat	Methyloctanoat	Methyloctanoat
Ethylheptanoat	Ethylheptanoat	Methyloctanoat	Ethylheptanoat	Ethylheptanoat
Isoamylbutyrat	Isoamylbutyrat	Isoamylbutyrat	Isoamylbutyrat	Isoamylbutyrat

Die drei untersuchten Substanzen zeigen ähnliche polare Eigenschaften. Mit zunehmender Kettenlänge steigt die Hydrophobie des Alkylrestes in der Reihenfolge Methyloctanoat, Ethylheptanoat und Isoamylbutyrat. In gleichem Maße nehmen die hydrophilen Eigenschaften des Acylrestes zu. Im Gesamtmolekül heben sich diese Einflüsse auf. Daher besitzt die Hydrophobizität auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung nur einen untergeordnete Einfluss.

Alle Bewertungsparameter ergaben die schnellste Hydrolysierbarkeit für Isoamylbutyrat, dessen Hydrolyseeigenschaften sich damit deutlich von Ethylheptanoat und Methyloctanoat unterscheiden. Eine Verzweigung löst sterische Effekte nur dann aus, wenn sie sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Carbonylkohlenstoff- und/oder –sauerstoff befindet. Mit jeder durch eine CH_2 -Gruppe hervorgerufene Entfernung von der Carbonylfunktion nimmt der Einfluss exponentiell ab.

Der Isoamyl-Alkylrestes weist keine hemmenden Einflüsse auf die Umsatzrate auf. Dieser Effekt ist auf den deutlichen Abstand des Isoamylrestes von der funktionellen Gruppe um drei Kohlenstoffatome zurückzuführen. Ein sterischer Effekt, der mit inhibierenden Hydrolyseeigenschaften einhergeht, wurde nicht nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ruft eine Verzweigung im Abstand von zwei C-Atomen im Acylrest (-isovalerat) eine deutlich reduzierte Umsatzrate hervor.

Dieser signifikante Einfluss im Vergleich zum nichtverzweigten Isomer (-valerat) wurde bereits in Abschnitt 5.7.1 erläutert. Im Vergleich der chemischen Struktur von Ethylvalerat und Isoamylbutyrat wird zusätzlich deutlich, dass sich die *iso*-Amylgruppe von Isoamylbutyrat im Alkylrest, und damit auf der carbonylfunktion-abgewandten Seite befindet. Demnach hat die *iso*-Butyl-Gruppe nur einen geringen Einfluss auf Geschwindigkeit der enzymatische Esterhydrolyse.

Unter der Voraussetzung, dass freigesetzte langkettige freie Fettsäuren weiter metabolisiert werden (Abschnitt 2.3), kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine schnelle enzymatische Hydrolyse auch bei Ethylheptanoat und Methyloctanoat erfolgt. Ein Nachweis der Spaltprodukte aufgrund hoher Synthaseaktivitäten kann ein verfälschendes Bild zeichnen.

6.4.4 Bewertung der Hydrolysierbarkeit

Anhand der chemischen Struktur eines Moleküls ist es möglich, Rückschlüsse auf den zu erwartenden Reaktionsverlauf und die Umsatzrate der Solvolyse zu ziehen. Die Bereitschaft einer Substanz schnell oder langsam zu reagieren, stellt eine relative Eigenschaft dar, deren Ableitung auf der Verallgemeinerung empirischer Beziehungen zwischen Struktur, Reaktivität und Selektivität beruht. Diese Aspekte sind nur auf Reaktionen mit ähnlichem Mechanismus anzuwenden und können qualitativer wie quantitativer Art sein.

Die Ableitung von Hydrolyseeigenschaften erfolgt anhand von Parametern, die möglichst unabhängig von den experimentellen Gegebenheiten sind und sich unabhängig davon interpretieren und somit verallgemeinern lassen. Die spezifische Hydrolyseaktivität ist unter den Bedingungen einer enzymatischen Reaktion 1. Ordnung stets abhängig von der Substratanfangskonzentration (S_0). Die Studie hat gezeigt, dass die Halbwertszeit ebenso von S_0 bestimmt wird. Kinetische Parameter können dagegen relativ unabhängig interpretiert werden. V_{\max} beschreibt eine aus einem mathematischen Algorithmus heraus extrapolierte Maximalgeschwindigkeit, die experimentell und *in vivo* nie erreicht werden kann.

Die Bioverfügbarkeit eines Substrats im Enzymsystem wird durch die Resorption in Blutkapillaren und Membrantransport durch Diffusion bestimmt. Der passive Transport entlang eines Konzentrationsgefälles, aber auch die erleichterte Diffusion durch Carriemoleküle (aktivierter Transport) wird durch den Affinitätsparameter K_m bestimmt. Dieser Einfluss ist für die untersuchten Substanzen annähernd gleich.

Der Quotient V_{\max}/K_m wurde in der Literatur bereits als unabhängiger Parameter für die Hydrolysierbarkeit beschrieben (McCarthy, 1996). Der Quotient ist stets größer als V_{\max} ($V_{\max} : V_{\max}/K_m \approx 1 : 2,1$) und kann damit kleine Unterschiede in der Hydrolysierbarkeit anhand von V_{\max} oder $H_{a, \text{spez.}}$ deutlich machen oder statistisch gesicherte Reihenfolgen hervorheben oder bekräftigen.

Abb. 78 bis Abb. 80 geben eine Zusammenstellung der kinetischen Parameter aller untersuchter Ester in absteigender Reihenfolge ihrer Absolutwerte.

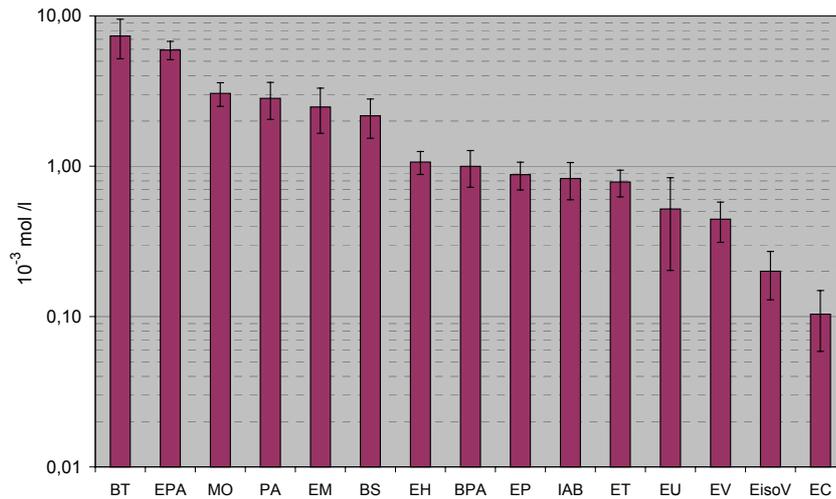


Abb. 78: *Michaelis-Menten-Konstante K_m für die enzymatische Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma*

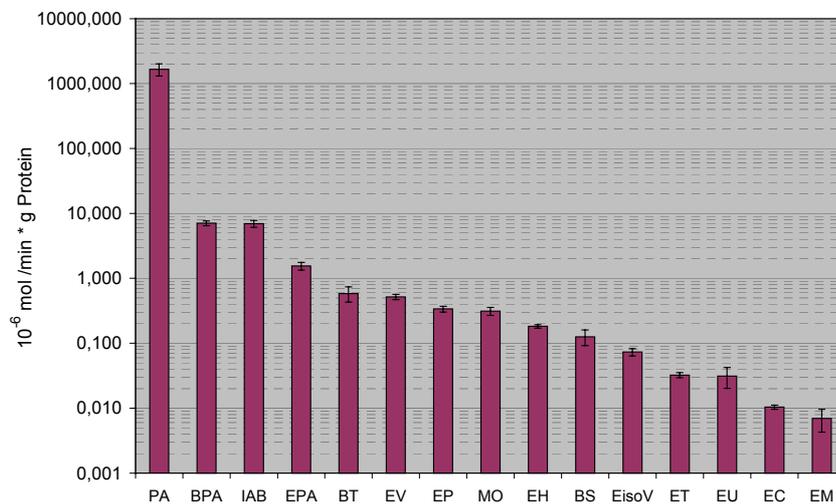


Abb. 79: Maximalgeschwindigkeit V_{max} der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma

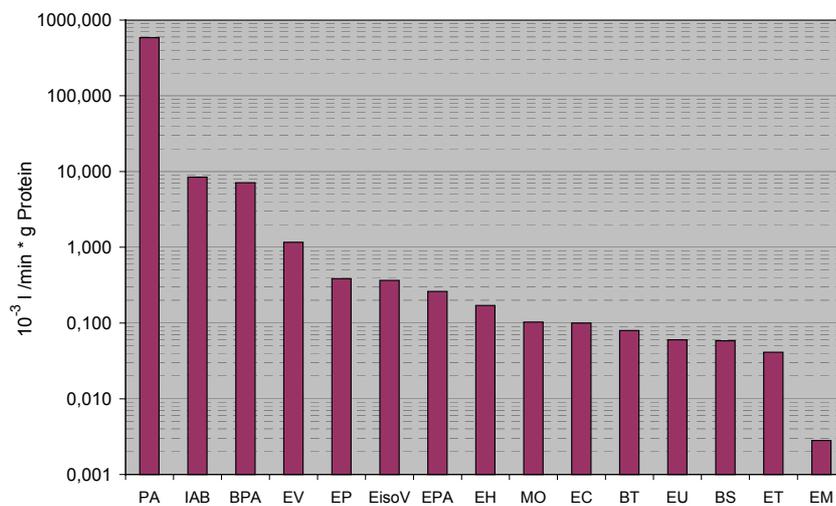


Abb. 80: V_{max}/K_m für die enzymatische Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma

Die zugehörigen Einzelwerte in Tab. 19 zeigen die sich in Bezug auf K_m überschneidenden Vertrauensintervalle. Die Affinität des Hydrolysesystems Humanplasma gegenüber den untersuchte Carbonsäureestern, einschließlich Phenylacetat, ist demnach ähnlich. Dennoch wurden enorme Unterschiede in der spezifischen Hydrolysierbarkeit, Halbwertszeit sowie V_{max} ermittelt. Die *Michaelis-Menten*-Konstante ist daher nur bedingt geeignet, die ermittelten Unterschiede der Hydrolysierbarkeit in Humanplasma zu beschreiben.

Tab. 19: Kinetische Parameter nach *Michaelis-Menten* von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma

Substanz	S_0 [mmol /L]	K_m [mol /L]	V_{max} [mol /min * g Protein]	V_{max} / K_m [min * g Protein /L]
Ethylpropionat	0,25 – 2,50	$8,79 \cdot 10^{-4} \pm 1,84 \cdot 10^{-4}$	$3,37 \cdot 10^{-7} \pm 0,34 \cdot 10^{-7}$	$3,84 \cdot 10^{-4}$
Ethylvalerat	0,25 – 2,50	$4,44 \cdot 10^{-4} \pm 1,33 \cdot 10^{-4}$	$5,19 \cdot 10^{-7} \pm 0,48 \cdot 10^{-7}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$
Ethylisovalerat	0,25 – 2,50	$2,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,71 \cdot 10^{-4}$	$7,32 \cdot 10^{-8} \pm 0,93 \cdot 10^{-8}$	$3,65 \cdot 10^{-4}$
Ethylheptanoat	0,25 – 2,50	$1,07 \cdot 10^{-3} \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$	$1,82 \cdot 10^{-7} \pm 0,11 \cdot 10^{-7}$	$1,71 \cdot 10^{-4}$
Ethylundecanoat	0,25 – 2,50	$5,20 \cdot 10^{-4} \pm 3,18 \cdot 10^{-4}$	$3,13 \cdot 10^{-8} \pm 1,11 \cdot 10^{-8}$	$6,01 \cdot 10^{-5}$
Ethylmyristat	0,25 – 2,50	$2,48 \cdot 10^{-3} \pm 0,83 \cdot 10^{-3}$	$6,98 \cdot 10^{-9} \pm 2,69 \cdot 10^{-9}$	$2,81 \cdot 10^{-6}$
Ethyltiglat	0,25 – 2,50	$7,84 \cdot 10^{-4} \pm 1,58 \cdot 10^{-4}$	$3,23 \cdot 10^{-8} \pm 0,30 \cdot 10^{-8}$	$4,12 \cdot 10^{-5}$
Ethylphenylacetat	0,25 – 2,50	$5,95 \cdot 10^{-3} \pm 0,83 \cdot 10^{-3}$	$1,55 \cdot 10^{-6} \pm 0,21 \cdot 10^{-6}$	$2,60 \cdot 10^{-4}$
Benzyltiglat)	0,25 – 2,50	$9,19 \cdot 10^{-3} \pm 3,54 \cdot 10^{-3}$	$6,64 \cdot 10^{-7} \pm 2,32 \cdot 10^{-7}$	$7,23 \cdot 10^{-5}$
Benzylphenylacetat	0,25 – 2,50	$1,00 \cdot 10^{-3} \pm 0,27 \cdot 10^{-3}$	$7,07 \cdot 10^{-6} \pm 0,59 \cdot 10^{-6}$	$7,09 \cdot 10^{-3}$
Benzylsalicylat	0,25 – 2,50	$2,17 \cdot 10^{-3} \pm 0,63 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-7} \pm 0,34 \cdot 10^{-7}$	$5,82 \cdot 10^{-5}$
Ethylcinnamat	0,25 – 2,50	$1,04 \cdot 10^{-4} \pm 0,45 \cdot 10^{-4}$	$1,04 \cdot 10^{-8} \pm 0,07 \cdot 10^{-8}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$
Methyloctanoat	0,25 – 2,50	$3,05 \cdot 10^{-3} \pm 0,54 \cdot 10^{-3}$	$3,13 \cdot 10^{-7} \pm 0,44 \cdot 10^{-7}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
Isoamylbutyrat	0,25 – 2,50	$8,28 \cdot 10^{-4} \pm 2,30 \cdot 10^{-4}$	$6,96 \cdot 10^{-6} \pm 0,84 \cdot 10^{-6}$	$8,40 \cdot 10^{-3}$
Phenylacetat	0,25 – 4,00	$2,83 \cdot 10^{-3} \pm 0,78 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3} \pm 0,35 \cdot 10^{-3}$	$5,86 \cdot 10^{-1}$

Um einen Überblick über die chemische Struktur und daraus resultierende hydrolytische Eigenschaften zu gewinnen, wurden die untersuchten Ester wurden in drei Kategorien eingeteilt. Die Einteilung erfolgt in Anlehnung an die von Longland et al. (1977) und Grundschober (1977) aus *in vitro* Experimenten postulierten Kategorien in Abhängigkeit von der Halbwertszeit. Zum Vergleich wurde die Halbwertszeit bei $S_0 = 0,25$ mM ausgewählt, da diese geringe Konzentration am ehesten der durch orale Aufnahme im Körper maximal erzielten Konzentration entspricht. Zusätzlich wurde der unabhängige Parameter V_{max}/K_m unter folgenden Konventionen berücksichtigt:

- schnelle Hydrolysierbarkeit: $t_{1/2} < 10$ min,
 $V_{max}/K_m > 1 \cdot 10^{-3}$ min · g Protein /L
- mäßige Hydrolysierbarkeit: $10 \text{ min} \leq t_{1/2} \leq 45$ min,
 $1 \cdot 10^{-3} \leq V_{max}/K_m \leq 2 \cdot 10^{-4}$ min · g Protein /L
- langsame Hydrolysierbarkeit: $t_{1/2} > 45$ min;
 $V_{max}/K_m < 2 \cdot 10^{-4}$ min · g Protein /L.

Die entsprechende Zusammenfassung zeigt Abb. 81:

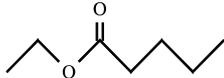
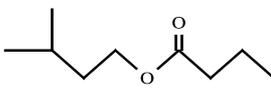
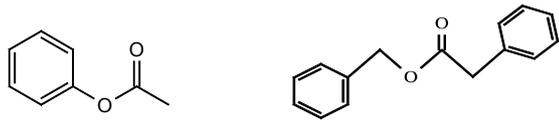
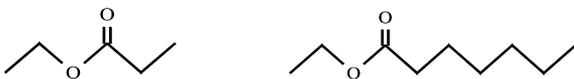
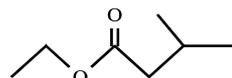
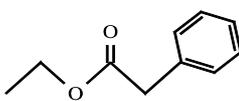
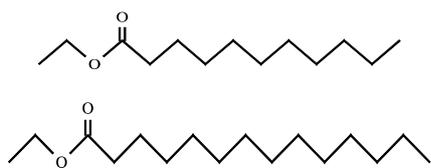
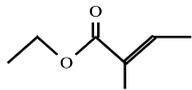
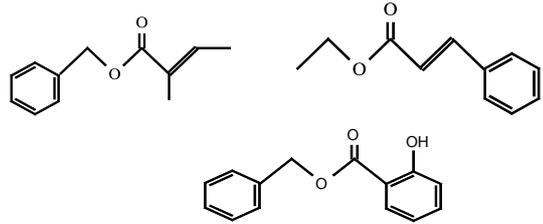
schnelle Hydrolysierbarkeit: $t_{1/2} < 10 \text{ min}$ und $V_{\max}/K_m > 1 \cdot 10^{-3} \text{ min} \cdot \text{g Protein} / \text{L}$	
Ethylvalerat	
Isoamylbutyrat	
Phenylacetat und Benzylphenylacetat	
mäßige Hydrolysierbarkeit: $10 \text{ min} \leq t_{1/2} \leq 45 \text{ min}$ / $1 \cdot 10^{-3} \leq V_{\max}/K_m \leq 2 \cdot 10^{-4} \text{ min} \cdot \text{g Protein} / \text{L}$	
Ethylpropionat und Ethylheptanoat	
Ethylisovalerat	
Ethylphenylacetat	
langsame Hydrolysierbarkeit: $t_{1/2} > 45 \text{ min}$ und $V_{\max}/K_m < 2 \cdot 10^{-4} \text{ min} \cdot \text{g Protein} / \text{L}$	
Ethylundecanoat und Ethylmyristat	
Ethyltiglat	
Benzyltiglat, Ethylcinnamat und Benzylsalicylat	

Abb. 81: Hydrolysierbarkeit der untersuchten Carbonsäureester anhand der Halbwertszeit in Humanplasma

Die Kategorie „schnell hydrolysierbar“ ist ohne die Festlegung der angegebenen Grenzen unspezifisch (Child et al., 1971, Ghittori et al., 1984). Die Studie von Longland et al. (1977) zeigt, dass die Esteraseaktivität in unterschiedlichen Geweben nicht zu einer konsistenten Einteilung führen kann. Ethylpelargonat wurde mit der Halbwertszeit 5,92 min in künstlicher Pankreasflüssigkeit als schnell hydrolysierbar eingestuft. Die korrespondierende Hydrolyseaktivität von 7,14 $\mu\text{M}/\text{min}$ ist dagegen nur gering. Die Interpretation der Ergebnisse kann demzufolge nur einer Gesamtheit erfolgen. Als Ursache für die von Longland et al. (1977) publizierten widersprüchlichen Ergebnisse werden verschiedene Substratanfangskonzentration im Hydrolyseansatzes angenommen.

Für Phenylacetat und Ethylphenylacetat konnte gezeigt werden, dass aromatische Ringe ohne Verzweigungen weder im Acyl- noch im Alkylrest einen hemmenden Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit ausüben. Phenylacetat und Ethylphenylacetat wurden in Humanplasma schnell hydrolysiert, denn neben den im Plasma befindlichen Carboxylesterasen (EC-Nr. 3.1.1.1) hydrolysieren zusätzlich Arylesterase (EC-Nr. 3.1.1.7) diese Ester.

Befinden sich *trans*-Doppelbindungen im Molekülverband, verlangsamt sich die Hydrolysegeschwindigkeit drastisch. Für Ethyltiglat (*trans*-2,3-Dimethylacrylsäureethylester) konnte gezeigt werden, dass sich die Halbwertszeit im Vergleich zu Substanzen ohne derartige Strukturelemente wie Ethylvalerat (3-Methylbutansäureethylester) mindestens verdoppelt.

Unverzweigte Acylketten mit mehr als sieben Kohlenstoffatomen sind Indikatoren für eine langsame Hydrolyse. Ab Ethylheptanoat wurde mit Ethylundecanoat und Ethylmyristat ein steter Abfall der spezifischen Hydrolyseaktivität gemessen. Ester mit stark hydrophoben Eigenschaften sind nur bedingt oder minimal im Wässrigen löslich (Tab. 10). Im Zusammenhang mit einer geringen Hydrolysierbarkeit in Verbindung ergibt sich eine längere Verweildauer im Körper. Diese kann aus der Eliminationhalbwertszeit abgeschätzt werden.

Es ist davon auszugehen, dass die Elimination einer Substanz nach 4 bis 5 Halbwertszeiten weitestgehend abgeschlossen ist (Forth & Henschler, 1992). Daraus resultiert insbesondere für die Ester Ethylheptanoat, -undecanoat und -myristat, Ethylsalicylat und -cinnamat sowie Ethyl- und Benzyltiglat eine längere Verweildauer im Körper, die mehrere Stunden betragen kann.

Fettsäureethylester mit langkettigen Acylresten zirkulieren im Blutkreislauf und sind dabei an Phospholipide (LDL), Triglyceride, Cholesterinester und in geringem Maße an Albumin gebunden (Doyle et al., 1994; Laposata et al., 1995; Szczepiorkowski et al., 1995; Teruya et al., 1995). Die Ester werden im Fettgewebe gespeichert und daraus sukzessive freigesetzt. Dabei wurden Halbwertszeiten von $16 \pm 1,6$ Stunden gemessen (Laposata et al., 1989).

Benzylsalicylat besitzt neben aromatischen Ringen im Acyl- und Alkylrest eine Hydroxygruppe in der Nähe der Carbonylgruppe. Die dadurch hervorgerufene Polarität der funktionellen Gruppe setzt die Hydrolysierbarkeit durch Lipasen deutlich herab. Dieser Einfluss wurde wiederum verstärkt in benachbarten Regionen der Carbonylfunktion beobachtet. Das zusätzliche Sauerstoffatom erhöht die Elektrophilie der Carbonylgruppe, die Polarität des Moleküls wird verstärkt, dadurch die Hydratation begünstigt und die Substratbindungswahrscheinlichkeit am hydrophoben reaktiven Zentrum herabgesetzt.

Carbonsäureester mit kurzen aliphatischen Ketten (Kohlenstoffketten mit weniger als sieben C-Atomen) mit und ohne Verzweigungen wurden schnell hydrolysiert. Das Optimum der spezifischen Hydrolyseaktivität lag bei der Acylkettenlänge von fünf Kohlenstoffatomen

(Ethylvalerat). In Humanplasma wurde Ethylvalerat neben der Referenzsubstanz Phenylacetat am schnellsten umgesetzt.

Der Einfluss von Verzweigungen im Molekül wird bestimmt durch deren Abstand zur Carbonylgruppe. Die Verzweigung im Alkylrest von Isoamylbutyrat ist weiter von der Carbonylgruppe entfernt als die Isovalerat-Funktion des langsamer hydrolysierten Ethylisovalerats. Darüber hinaus befindet sich die verzweigte Acylfunktion auf der carbonylfunktion-abgewandten Seite und hat damit einen geringeren Einfluss auf den Angriff des reaktiven Enzymzentrums.

6.4.5 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die esterasekatalysierte Hydrolyse in Humanplasma wird bei der Bildung des tetrahedralen Intermediats des Übergangszustandes von sterischen Effekten beeinflusst. Für die Strukturmerkmale der untersuchten Carbonsäureester lassen sich zusammenfassend allgemein gültige Einflussgrößen auf die Geschwindigkeit der Umsetzung in Humanplasma ableiten:

- *Kettenlänge:*

Die Verlängerung des Acylrestes um ein oder zwei Methylengruppen führte zu einem signifikanten Abfall der Hydrolysegeschwindigkeit. Dieser Trend setzte sich mit zunehmender Kettenlänge nicht fort. Ab einer Acylkettenlänge von mehr als sieben Kohlenstoffatomen wurde die enzymatische Umsatzrate primär von der steigenden Hydrophobizität und damit verringerten Substratverfügbarkeit am reaktiven Zentrum behindert. Eine maximale Hydrolysierbarkeit von Ethylestern wurde bei einer Acylkettenlänge von fünf Kohlenstoffatomen ermittelt.

Die Kettenlänge des Alkylrestes beeinflusst die Michaelis-Menten-Konstante.

Carbonsäureester mit kurzkettigen Alkylresten ($C_n < 6$) besaßen im Vergleich zu länger-kettigen einen höheren K_m -Wert. Eine Veränderung der Kettenlänge mit kurzkettigem Alkylrest bewirkte eine signifikante Änderung der Initialgeschwindigkeit, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des S_N2 -Mechanismus, Bildung und Zerfall des tetrahedralen Intermediats, besonders durch dessen Struktur beeinflusst wird.

Die Kettenlänge des Acylrestes beeinflusst die Maximalgeschwindigkeit.

Nach einem mit zunehmender Acylkettenlänge verzeichneten Anstieg wurden die Maximalwerte für V_{max} bei Acylkettenlängen von C_4 (Methylbutyrat, aus Arndt & Krisch 1973) und C_5 (Ethylvalerat) ermittelt. Die weitere Verlängerung der Acylkettenlänge ging mit einem Abfall von V_{max} einher.

- *Verzweigungen wie iso-, sec- oder tert-Funktionen:*

Die Verzweigungen bei kurzkettigen Acylresten (Anzahl der Kohlenstoffatome < 6) bewirkten keine signifikante Veränderung der Hydrophobizität. Sie wirkten sich besonders sterisch hemmend auf die Hydrolysierbarkeit aus, wenn diese sich in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms befanden.

Dieser Effekt wurde vornehmlich bei voluminösen Substituenten in α -Position beobachtet, die durch die Abschirmung des reaktiven Zentrums eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstante hervorrufen. Die intermolekulare Beweglichkeit der reagierenden funktionellen Gruppen ist herabgesetzt und führt zu Spannungen bei der Bildung des Übergangszustandes. Die Einführung von Verzweigungen in Estermoleküle wird als Indikator für eine erhöhte Toxizität beschrieben.

- *aromatische Ringe:*

Die Einführung eines aromatischen Rings in Estermoleküle mit kurzkettigen Substituenten ohne Verzweigungen im Molekül beeinträchtigte die Hydrolysierbarkeit nicht. Arylester wurden rasch durch im Plasma befindliche Arylesterase umgesetzt und daher im Vergleich zu Estern mit kurzen Acyl- und Alkylresten vergleichsweise schnell abgebaut. Dieser Effekt überzog deutlich die hervorgerufene Steigerung der Hydrophobizität durch aromatische Substituenten gegenüber kurzkettig verzweigten oder kurzkettig unverzweigten Substituenten.

- *aromatische Ringe mit polaren Gruppen wie 2-Hydroxy-Gruppen:*

Polare Gruppen setzten die Carbonylaktivität der funktionellen Gruppe herab. Die erhöhte Polarität der Carbonylgruppe begünstigte eine verstärkte Ausbildung einer Solvathülle, wodurch der Substratangriff allgemein erschwert wird. Auch dieser Einfluss war besonders stark ausgeprägt in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms. Weiterhin setzten Sauerstoffatome im Substratmolekül durch Erhöhung der Polarität des Substrates die Hydrolyseaktivität von Lipasen herab.

- *trans-Doppelbindungen:*

trans-2- oder *trans*-3-Doppelbindungen im Acylrest des Esters verringerten die Hydrolyserate des Substrats signifikant. Sie bewirkten eine voluminösere Ausdehnung des Molekülrests und verringerten dadurch die Bindungsbereitschaft bei der Bildung des Übergangszustandes. Zusätzlich wurde eine erhöhte Hydrophobizität hervorgerufen. Diese verringerte die im Wässrigen gelöste Substratkonzentration.

- *identische Summenformel und unterschiedliche chemische Struktur:*

Die untersuchten Ester unterschieden sich in ihrer Hydrophobizität nicht. Die unterschiedlichen polaren Eigenschaften von Acyl- und Alkylrest hoben sich gegenseitig auf. Die Verzweigung bei Isoamylbutyrat befand sich in C_3 -Position des Alkylrestes und damit an der carbonylfunktion-abgewandten Seite. Eine Verringerung der Hydrolysierbarkeit wurde daher nicht festgestellt. Der gleichzeitig kurzkettige und unverzweigte Acylrest (C_4) rief eine gegenüber den Vergleichssubstanzen (C_7 und C_8) erhöhte Abbaurate hervor.

6.4.6 Bewertung der Hydrolyseergebnisse

Zunächst ist nach der oralen Aufnahme der Ester in den Organismus im Magen mit einer langsamen Hydrolyse zu rechnen. Eine teilweise Resorption der unveränderten Ester im Magen-Darm-Trakt kann somit nicht ausgeschlossen werden. Nach dem Durchtritt der unhydrolysierten Ester durch die Magenschleimhaut gelangen diese ins Blut. Die aus Abb. 81 abgeleiteten Aussagen in Bezug auf Struktur und Hydrolyseeigenschaften ergeben ein uneinheitliches Bild. In jeder Gruppe befinden sich Substanzen mit und/oder ohne Verzweigungen, aromatischen Ringen sowie Doppelbindungen im Acyl- oder Alkylrest. Die unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften zeigen, dass grundsätzlich eine schnelle Hydrolyse von Carbonsäureestern in Blutplasma des Menschen *nicht* unterstellt werden kann. Mit der Möglichkeit einer langsamen Hydrolyse muss gerechnet werden, wenn Substanzen mit voluminösen Substituenten in der Nähe des sp^2 -hybridisierten Carbonylsauerstoffatoms (α -Position) auftreten. Dazu zählen insbesondere Acylkettenlängen > 4 Kohlenstoffatome, *iso*-, *sec*- oder *tert*-Funktionen, aromatische Ringe mit polaren Gruppen wie 2-Hydroxy-Gruppen und *trans*-Doppelbindungen.

Ratte und Mensch zeigen in der Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme qualitative und quantitative Unterschiede. Daraus resultieren verschiedene Konzentrationen am Zielorgan und Unterschiede in der Empfindlichkeit bei gleicher Dosis. So wurde eine schnelle Hydrolyse von Tiglatestern in Rattenplasma nachgewiesen. Dagegen erfolgte die Hydrolyse in Humanplasma langsam. Die Extrapolation von Ergebnissen von der Ratte auf den Menschen in Bezug auf Blutplasma ist insoweit möglich, als dass aufgrund der verschiedenen Enzymkonstitution bei der Ratte grundsätzlich mit einer schnelleren Hydrolyse von Carbonsäureestern zu rechnen ist. Die am schnellsten ablaufende Hydrolyse in Rattenleberhomogenat lässt den Schluss zu, dass auch beim Menschen unhydrolysierte Ester über die Blutbahn in die Leber gelangt und dort rasch abgebaut wird. Somit kann die toxikologische Bewertung der Substanzklasse *Carbonsäureester* auch anhand ihrer Hydrolyseprodukte vorgenommen werden. Voraussetzung dafür ist, dass die gebildeten Alkohole und Carbonsäuren toxikologisch unproblematisch sind.

Für die allgemeine Bewertung muss berücksichtigt werden, dass es sich um Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten handelt. Die verlässliche Extrapolation auf *in vivo* Bedingungen ist schwierig, da sich komplexe Einflussgrößen nur schwer quantitativ verallgemeinern lassen. Gallaher & Loomis (1975) zeigten mit Rattenvollblut eine um den Faktor 7 - 13 erhöhte Umsatzrate unter *in vivo* Bedingungen im Vergleich zum *in vitro* Experiment. Hungund et al. (1995) konnten eine um 25 % erhöhte *in vivo* - Hydrolysegeschwindigkeit von Ethyllineat in Rattenplasma nachweisen. Diverse Studien wiesen dagegen auf einen gegenteiligen Effekt hin, wonach Enzyme unter physiologischen Bedingungen nur mit einem Bruchteil ihrer Maximalgeschwindigkeit arbeiten (Gallaher, 1975: Faktor 10; Hungund, 1995: Faktor 2,7; Saghir et al., 1999: Faktor 3,8). Daher wurden für unsere Studie optimierte Bedingungen gewählt, die eine möglichst enge Annäherung an die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erlauben. Dennoch ist davon auszugehen, dass enzymkatalysierte Reaktionen unter vergleichbaren Bedingungen *in vivo* um ein Vielfaches schneller ablaufen.

6.5 Fehlerbetrachtung

Die Fehlerbetrachtung beinhaltet die Abschätzung der Fehler einzelner Messmethoden. Es erfolgt die quantitative Abschätzung der Einflussfaktoren auf die Messergebnisse der Hydrolyseexperimente.

- Natürliche Schwankung des biologischen Materials

Die Konstitution des biologischen Materials wird als Hauptursache für die Schwankung der pharmakokinetischen Parameter aus Anhang IV angesehen. Die relative Wiederholpräzision (4fach wiederholtes Durchführen eines Hydrolyseexperiments) betrug ca. 10 %.

- Temperatur

Enzymkatalysierte Reaktionen sind empfindlich gegenüber Temperaturänderungen. Im Temperaturbereich von 25 bis 37 °C wird bei einer Temperaturänderung um 1 K eine Aktivitätsänderung um bis zu 10 % erwartet. Der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit beträgt 10 % je Grad, das heißt: bei einer um 10°C erhöhten Reaktionstemperatur misst man die Aktivität um 100 % zu hoch (Arrhenius-Gleichung). Die Messunsicherheit des Thermostaten des verwendeten Schüttelwasserbades wurde mit $\pm 0,2$ °C angegeben.

- pH-Wert

Enzyme besitzen einen engen optimalen pH-Wert-Bereich (Drauz & Waldmann, 1995). Die Gerätetoleranz des pH-Meters betrug $\pm 0,05$ pH-Einheiten.

- Substratanfangskonzentration

Essentiell für eine reproduzierbare Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse ist die verlässliche Substratdotierung. Das Substrat wurde in 1,4-Dioxan gelöst und mittels Mikroliterspritze dotiert. Die Spritze besaß ein Gesamtvolumen von 10 μL und eine Skalierung von 0,1 μL . Der absolute Fehler wurde mit 0,05 μL geschätzt. Der daraus resultierende Fehler für S_0 beträgt bei der SubstratstammLösung mit höchster Konzentration (3,00 mol/L) maximal 0,15 μmol . Damit lässt sich bei einem Hydrolysevolumen von 3,00 ml eine maximale Schwankung für S_0 von $\pm 0,05$ mM ableiten.

- Reproduzierbarkeit der angewendeten Prüfmittel

Die Gerätetoleranzen betragen für:

Kolbenhubpipetten:	± 1 Vol% (relativer Fehler)
Analysenwaage:	$\pm 0,00001$ g
Laborwaage:	$\pm 0,1$ g

- Fehler erster Art

Der Fehler erster Art ist ein Ausdruck der Genauigkeit der ermittelten Hydrolyseparameter. Dazu wurden Standardabweichungen ermittelt und die Ergebnisse in Form eines Vertrauensintervalls für $n = 4$ angegeben. Die berechneten Vertrauensintervalle sind in der Zusammenstellung aller Messwerte in Anhang II und IV angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

- Fehler zweiter Art

Bei der Berechnung von *Michaelis-Menten*-Parametern aus der grafischen Darstellung nach *Lineweaver-Burk* besitzen nicht alle Messpunkte das gleiche Gewicht und können sich hinsichtlich ihrer Präzision unterscheiden. Diese Diskrepanz resultiert aus der Verzerrung der Messwertverteilung nach der reziproken Umformung. Insbesondere Initialgeschwindigkeiten, die bei geringer Substratkonzentration ($S_0 = 0,25 \text{ mM}$) ermittelt wurden, unterliegen diesem Einfluss. Weicht ein Messpunkt signifikant von der Regressionsgeraden ab, so wurde dieser, nach Festlegung entsprechender Ausschlusskriterien, bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

- Messunsicherheit der gaschromatographischen Analyse mit internem Standard

Der relative Fehler der Systempräzision (6fach Injizieren derselben Probe) betrug der relative Fehler bezogen auf die berechnete Konzentration maximal 0,5 %. Die Wiederfindungsraten der einzelnen Analyten wurden im Bereich 90,8 – 113,5 % berechnet (**Tab. 33**). Eine Ergebniskorrektur unter Berücksichtigung der Wiederfindung wurde daher nicht durchgeführt. Der relative Fehler der Analyse wurde mit 5 % abgeschätzt.

7 Ausblick

Die Ergebnisse unserer Hydrolyseuntersuchungen haben gezeigt, dass in Humanplasma ein sehr heterogenes Hydrolyseverhalten gegenüber Carbonsäureestern vorherrscht. Insgesamt ergaben sich uneinheitliche Ergebnisse in Bezug auf Struktur und Hydrolyseeigenschaften, da sich in jeder Hydrolyseklasse Moleküle mit Verzweigungen und /oder aromatischen Ringen im Molekül befanden. Zusätzlich wurde die Ableitung verallgemeinerbarer Aussagen durch individuelle und multiple Einflüsse der biologischen Medien erschwert, was insbesondere durch hohe Schwankungsbreiten der Messergebnisse zum Ausdruck kam.

Als Folge der zunehmenden Bedeutung von Hydrolysestudien für die toxikologische Bewertung ähnlicher Substanzklassen erscheint es daher sinnvoll, eine Ableitung von Aussagen mit Hilfe von mathematischen Modellen vorzunehmen. Eine Fragestellung wäre daher, inwieweit sich aus Substituentenkonstanten nach Hammett oder Taft Hydrolyseparameter aus reaktionskinetischer Sicht theoretisch, ohne den Einfluss einer analytischen Messunsicherheit, ableiten lassen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente können dabei als Grundlage für weitergehende mathematische Beschreibungen dienen.

Zukünftig sollte das Ziel verfolgt werden, aus der Molekülstruktur verschiedene mathematische Modelle für Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten. Mit einer solchen Herangehensweise könnte man ohne die Verwendung von biologischem Material auskommen; ein Ziel, welches aus ethischen Gesichtspunkten (Vermeidung von Tierversuchen) heraus verfolgt werden sollte. Hierdurch sollte es möglich sein, ohne den Verbrauch von biologischem Material, schnell zu Aussagen über die Hydrolysierbarkeit zu gelangen.

Bei oraler Aufnahme von Estern ist mit einer Resorption von unhydrolysiertem Ester aufgrund der langsamen Hydrolysierbarkeit vor allem im Magen zu rechnen. Aus toxikologischer Sicht ist die Untersuchung der Resorption von sehr langsam hydrolysierbaren Estern wie Ethyl- und Benzyltiglat, Ethylundecanoat und -myristat oder Ethylsalicylat und -cinnamat von besonderer Bedeutung. Hydrolyseuntersuchungen sollten mit Leberhomogenat vorgenommen werden, da die Leber den größten Beitrag zum Metabolismus leistet.

Eine Differenzierung der Affinität einzelner Hydrolasen ist in unserer Studie nicht erfolgt, da die spezifische Interpretation der Enzym-Substrat-Affinität das Isolieren und Aufreinigen der charakteristischen Hydrolasen voraussetzt.

Mensch und Ratte unterscheiden sich in ihrer Esterasekonstitution grundlegend. Daraus ergibt sich die Fragestellung, inwieweit sich Ergebnisse auf weitere Spezies oder Hydrolysemedien übertragen lassen. Die Erweiterung des Untersuchungsspektrums auf *in vivo* Studien erscheint grundsätzlich sinnvoll, da nur dadurch die Vorgänge des komplexen biologischen Stoffwechselsystems, insbesondere auch Eliminationsvorgänge erfasst werden. Auf diesem Wege könnte die Extrapolation von *in vitro* auf *in vivo* Ergebnisse modelliert werden. In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss des Acylrests auf die Hydrolysegeschwindigkeit in Bezug auf die Fettsäureethylester-Synthaseaktivität in Geweben und Blutplasma diskutiert werden.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

Der experimentelle Teil der Studie basiert auf Arbeits- und Prüfvorschriften, die im Rahmen der Akkreditierung des Laborbereiches nach DIN EN 17025 erstellt wurden.

8.2 Geräte

8.2.1 Tierhaltung

Für die *in vitro* Versuche wurde Blutplasma von männlichen Ratten vom Stamm Wistar/Hann verwendet, deren Aufzucht in der Zentralen Versuchstieranlage des BfR erfolgte. Die Einstellung am Ort der Plasmagewinnung begann 5 bis 10 Tage vor Versuchsbeginn. Die Tiere hatten zum Zeitpunkt der Einstellung ein Körpergewicht von 120 – 250 g. Die Ratten wurden in einem vollklimatisierten Tierstall, in Makrolonkäfigen des Typs III auf Weichholzgranulat (Altromin), bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 %, einer Raumtemperatur von 20-22°C sowie einem 12 Stunden hell – 12 Stunden dunkel Zyklus gehalten. Die Einstreu wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Als Futter diente pelletiertes Standardfutter (Standarddiät Ratten und Mäuse, Altromin). Leitungswasser stand ad libitum zur Verfügung. Durch tägliches Wiegen und „Handling“ der Ratten wurden die Tiere an die neue Umgebung gewöhnt. Angaben über Körpergewicht und Verhaltensauffälligkeiten wurden protokollarisch erfasst.

8.2.2 Narkose

Es wurde ein von Goll 1992 entwickeltes, offenes Inhalationssystem mit Tischabzug verwendet, bei dem die Expirationsluft vom narkotisierten Tier an die Raumluft abgegeben wird. Es besteht aus:

- der Druckgasflasche mit dem Trägergas Carbogen® GA 219,
- dem Flaschendruckminderer (Pluto® Drägerwerk Lübeck), dessen Durchflussreguliertventil den Carbogen-Fluss zum Narkosemittelverdampfer steuert,
- dem Narkosemittelverdampfer (Enfluran Vapor® 19.3, Drägerwerk AG Lübeck), der eine Anreicherung mit dem Narkosemittel Ethrane® im Trägergas von bis zu 5 Volumenprozent ermöglicht,
- einer Plexiglasröhre (Innendurchmesser 35 mm, Länge 53 mm), die durch einen Schlauch mit dem Verdampfer verbunden ist, wodurch das mit Ethrane® angereicherte Carbogen® zum Kopf des Versuchstieres strömt,
- einem Tischabzug, der über einen flexiblen Kunststoffschlauch mit dem Raumabzug verbunden werden kann, um den Narkosemitteleintrag in den Laborraum weitestgehend zu unterbinden.

8.2.3 Gaschromatographie

Es standen zwei GC-Anlagen mit folgenden Konfigurationen zur Verfügung:

- Gaschromatograph HP 5890A Series, Flammenionisationsdetektor, gesteuert mit der HP Chemstation Software Rev. A. 05.01
- Gaschromatograph HP 6890 Series, Flammenionisationsdetektor, gesteuert mit der HP Chemstation Software Rev. A. 05.01

Als Trennsäule wurden folgende Kapillarsäulen verwendet:

- MN permabond[®] SE-52-DF-0.25 (Macherey & Nagel, 25 m, ID 0,32 mm, Fth 0,25 µm – eine 50 m – Säule wurde geteilt; 5 % Diphenyl- 95 % Dimethylpolysiloxan), gekoppelt mit einer Vorsäule der Fa. Restek, (5 m, ID 0,32 mm) Intermediate Polarity, Deactivated, Cat.# 10044
- MN permabond[®] FFAP-0,25 (Macherey & Nagel, 30 m, ID 0,32 mm, Fth 0,25 µm), FFAP (Free Fatty Acid Phase) = Polyethoxylierte (Di)-Carbonsäuren (stark polar) (Polyethylenglycol-2-Nitroterephthalsäureester) Säurekomponenten: Fumarsäure, Bernsteinsäure, Terephthalsäure

8.2.4 Geräte zur Probenvorbereitung und Analyse

- Für die Zentrifugation wurde eine Heraeus Megafuge 1.0 (Vertrieb Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) mit max. 6000 U/min (max. RZB-Wert 6240g) verwendet.
- Das thermische Inaktivieren des Humanplasmas erfolgte im Wasserbad auf einem Heizmagnetrührer IKAMAG[®] Typ Ret mit fuzzy mit einem digital zwischen –10 und 400°C regulierbaren Stabthermometer IKATRON[®] Typ ETS-D4 (beides IKA[®] Heiztechnik, Staufen, Deutschland).
- Hydrolyseproben und Proben für die Proteinbestimmung wurden im Schüttelwasserbad GFL TYP 1092 (10 bis 250 Bewegungen/min; 2°C über Kühlwassertemperatur bis 80°C) der Firma Gesellschaft für Labortechnik mbH (Großburgwedel, Deutschland) temperiert.
- Zur Messung des pH-Wertes (pH 0 bis 14) wurde das Knick Mikroprozessor-pH-Meter 742 mit pH/Pt Einstabmesskette Typ SE 101 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt.
- Als Reaktionsgefäße dienten verschraubbare Glasvials aus Borosilikat der Marke Pico Glass Vial[™] - 7 ml (Vertrieb Canberra Packard GmbH, Dreieich, Deutschland).

8.2.5 Spektralphotometrie

Für spektralphotometrische Messungen wurde ein UV/VIS Spektrometer Lambda 2, gesteuert vom Messprogramm PE Lambda 2 Version 3.7, Messbereich 190 bis 1100 nm (Perkin Elmer Instruments GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) sowie Einmalküvetten Plastibrand[®] PMMA 2,5 ml makro (Brand, Cat. No. 759105) verwendet.

8.2.6 Probenarchivierung

Blutplasma wurde bei -84°C im Tiefkühlschrank Typ IVF 8513 V12 der Firma Revco gelagert (vgl. Abschnitt 8.4.1 und 8.4.2). Die Archivierung der Proben erfolgte bei -21°C im Tiefkühlschrank des Typs GSN 3336 Premium no frost der Firma Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland).

8.3 Chemikalien und Materialien

Tab. 20: Chemikalien

Substanz	CAS-Nummer	Spezifikation	Vertrieb
Benzylalkohol	100-51-6	99,5+ %,	Merck
Benzylphenylacetat	102-16-9	98+ %,	Sigma Aldrich
Benzylsalicylat	118-58-1	98+ %,	Sigma Aldrich
Benzyltiglat	37526-88-8	98+ %,	Sigma Aldrich
Buttersäure	107-92-6	> 99 %	Merck
Decansäure	334-48-5	> 98 %	Merck
1,4-Dioxan	123-91-1	mind. 99,8 %	Merck
n-Dodecan	203-967-9	> 99 %	Sigma Aldrich
Essigsäure	64-19-7	100 %	Merck
Ethylacetat	141-78-6	> 99,8 %	Merck
Ethylcinnamat	103-36-6	> 98 %,	Merck
Ethylheptanoat	106-30-9	98+ %,	Sigma Aldrich
Ethylisovalerat	108-64-5	> 98 %,	Merck
Ethylmyristat	124-06-1	> 98 %,	Merck
Ethylphenylacetat	101-97-3	> 98 %,	Merck
Ethylpropionat	105-37-3	99 %	Sigma Aldrich
Ethylsalicylat	118-61-6	> 98 %,	Sigma Aldrich
Ethyltiglat	5837-78-5	98+ %,	Sigma Aldrich
Ethylundecanoat	627-90-7	97+ %	Sigma Aldrich
Ethylvalerat	539-82-2	> 98 %	Merck
Heparin Ammonium Salz	60800-63-7	25000 U	Sigma Aldrich
Heptansäure (Önanthsäure)	111-14-8	> 99 %	Merck
n-Hexadecan	544-76-3	> 99 %	Sigma Aldrich
n-Hexan	110-54-3	p.A.	Merck
Hexansäure (Capronsäure)	142-62-1	> 98 %	Merck
Isoamylbutyrat	106-27-4	> 98 %	Merck
Isovaleriansäure (3-Methylbutansäure)	503-74-2	> 99 %	Merck
Kaliumchlorid	7447-40-7	p. A.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	p. A.	Merck
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	6381-59-5	p. A.	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	7778-80-5	p. A.	Merck
Laurinsäure	143-07-7	> 99 %	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	7487-88-9	> 98 %	Merck
4-Methylanisol	104-93-8	> 99 %	Merck
Methyloctanoat	111-11-5	mind. 99,5 %	Merck
Natriumcarbonat, wasserfrei	497-19-8	p.A.	Merck
Natriumchlorid	7647-14-5	p.A.	Merck
Natrium <i>d</i> ihydrogenphosphat * 2 H ₂ O	13472-35-0	p.A.	Merck
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	mind. 99,5 %	Merck
<i>d</i> -Natriumhydrogenphosphat * 2 H ₂ O	10028-24-7	p.A.	Merck
Natriumsulfat	7757-82-6	p.A.	Merck
Octansäure (Caprylsäure)	124-07-2	> 99 %	Merck
Pepsin (EC 3.4.23.1)	9001-75-6	1:10.000	Sigma Aldrich

Fortsetzung Tab. 20

Substanz	CAS-Nummer	Spezifikation	Vertrieb
Phenylacetat	122-79-2	> 98 %	Merck
3-Phenylacrylsäure (Zimtsäure)	621-82-9	> 99 %	Merck
Phenyllessigsäure	103-82-2	> 99 %	Sigma
Propionsäure	79-09-4	> 99 %	Merck
Rinderserumalbumin (Albumin bovine, RSA)	9048-46-8	Kristallin, Mr ca. 67000	Serva
Salicylsäure	69-72-7	> 99 %	Merck
Salzsäure, 65%	7697-37-2	> 65 %	Merck
Tiglinsäure (trans-2,3-Dimethylacrylsäure)	80-59-1	> 98 %	Sigma Aldrich
Undecansäure	112-37-8	> 98 %	Merck
Valeriansäure (Pentansäure)	109-52-4	> 99 %	Merck

Tab. 21: Lösungen

Bezeichnung	Herstellung
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Vertrieb: Merck-Darmstadt, Art-Nr. 109001
Heparinammoniumsalz-Lösung	25000 Units Heparinammoniumsalz / 10 ml Wasser ⁵ (2500 U /ml): Die Lösung wurde unmittelbar vor der Plasmagewinnung angesetzt, Lagerung bei Raumtemperatur maximal 3 Stunden.
Kaliumnatriumtartratlösung	2,7 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrathylhydrat /100 ml Wasser ⁵
Krebs-Henseleit-Puffer; pH-Wert 7,40 ± 0,02	Einwaage je Liter Wasser ⁵ : Natriumchlorid (6,896 g), Kaliumchlorid (0,354 g), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (0,296 g), Kaliumdihydrogenphosphat (0,163 g), Natriumhydrogencarbonat (2,100 g), Lagerung bei 4°C maximal 2 Monate.
Kupfersulfatlösung	1,0 g Kupfersulfat-Pentahydrat /100 ml Wasser ⁵
Künstliche Magenflüssigkeit ⁶	320 mg Pepsin 1:10.000 (EC 3.4.23.1) bzw. $148,2 \cdot 10^{-3}$ U /100 ml 0,07N Salzsäurelösung (pH 1,50 ± 0,01; 4°C); Pepsinaktivität: 1482 U /ml
Natriumcarbonatlösung	2 % Natriumcarbonat, wasserfrei wurden in 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung gelöst.
Natriumphosphatpuffer, 0,1 M; pH 7,4	Lösung 1: 8,8995 g di-Natriumhydrogenphosphat * 2 H ₂ O; Lösung 2 : 7,8005 g Natriumdihydrogenphosphat * 2 H ₂ O in jeweils 500 ml Wasser ⁵ gelöst. 500 ml Lösung 1 wurden vorgelegt und mit Lösung 2 auf pH 7,40 ± 0,02 eingestellt.
Phenolphthalein-Lösung	0,1%ige Lösung, Sigma-Aldrich Steinheim, Nr. 105-1
Physiologische Kochsalzlösung	0,9%ige Natriumchloridlösung
Reagenz A-Lösung	1 ml Kaliumnatriumtartrat-Lösung sowie 1 ml Kupfersulfat-Lösung wurden mit Natriumcarbonatlösung auf 100 ml aufgefüllt.
Salzsäure-Lösung, 0,07 N	In einem 1 Liter Maßkolben wurden ca. 500 ml destilliertes Wasser vorgelegt, mit 5,60 ml konzentrierter Salzsäure versetzt, aufgefüllt und auf pH 1,20 ± 0,01 eingestellt.
Salzsäure-Lösung, 1 N	Titrisol® - Ampulle, Vertrieb: Merck-Darmstadt, Art-Nr. 109970

⁵ Wasser bideionisiert und membranfiltriert

⁶ Bergmeyer, 1970; Castle, 1993; Cooper, 1995; Deutsche Norm DIN EN 71.3, 1994; Documenta Geigy, 1975; European Commission, 2002; Longland, 1977; Pschyrembel, 2000; Schäfer & Marquard, 2004

Tab. 22: Verbrauchsmaterial

Produkt	Spezifikation / Vertrieb
Auslaufkanülen	Einmalkanülen, Luer-Konus 0,65 /32, Henke Sass Wolf GmbH
Carbogen® GA 219	95 % O ₂ ; 5 % CO ₂ , Linde AG, Höllriegelskreuth
Ethrane®	Abbott GmbH, Wiesbaden, Wirkstoff Enfluran [2(Chlor)-1,1,2-trifluorethyl-difluormethylether-Lösung]
Extrelut® Füllmaterial, 1 kg	Merck, Darmstadt; Artikelnummer 15 093
Extrelut® NT 3, Glas-Fertigsäulen	Merck, Darmstadt; Artikelnummer 15 095
Rattenleberhomogenat (S9-Präparation)	RCC - Cytotest Cell Research GmbH, Roßdorf, Deutschland
Rundfilter	Schleicher & Schuell, D-37582 Dassel 589/1, black ribbon, aschefrei, Ø 15 mm; Ref.No. 10300030
Vacutainer Zentrifugenröhrchen Natriumheparinat, 7 ml	Brand Meylan • sterile Gefäße, B.P.37 Frankreich

8.4 Prüfvorschriften

8.4.1 Gewinnung von Rattenplasma

Für einen Plasmapool wurden 3 – 23 männliche Tiere verwendet. Die Blutentnahme wurde von einer Medizinisch Technischen Assistentin des BfR ausgeführt. Die Tiere wurden einzeln mit Ethrane® in der unter Abschnitt 8.2.2 beschriebenen Apparatur (2 min 5 Vol%, danach 2 min 2,5 Vol% Ethrane® im Trägergas Carbogen®) narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Herzkammer. Als Antikoagulans wurde eine Heparinammoniumsalzlösung (2500 U/ml dest. Wasser) verwendet. In Abhängigkeit vom Körpergewicht der Tiere wurden je Punktion bis zu 4 ml Blut (< 350 g) bzw. bis zu 6 ml (> 350g) entnommen. Um die Soll-Antikoagulanskonzentration im Blut von 75 U/ml (Peter, 1977) einzustellen, wurden in der Spritze 30 µl Heparinammoniumsalzlösung/ ml Blut vorgelegt. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, ca. 10 min im Kühlschrank (4 °C) gelagert und im Anschluss 10 min mit 2000 U/min (693g) bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde als Überstand abpipettiert, danach zu einem Pool vereinigt und portioniert à 6 ml bei -85°C gelagert (vgl. Abschnitt 8.2.6).

8.4.2 Gewinnung von Humanplasma

- Probanden

Für die Blutspenden stellten sich auf freiwilliger Basis jeweils 10 bis 16 männliche Mitarbeiter des BfR zur Verfügung. Die Blutentnahme erfolgte durch Mitarbeiter des Betriebsärztlichen Dienstes des BfR Standort Dahlem.

- Blutentnahme

Die allgemein üblichen Regeln zur Blutentnahme aus Rick (1977) wurden beachtet. Danach erfolgte die Blutentnahme morgens am nüchternen, liegenden Patienten. Jedem Probanden wurden ca. 70 ml Blut aus der Ellenbogenvene entnommen. Das venöse Blut wurde in einem

10-ml-Natriumheparinat-immobilisiertem Vacutainer®-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Röhrchen wurden in Eiswasser und bei ca. 4°C im Kühlschrank rasch abgekühlt und unter diesen Bedingungen ca. 10 min gelagert.

- Aufarbeitung

Zur Aufarbeitung erfolgte der rasche Transport unter Eiskühlung in die Laborräume. Dort wurde das Blut 10 min mit 2000 U /min (693 g) bei 4°C zentrifugiert. Das Plasma wurde als Überstand abpipettiert, danach zu einem Pool vereinigt, portioniert à 6 ml und tiefgekühlt bei –85°C gelagert.

8.4.3 Zum Umgang mit Blutplasma

- Mindesthaltbarkeit

Die Aufbewahrungszeit von Plasma wird durch die Lagerbedingungen bestimmt. Sie umfasst einen Zeitraum, in dem keine wesentlichen Veränderungen in der Plasmazusammensetzung zu erwarten sind und somit die Aktivität von Enzymen als weitestgehend konstant angesehen werden kann. Folgende Bedingungen wurden determiniert (Englhardt, 1974):

- Lagerung bei $4 \pm 2^\circ\text{C}$: maximal 24 Stunden
- Lagerung bei $-21 \pm 2^\circ\text{C}$: maximal 6 Monate
- Lagerung bei $-80 \pm 2^\circ\text{C}$: maximal 12 Monate.

Größere Temperaturschwankungen, die an Kühlgeräten kurzzeitig (< 2 Stunden) auftraten, beeinflussten die Hydrolyseaktivität von Plasma in einem nicht messbaren Ausmaß und wurden daher vernachlässigt. Grundsätzlich wurde vor Versuchsbeginn anhand eines Standards (Ester mit schneller Hydrolysierbarkeit, hier Phenylacetat) die Hydrolyseaktivität überprüft. Plasma, das die oben genannte Lagerdauer überschritten hat, wurde nicht mehr zur Bestimmung von Enzymaktivitäten eingesetzt.

- Auftauen

Um das Problem von Denaturierungseffekten zu minimieren, die mit dem Aussalzen von Proteinen einhergehen, erfolgte das Auftauen entsprechend den Empfehlungen der Biochrom AG (Biochrom, 2001). Zuerst wurde die entsprechende Plasma-Menge für ca. 10 min bei Raumtemperatur vorgewärmt, bis sich ein Flüssigkeitsfilm zwischen Gefäß und Eis gebildet hatte. Danach wurde das Gefäß in einem Schüttelwasserbad bei 37°C 1 min lang inkubiert. Anschließend wurde das Gefäß per Hand durch langsames Drehen bewegt. Eine mechanische Beanspruchung des Blutplasmas durch Schütteln wurde vermieden, um Denaturierungseffekte zu vermeiden. Diese werden durch Schaumbildung angezeigt. Das Plasma wurde unverzüglich nach dem Schmelzen der letzten Eiskristalle im Kühlschrank bei ca. 4°C oder am Arbeitsplatz im Eiswasserbad aufbewahrt.

- Verdünnen

Blutplasma wurde mit Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) verdünnt.

- Hitzeinaktivierung

Basierend auf einer von Lindl 1994 publizierten Methode wurde auf dem Heizmagnetrührer in einem Becherglas deionisiertes Wasser auf $56 \pm 2^\circ\text{C}$ erhitzt. Die Konstanz der Temperatur wurde durch ein Stabthermometer geregelt. Nach Erreichen der Soll-Temperatur wurde das mit ca. 6 ml Plasma gefüllte Gefäß über einen Zeitraum von $40 \text{ min} \pm 2 \text{ min}$ inkubiert.

- Kontrolle der Vollständigkeit der Inaktivierung

Mit dem hitzeinaktivierten Blutplasma wurden drei Hydrolyseexperimente analog Abschnitt 8.4.4 durchgeführt. Die mittlere spezifische Enzymaktivität wurde mit dem Wert für nicht inaktiviertes Plasma verglichen (Vertrauensbereiche dürfen sich nicht tangieren).

8.4.4 Allgemeine Durchführung eines Hydrolyseexperimentes

- Vorversuch

Vor der Durchführung des Hauptversuchs wurden folgende Parameter ermittelt:

- Zeitpunkte der Probenahmen (schnellstmöglich, da bei langer Inkubation des Plasmas bei 37°C Denaturierungseffekte auftreten)
- Wiederfindungsrate des Analyten (Tab. 33) sowie
- Proteingehalt des biologischen Materials (Abschnitt Tab. 11 und Tab. 12), wird bei der Ergebnisangabe von spezifischen Aktivitätsparametern berücksichtigt.

- Hauptversuch

Das Reaktionsgefäß war zu ca. 90 Vol% mit Hydrolysenlösung gefüllt, um Verdunstungseffekte bei leichtflüchtigen Estern zu vermeiden. Folgende Volumina an Hydrolysenlösung wurden als geeignete Volumina als Vorlage für Hydrolysenexperimente ermittelt:

Bei Hydrolysen mit:

- unverdünntem Humanplasma,
- hitzeinaktiviertem Humanplasma oder
- unverdünntem Rattenplasma wurden $3000 \mu\text{l}$ und bei Experimenten mit
- Krebs-Henseleit-Puffer,
- künstlicher Magenflüssigkeit,
- verdünntem Human- und Rattenplasma oder
- verdünntem Rattenleberhomogenat wurden $6000 \mu\text{l}$ Hydrolysenlösung im Reaktionsgefäß vorgelegt.

Im Schüttelwasserbad wurde die Hydrolysenlösung auf $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ bei ca. 120 U/min temperiert. Nach $5,0 \pm 0,2 \text{ min}$ wurde die Substratlösung in die Hydrolysenlösung mittels Mikroliterspritze injiziert (Reaktionsstart = t_0). In Tab. 23 werden mögliche Parameter für einen Hydrolysenansatz vorgeschlagen.

Tab. 23: Substratzusatz für den Hydrolyseansatz

Volumen der Hydrolysenlösung	Substratanfangskonzentration der Hydrolysenlösung S_0 [mmol /L]									
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,75	2,00	2,50	3,00	4,00
	Zu injizierendes Volumen der Substratstammlösung in die Hydrolysenlösung [μ l]									
3000 μ l	2,0 _a	4,0 _a	3,0 _b	4,0 _b	5,0 _b	3,5 _c	-	5,0 _c	-	-
6000 μ l	4,0 _a	4,0 _b	6,0 _b	8,0 _b	5,0 _c	7,0 _c	8,0 _c	5,0 _d	6,0 _d	8,0 _d

Konzentration der Substratstammlösung gelöst in 1,4-Dioxan: c_a : 0,375 mol /L; c_b : 0,75 mol /L; c_c : 1,50 mol /L; c_d : 3,00 mol /L

Nach der Substratzugabe (Reaktionsstart t_0) wurde das Reaktionsgefäß ca. 10 Sekunden leicht per Hand hin und her geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Substrats im Hydrolysemedium zu gewährleisten. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in das Schüttelwasserbad zurückgegeben und nur kurz zur Probeentnahme (t_1 bis t_5) entnommen.

8.4.5 Probenahme

Die Probenahme erfolgte nach definierten Zeitabständen. Die Zeitpunkte der Probenahme richteten sich grundsätzlich nach der Hydrolysegeschwindigkeit des Esters, da die Konzentration der Hydrolyseprodukte zum Zeitpunkt t_1 über der Bestimmungsgrenze des Analyten liegen musste. Die gesamte Reaktionszeit sollte so kurz wie möglich sein, da langes Inkubieren von Plasma bei 37°C zu Denaturierungseffekten führt. In Tab. 24 werden geeignete Entnahmezeitpunkte aufgeführt:

Tab. 24: Zeitpunkte der Probenahme nach Reaktionsstart

Zeitpunkt der Probenahme t_i	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5
Schnell hydrolysierte Ester ($t_{1/2} < 5$ min)	0,5	1	2	3	4
5 min $< t_{1/2} < 20$ min	2	4	6	8	10
	3	6	9	12	15
	4	8	12	16	20
Langsam hydrolysierte Ester ($t_{1/2} > 20$ min)	5	10	15	20	25
	10	20	30	40	50
	20	40	60	80	100

8.4.6 Probenaufarbeitung zur Analyse von Carbonsäureestern

Die Extraktion von Carbonsäureestern aus biologischem Material erfolgte durch Festphasenextraktion an Extrelut® (Merck, 2002). Zum Zeitpunkt t_i wurden 1000 μ l der Hydrolysenlösung entnommen und mit 1000 μ l Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) verdünnt. 1000 μ l der verdünnten Probe wurden danach auf eine mit 1,2g Extrelut® gefüllte Glassäule mit Auslaufkanüle gegeben. Nach ca. 4 min wurden 1000 μ l interner Standard hinzu gegeben und danach der Ester sowie der interne Standard mit 3-mal ca. 1000 μ l n-Hexan bis zu einem Probenvolumen von ca. 3000 μ l eluiert. Die Proben wurden gaschromatographisch analysiert.

8.4.7 Probenaufarbeitung zur Analyse von Esterhydrolyseprodukten

Die Extraktion von Esterhydrolyseprodukten aus biologischem Material erfolgte durch Festphasenextraktion an Extrelut® (Merck, 2002). Zum Zeitpunkt t_i wurden 500 μ l der

Hydrolysenlösung entnommen und mit 1000 µl 1 N HCl verdünnt und damit auf einen pH-Wert von ca. 1,2 eingestellt. 1000 µl der verdünnten Probe wurden auf eine mit 1,2 g Extrelut® gefüllte Glassäule mit Auslaufkanüle gegeben. Nach 4 min wurden 1000 µl interner Standard hinzu gegeben und Carbonsäure, Alkohol sowie der interne Standard mit 3-mal ca. 1000 µl Ethylacetat bis zu einem Probenvolumen von ca. 3000 µl eluiert. Die Proben wurden gaschromatographisch analysiert.

8.4.8 Gaschromatographische Analyse

Allgemeine GC-Parameter

- Trägergas: Helium 4.6, GA 330, Linde AG, Höllriegelkreuth
- Brenngase: Wasserstoff 5.0, GA 320, Linde AG, Höllriegelkreuth
- Make up Gas: Stickstoff 5.0, GA 221, Linde AG, Höllriegelkreuth
- Splitverhältnis: 1:10
- Injektionsvolumen: 1,0 µl
- Injektor/Detektortemperaturen: MN SE-52 (vgl. 8.2.3): 280°C/300°C
MN FFAP (vgl. 8.2.3): 220°C/220°C

Die Trägergasgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Es wurde im Pulsed Press Modus (Säulenvordruck 1 min 180 kPa) gearbeitet.

Tab. 25: Temperaturprogramm für Carbonsäureester

Substanz	GC-Säule	Interner Standard	Ofentemperaturprogramm
Benzylphenylacetat	MN SE-52	n-Hexadecan	110→200°C (8°C/min) 200→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Benzylsalicylat			
Benzyltiglat			
Ethylpropionat	MN FFAP	4-Methylanisol	28°C, 3 min isotherm, 28→200°C (70°C/min), 2 min isotherm
Ethylcinnamat	MN SE-52	n-Hexadecan	110°C, 1 min isotherm, 110→140°C (5°C/min) 140→290°C (70°C/min) 2 min isotherm
Ethylheptanoat	MN SE-52	n-Dodecan	60°C, 3 min isotherm, 60→105°C (10°C/min) 105→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Ethylisovalerat	MN FFAP	4-Methylanisol	35→50°C (2°C/min) 50→210 (120°C/min) 2 min isotherm
Ethylmyristat	MN SE-52	n-Hexadecan	60°C, 3 min isotherm, 60→210°C (10°C/min) 210→290 (120°C/min), 2 min isotherm
Ethylphenylacetat	MN SE-52	n-Hexadecan	85°C, 1 min isotherm, 85→105°C (3°C/min) 105→290°C (70°C/min) 2 min isotherm
Ethyltiglat	MN FFAP	4-Methylanisol	60→110°C (10°C/min) 110→210 (120°C/min) 2 min isotherm
Ethylundecanoat	MN SE-52	n-Hexadecan	105→150°C (10°C/min) 150→170°C (40°C/min) 170→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Ethylvalerat	MN FFAP	4-Methylanisol	50→70°C (4°C/min) 70→210°C (120°C/min) 2 min isotherm
Isoamylbutyrat	MN SE-52	n-Undecan	65°C, 5 min isotherm, 65→72°C (50°C/min) 72→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Methyloctanoat	MN SE-52	n-Undecan	70°C, 2 min isotherm, 70→105°C (10°C/min) 105→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Phenylacetat	MN SE-52	n-Decan	50°C, 2 min isotherm, 50→85°C (10°C/min) 85→290°C (120°C/min) 2 min isotherm

Tab. 26: Temperaturprogramm für Esterhydrolyseprodukte

Substanz	GC-Säule	Interner Standard	Ofentemperaturprogramm
Benzylalkohol	MN FFAP	Valeriansäure	135→180°C (10°C/min) 180→210°C (120°C/min) 5 min isotherm
Buttersäure	MN FFAP	Valeriansäure	80→103°C (10°C/min) 103→200°C (50°C/min) 5 min isotherm
Heptansäure	MN FFAP	Valeriansäure	130→178°C (10°C/min) 178→200°C (120°C/min) 3 min isotherm, 200→210°C (120°C/min) 1 min isotherm
Isovaleriansäure	MN FFAP	Hexansäure	120→170°C (10°C/min) 170→210°C (20°C/min) 2 min isotherm
Myristinsäure	MN SE-52	Laurinsäure	105→160°C (10°C/min) 160→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Octansäure	MN SE-52	Heptansäure	155→220°C (10°C/min) 2 min isotherm
Phenyllessigsäure	MN SE-52	Decansäure	80°C, 1 min isotherm, 80→125°C (10°C/min) 125→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Propionsäure	MN FFAP	Buttersäure	130→168°C (10°C/min) 168→210°C (120°C/min) 2 min isotherm
Tiglinsäure	MN FFAP	Valeriansäure	135→180°C (10°C/min) 180→210°C (120°C/min) 5 min isotherm
Undecansäure	MN SE-52	Decansäure	80→125°C (10°C/min) 1 min isotherm, 125→290°C (120°C/min) 2 min isotherm
Valeriansäure	MN FFAP	Hexansäure	130→180°C (10°C/min) 180→210°C (20°C/min) 2 min isotherm
Zimtsäure	MN SE-52	Decansäure	85→131°C (10°C/min) 131→290°C (120°C/min) 2 min isotherm

8.4.9 Validierung

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als Nachweisgrenze wurde das Dreifache des Grundrauschens von Negativproben ermittelt. Bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 (Peakhöhe Analyt: Höhe des Grundrauschens) galt der Analyt als nachgewiesen. Für die Bestimmungsgrenze musste das Signal-Rausch-Verhältnis 9:1 betragen. Die Kontrolle der Kalibrierung erfolgte arbeitstäglich durch Injizieren einer Probe mit Analytkonzentration.

Für eine sichere Quantifizierung wurde eine Abweichung bis 10 % toleriert, im Bereich der Nachweisgrenze bis zu 30%. Die Messergebnisse wurden durch Vierfachbestimmung (Mindestwert) abgesichert und unter Angabe des Vertrauensintervalls (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt (vereinfachtes Verfahren nach DIN 32645).

Arbeitsbereich und Linearität

Der Nachweis der Linearität sowie die Festlegung des Arbeitsbereiches erfolgte nach DIN 38402, Teil 51. Der lineare Bereich kennzeichnet den Konzentrationsbereich, in dem zwischen Konzentration des Analyten und Signal ein linearer Zusammenhang besteht. Durch eine Kalibrierung über Standardlösungen wird der lineare Bereich ermittelt.

Als Parameter der Korrelation dient der Korrelationskoeffizient der linearen Regressionsgeraden von mindestens 7 Messpunkten. Innerhalb des linearen Bereiches darf der Korrelationskoeffizient einen Wert von 0.990 nicht unterschreiten. Abweichungen von der Linearität sind gekennzeichnet durch eine hyperbelförmige Abweichung der Trendlinie von der Linearität.

Kalibrierung mit internem Standard

Die Identifizierung von Analyt und internem Standard erfolgte anhand der Retentionszeiten. Für die Kalibrierung wurden mindestens 7 Messpunkte, die innerhalb des Arbeitsbereiches lagen, herangezogen. Aus den Verhältnissen von Konzentration (Amount Ratio) und Peakfläche

(Response Ratio) von Analyt zu internem Standard rechnergestützt (Chemstation Integrator) für jeden Analyten Responsefaktoren berechnet. Die Konzentration des Analyten in der Probe wurde aus dem Responsefaktor des Analyten, der Konzentration des internen Standards sowie der Response Ratio der Probe berechnet. Die Kalibrierlösungen wurden durch unabhängige Verdünnungsschritte aus einer Stammlösung hergestellt. Innerhalb des Arbeitsbereiches durfte der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden einen Wert von 0.990 nicht unterschreiten. Die Konzentration des internen Standards lag ungefähr in der Mitte des Arbeitsbereiches sowie in der Nähe der zu erwartenden Konzentration des Analyten.

Die Kontrolle der Kalibrierung erfolgte alternierend. Arbeitstäglich wurden vor und nach der GC-Analyse zwei Kalibrierstandards, deren Konzentration in der Nähe des zu erwartenden Konzentrationsbereichs der Probe liegen sollten, analysiert. Grundsätzlich wurden maximal $\pm 10\%$ Abweichung von der Soll-Konzentration toleriert. Sofern der untere Arbeitsbereich in der Nähe der Nachweisgrenze liegen muss, wurden bis zu $\pm 40\%$ Abweichung toleriert.

Matrixeinflüsse und Wiederfindung

Extraktionsausbeuten wurden ermittelt, indem die Konzentration eines direkt injizierten Analyten verglichen wurde mit der Konzentration, die nach Dotierung einer Probematrix (thermisch inaktiviertes Plasma) sowie einem matrixfreien Medium (Krebs-Henseleit-Puffer), anschließender Probenaufarbeitung und Analyse erhalten wurde (Nulltoleranzen).

Als Nulltoleranz/Blindwert wurde die Konzentration an Esterhydrolyseprodukt (Säure- und/oder Alkoholkomponente) angesehen, die als Verunreinigung bereits in der verwendeten Rohchemikalie vorlag. Dazu wurde eine hohe Substratanfangskonzentration ($S_0 = 0,25\text{ mM}$) in einem matrixfreien Hydrolysemedium (Krebs-Henseleit-Puffer) eingestellt und direkt nach entsprechender Aufarbeitung vermessen.

Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit einer Analysenvorschrift wurde durch den Vergleich von Proben mit bekannter Konzentration (Kalibrierlösungen) mit der nach Probenaufarbeitung erhaltenen analysierten Menge berechnet. Sie wurde in Form einer Wiederfindungsrate berechnet und musste in der Regel innerhalb des Bereiches 90 % bis 110 % liegen.

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analysenergebnissen um einen Mittelwert. Sie wurde nach der Analyse von 4 unabhängigen Proben bei der Ergebnisangabe in Form eines Vertrauensintervalls mit angegeben.

8.4.10 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Blutplasma wurde die Methode nach LOWRY (1951) angewendet. HARTREE (1972) verbesserte die Linearität des Lowry-Tests durch eine leicht veränderte Zusammensetzung der Reagenzien. Die Farbbildung beruhen auf den im Protein enthaltenen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Diese reduzieren die Wolframmolybdatophosphorsäure zu einem blauen Molybdän (V) Farbstoff, dessen Absorption sich bei 578 nm spektralphotometrisch erfassen lässt. Die Farbentwicklung wird somit von der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins bestimmt. Der Kupferzusatz vermindert

die Unterschiede zwischen verschiedenen Proteinarten ohne die Farbreaktion zwischen Tyrosin, Tryptophan und dem Folin-Ciocalteus Phenolreagenz zu beeinflussen.

Titration zur Herstellung der 1 N Folin-Ciocalteus Phenolreagenz-Lösung

Aus der original Folin-Ciocalteus Phenolreagenz-Lösung wurde eine 1 N Lösung hergestellt. Der Verdünnungsfaktor wurde titrimetrisch ermittelt. 1 ml der original Folin-Ciocalteus Phenolreagenz-Lösung wird mit 30 ml deionisiertem Wasser im Titrierbecher vorgelegt. Titrator ist eine 0,1 N Natriumhydroxidlösung. Als Indikator wird 0,1 %iger Phenolphthaleinlösung verwendet. Während des Titrierens wird der pH-Wert mittels pH-Meter kontrolliert. Der Äquivalenzpunkt liegt bei einem pH-Wert von ca. 8,8.

Kalibrierung

Als Standardprotein diente das handelsübliche Rinderserumalbumin (Fraktion V; 67 kDa) von Merck. Für die lineare Regressionsgerade wurden mindestens 5 Messpunkte gefordert. In der Stammlösung wurde eine Konzentration von ca. 1 g/L Rinderserumalbumin in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gelöst. Die Standardlösungen werden unabhängig voneinander aus der Stammlösung verdünnt und liegen im Konzentrationsbereich 50 bis 500 mg/L.

Hauptversuch

Je 1 ml der Standardlösungen wird in ein 12ml-Zentrifugenröhrchen mit Normschliff pipettiert und mit 5 ml frisch angesetzter Reagenz A – Lösung versetzt. Dazu werden 500 µl 1 N Folin-Ciocalteus Phenolreagenzlösung langsam und tropfenweise unter Schütteln (15s - Takt) gegeben. Die Lösung wird 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend photometrisch am Zweistrahl-UV/VIS-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Der Reagenzienleerwert besteht aus 2 ml 0,1M Natriumphosphatpuffer sowie 500µl 1 N Folin-Ciocalteus Phenolreagenzlösung. Das Blutplasma wird ca. 1:400 mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) verdünnt. Anschließend wird wie oben im Hauptversuch verfahren.

8.4.11 Bestimmung der Löslichkeit von Carbonsäureestern

Prinzip

Krebs-Henseleit-Puffer wurde mit einem Überschuss an Carbonsäureester versetzt und 30 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die wässrige Phase wurde mittels n-Hexan ausgeschüttelt, mit internem Standard versetzt und gaschromatographisch analysiert.

Durchführung

In einem Reaktionsgefäß aus Glas mit Schraubverschluss wurden ca. 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer vorgelegt und mit einem Überschuss (z.B. ca. 500 µl) Carbonsäureester versetzt. Im Schüttelwasserbad wurde die Probe ca. 30 min bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (160 U/min) inkubiert. Die Probe wurde zur Beschleunigung der Phasentrennung 1 min bei 1000U/min (693 g) zentrifugiert. Durch Abpipettieren ($\text{Dichte}_{\text{Ester}} > \text{Dichte}_{\text{Puffer}}$) oder mit Hilfe eines Scheidetrichters ($\text{Dichte}_{\text{Ester}} < \text{Dichte}_{\text{Puffer}}$) erfolgte die Abtrennung der wässrigen von der organischen Phase. Ein definiertes

Volumen der wässrigen Phase v_w (z.B. 1000 μl) wurde mit einem definiertem Volumen an Extraktionsmittel n-Hexan v_o (z.B. 10000 μl) versetzt und ausgeschüttelt. 1000 μl der n-Hexan-Phase wurden daraufhin mit 1000 μl internem Standard (gelöst in n-Hexan) vermischt. Die Analyse der im Eluat enthaltenen Carbonsäureester-Konzentration erfolgte gaschromatographisch gemäß Abschnitt 8.4.8.

Im Vorversuch wurde das optimale Extraktionsverhältnis von organischer zu wässriger Phase (v_o / v_w) ermittelt, das zur vollständigen Extraktion des Esters aus der wässrigen Phase führte. Die Extraktion galt als vollständig, wenn nach wiederholtem Ausschütteln die analysierte Esterkonzentration in der organischen Phase unter der Nachweisgrenze lag.

Literaturverzeichnis

- Abdel Razik, A.; Metwally, M.S.; El-Hadi, M.F.; El Wardany, M.A. (1992) Steric substituent effect on the resin-catalyzed hydrolysis of alkyl acetate esters. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters* 48, Nr. 1, 279
- Acheampoung, A.; Abbott, F.; Burton, R. (1983) Identification of valproic acid metabolites in human serum and urine using hexadeuterated valproic acid and gas chromatographic mass spectrometric analysis. *Biochemical Mass Spectroscopy* 10 (11) 586-595
- Adamczyk, M.; Grote, J. (1999) Use of lipase for regioselective one pot amidation and hydrolysis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9 No. 2, 245
- Adler, A.J.; Kistiakowsky, G. B. (1962) Kinetics of pig liver esterases catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 84 No. 5, 695
- Albro, P. W.; Thomas, R. O. (1973) Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl)phthalate by lipases. *Biochimica et Biophysica Acta* 360, 380
- Aldridge, W. N. (1953) Serum Esterases 1. Two Types of Esterase (A and B) hydrolysing *p*-Nitrophenyl Acetate, Propionate and Butyrate and a Method for their Determination; Serum Esterases 2. An Enzyme hydrolysing Diethyl *p*-nitrophenyl phosphate (E 600) and its Identity with the A-Esterase of mammalian Sera. *Biochemical Journal* 53, 110-24
- Aleryani, S.; Kabakibi, A.; Cluette-Brown, J.; Laposata, M. (1996) Fatty acid ethyl ester synthase, an enzyme for nonoxidative ethanol metabolism, is present in serum after liver and pancreatic injury. *Clinical Chemistry* 42 No. 1, 24-7
- Ammon, R. (1940) in „Handbuch der Enzymologie“ von Nord, F.F. und Weidenhagen; R.; Akademischer Verlag Leipzig, 1. Auflage, 350 ff.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Untersuchungen von Lebensmitteln. Allgemeine Durchführung von enzymatischen Analysen L 00.00-23, Juni 1992
- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft Nr. L 251/216 vom 19.09.1984 C.10.: Abbaubarkeit. OECD Test guideline III, Decision of the Council C (81) 30 Final
- Arndt, R.; Krisch, K. (1973) Catalytic properties of an unspecific carboxylesterase (E₁) from rat liver microsomes. *European Journal of Biochemistry* 36, 129
- Aromenverordnung vom 22.12.1981 in der aktuellen Fassung vom 13.01.2004
- Augustinsson, K. B. (1961) Multiple Form of Esterase in vertebrate Blood plasma. *Annals of the New York Academy of Science* 94, 844-860
- Augustinsson, K. B. (1968) Titel. *Journal of histochemical Cytochemistry* 12, 744
- Bär, F.; Griepentrog, F. (1967) Die Situation der gesundheitlichen Beurteilung der Aromatisierungsmittel für Lebensmittel. *Medizin und Ernährung* 8, 244
- Bartko, J. J. (1985) Reporting Standard Deviations rather than Standard Error of the Mean. *American Journal of Psychiatry* 142 (9) 1060-1061

- Barton, P.; Laws, A. P.; Page, M. I. (1994) Structure-activity relationships in the esterase-catalyzed hydrolysis and transesterification of esters and lactones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, Vol. 9, 2021-2029
- Basak, A. Bhattacharya, G.; Palit, S. K. (1993) Selectivity in enzyme catalysed reaction: preferential hydrolysis of saturated methyl ester over the corresponding unsaturated ester by pig liver esterases. *Biotechnology letters* 15 No. 1, 19
- Basak, A.; Bhattacharya, G.; Palit, S.K. (1997) Novel regioselective ester hydrolysis by pig-liver esterase. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 70 No. 10, 2509
- Baton, D. H. R.; Ollis, W. D. (1979) *Comprehensive Organic Chemistry. The synthesis & reaction of organic compounds. Volume 5: Biological Compounds.* Pergamon Press Ltd., p. 914 ff.
- Becker, H. G. O. et al. (1996) *Organikum: Organisch-Chemisches Grundpraktikum. 20. Auflage,* Johann Ambrosius Barth Verlag, Hüthig GmbH Heidelberg Leipzig
- Beelitz, H.-D.; Grosch, W., Schieberle, A. (2001) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. überarbeitete Auflage,* Springer Verlag Berlin Heidelberg, 112 ff., 332 ff.
- Bergmeyer, H. U. (Hrsg) (1970) *Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Band 1,* Verlag Chemie GmbH Weinheim; 111, 274, 963 ff, 968
- Bernhardt, T. G.; Cannistraro, P. A.; Bird, D. A.; Doyle, K. M.; Laposata, M. (1996) Purification of fatty acid ethyl ester by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 675, 198-96
- Beyer; H.; Walter, W. (1984) *Lehrbuch der organische Chemie. 20. überarbeitete und ergänzte Auflage,* S. Hirzel Verlag Stuttgart, 244 f.
- Biochrom (2001) *Kultur der Zelle, Produkte für Zellkulturen,* Biochrom AG seromed®, 11
- Biotest-Info (2003) www.biotest.de
- Bird, D. A.; Laposata, M.; Hamilton, J. A. (1996) Binding of ethyl oleate to low density lipoprotein, phospholipid vesicles, and albumin: a ¹³C NMR study. *Journal of Lipid Research* 37, 1449-1458
- Bird, D. A.; Szczepiorkowski, Z. M.; Trace, V. C.; Laposata, M. (1995) Low-density lipoprotein reconstituted with fatty acid ethyl esters as a physiological vehicle for ethyl esters delivery to intact cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19 No.5, 1265-1270
- Boyer, P. D. (1971) *The Enzymes. V, Hydrolysis: Sulfate Esters, Carboxyl Esters, Glycosidases; Hydratation,* 3rd edition, Academic Press New York and London, 43 ff.
- Briggs, G.E.; Haldane, J.B.S. (1925) A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical Journal* 19, 338-339
- Britt, A. J.; Bruce, N.C.; Lowe, Ch. R. (1992) Identification of a cacaine esterase in a strain of *Pseudomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology* 174 No. 7, 2087 - 2094
- Brown, A.J. (1902) Enzyme Action. *Journal of the Chemical Society (Trans.)* 81, 373-388
- Bruchhausen, von F. (Hrsg.) (1991) *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Band 2. Methoden, 5., vollst. neubearbeitete Auflage* Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 844 ff.

- Brunner, G. (1996) *Mathematik für Chemiker I* (Spektrum Hochschultaschenbuch). Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 137 f.
- Buchwald, P. (2002) Structure-Metabolism Relationship: Steric Effects and the Enzymatic Hydrolysis of Carboxylesters. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **1**, Issue 1: <http://www.bentham.org/mrmc1-1>
- Buchwald, P.; Bodor, N. (1999) Quantitative Structure-Metabolism Relationships: Steric and Nonsteric Effects in the Enzymatic Hydrolysis of Noncongener Carboxylic Esters. *Journal of Medical Chemistry* **42**, 5160-5168
- Buchwald, P.; Bodor, N. (2000) Structure-based estimation of enzymatic hydrolysis rates and its application in computer-aided retrometabolic drug design. *Pharmazie* **55**, 210-217
- Buddecke, E. (1994) *Grundriss der Biochemie*, Walter de Gruyter Verlag Berlin New York, 443 ff.
- Castle, L.; Nichol, J.; Gilber, J. (1993) Migration from plasticized films into food. 6. Hydrolysis of polymeric plasticizer under simulated gastric and intestinal conditions. *Food additives and contaminants* **10** No. 5, 523
- CEN/TC 52/WG 9 TG 3 (November /2000) Safety of Toys. Organic chemical compounds – Risk Assessment, “Artificial intestinal fluids”, Addendum 2 to appendix 3, 2.1.2
- Chandler, W.; David, Y.; Yongfei; Lee, Donald G. (1992) New kinetic methods. 2. An indirect measurement of ester formation and hydrolysis rates. *Journal of Physical and Organic Chemistry* **5** No. 6, 334-340
- Child, J. J.; Oka, T.; Simpson, F. J.; Krishnamurty, H.G. (1971) Purification and properties of a phenol carboxylic acid acyl esterase from *Aspergillus flavus*. *Canadian Journal of Microbiology* **17** No. 11, 1455 - 1463
- CIVO-TNO (1991) *Volatile Compounds in Food, Qualitative and Quantitative Data*. 5th edition, Edited by H. Maarse, C.A. Visscher, Supplement 2, TNO Biotechnology and Chemistry Institute, Zeist NL
- Cohen, S. G.; Elkind, J L.; Chishti, S. B.; Giner, J.-L., P.; Reese, H.; Cohan, J. B. (1984) Effects of volume and surface property in hydrolysis by acetylcholinesterase. The trimethyl site, *Journal of Medical Chemistry* **27** No. 12, 1643
- Cooper, I.; Lord, T.; Tice, P. A. (1995) Hydrolysis studies on olamide in simulated gastrointestinal fluids. *Food additives and contaminants* **12** No. 6, 769
- Council of Europe (1970) *Natural Flavouring Substances, Their Sources and Added Artificial Flavouring Substances. Partial Agreement in the Social and Public Health Field , List A(1), Series 2*, Strasbourg
- Council of Europe (1974) *Natural Flavouring Substances, Their Sources and Added Artificial Flavouring Substances. Partial Agreement in the Social and Public Health Field , List 1*, Strasbourg
- Council of Europe (1981) *Natural Flavouring Substances, Their Sources and Added Artificial Flavouring Substances. Partial Agreement in the Social and Public Health Field , List 2*, Strasbourg

- Dahl, A. R.; Miller, S. C. (1985) Hydrolytic enzymes in the respiratory tract. Inhalation Toxicology Research Institute Annual Report, 152-155
- Dahl, A. R.; Miller, S. C.; Petridou-Fischer, J. (1987) Carboxylesterases in the respiratory tracts of rabbits, rats and syrian hamsters. Toxicology Letters 36 No. 2, 129-136
- Dan, L.; Laposata, M. (1997) Ethyl palmitate and ethyl oleate are the predominant fatty acid ethyl esters in the blood after ethanol ingestion and their synthesis is differentially influenced by extracellular concentrations of their corresponding fatty acids, Alcoholism: Clinical and experimental research 21 No. 2, 286-292
- Dekant, W.; Vamvakas, Sp. (1994) Toxikologie für Chemiker und Biologen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 111 f., 127 f.
- Delbressine, L. P. C.; van Balen, H. C. J. G.; Seutter-Berlage, F. (1982) Isolation and identification of mercapturic acid metabolites of phenyl substituted acrylate esters from urine of female rats. Archives in Toxicology 49, 321-330
- DeTar, DeLos F. (1980) Effects of alkyl groups on rates of acyl-transfer reactions. Journal of Organic Chemistry 45 No. 45, 5166-5174
- DeTar, DeLos F. (1980) Effects of alkyl groups on rates of S_N2 reactions. Journal of Organic Chemistry 45 No. 45, 5174-5176
- DeTar, D. F.; Tenpas, C. J. (1976) Calculations of steric hindrance in ester hydrolysis based on estimation of van der Waals strain energies of alkanes. Journal of the American Chemical Society 98 No. 15, 4567-4571
- DeTar, DeLos F.; Tenpas, C. J. (1976a) Theoretical calculation of steric effects in ester hydrolysis, Journal of American Chemical Society 98 No. 25, 7903-7908
- Deutsche Norm. Chemische Analytik. DIN 32 645: Nachweis,- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Mai 1994
- Deutsche Norm. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser- und Schlammuntersuchung, DIN 38 402, Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen, Mai 1986
- Deutsche Norm. Sicherheit von Spielzeug. DIN EN 71-3 (März 1995) Teil 3: Migration bestimmter Elemente
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. Biochemical Journal 55, 170-171
- Dixon, M. (1972) The graphical determination of K_m and K_i , Biochemical Journal 129, 197-202
- Dixon, M.; Webb, E. C. (1966) Enzymes. Longmans, Green and Co., London NewYork Toronto, 183 ff.
- Dokumenta Geigy (1975) Wissenschaftliche Tabellen, 7. Ausgabe, 639 ff.
- Doyle, K. M.; Bird, D. A.; Al-Salihi, S.; Hallaq, Y.; Cluette-Brown, J. E.; Goss, K. A.; Laposata, M. (1994) Fatty Acid Ethyl Esters are present in human serum after ethanol ingestion. Journal of Lipid Research 35, 428-37

- Doyle, K. M.; Cluette-Brown, J. E.; Dube, D. M.; Bernhardt, T. G.; Morse, C. R.; Laposata, M. (1996) Fatty Acid Ethyl Esters in the Blood as Markers for Ethanol Intake. *Journal of the American Medical Association* 276. No. 14, 1152-1156
- Drauz, K.; Waldmann, H. (1995) Enzyme catalysis in organic synthesis, *A comprehensive Handbook*, 26, 112 ff.
- Eadie, G. S. (1942) The Inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *Journal of Biological Chemistry* 146., 85
- Empfehlung der Gesellschaft für Klinische Chemie, Standards und Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität in biologischen Flüssigkeiten (1972) *Zeitschrift für klinische Chemie* 10, 182-92
- Englhardt, A. (1966) Die Enzymverteilungsmuster des menschlichen Serums und seine Änderungen bei verschiedenen Krankheitszuständen. *Medizinische Welt* 16, 839
- Englhardt, A. (1974) *Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik*, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart – New York, 3 f.
- Esch, O.; Schteingart, C. D.; Pappert, D.; Kirby, D.; Treich, R.; Hofman, A. F. (1993) Increased Blood Levels of Methyl tert-Butyl Ether but not of Ethyl Propionate during Instillation with Contact Gallstone Dissolution Agents in the Pig. *Hepatology* 18 No.2, 373-9
- European Commission (2002) Health and Consumer Protection Directorate-General; Directorate D – Food Safety: production and distribution chain, D3 – Chemical and physical risks; surveillance. *Food Contact materials – Practical Guide (updated to 1st March 2002)* Section 3 Note for Guidance, p. 100
- European Commission (2002) Note for Guidance. *Food Contact Materials*, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General (update to 15.01.2002), Annex 3.2.2
- Evans, C. G.; Thomas, J. D. R. (1971) Effect of unsaturated substituents on the hydrolysis of esters. *Journal of the Chemical Society (B)* 7, 1502-4
- Fahelbum, I. M. S.; James, S. P. (1977) The absorption and metabolism of methyl cinnamate, *Toxicology* 7, 123
- Fahelbum, I. M. S.; James, S. P. (1979) Absorption, Distribution and metabolism of propyl anthranilate. *Toxicology* 12, 75
- Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients (1995) Edited by T. E. Furia and N. Bellanca, 3rd Edition, Vol. II, CRC Press Cleveland, OH
- Feissli, S.; Forster, G.; Laudahn, G.; Schmidt, E.; Schmidt, F. W. (1966) Normal-Werte und Alterung von Hauptketten-Enzymen im Serum, *Klinische Wochenschrift* 44, 390
- Flavoring Extract Manufacturer's Association (1965) Survey of flavouring ingredient usage levels, *Fd. Technol.*, Champaign 19 No. 2, part 2, 155
- Ford, R. A.; Letizia, C.; Api, A. M. (1988) Monographs on fragrance raw materials. *Food and Chemical Toxicology* 26 No. 4, 273-415

- Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K. (Hrsg.) (1992) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6., völlig neubearbeitete Auflage, BI Wissenschaftsverlag Mannheim Leipzig Wien Zürich, 26, 60
- Froede, H. C.; Wilson, I. B. (1984) Direct Determination of Acetyl-Enzyme-Intermediate in the Acetylcholinesterase-catalyzed Hydrolysis of Acetylcholine and Acetylthiocholine. *The Journal of Biological Chemistry* 259 No. 17, 11010-3
- Furth, E. F.; Sprecher, H.; Fisher, E. A.; Fleishman, H. D.; Laposata, M. (1992) An *in vitro* model for essential fatty acid deficiency: HepG2 cells permanently maintained in lipid-free medium. *Journal of Lipid Research* 33, 1719-26
- Gad, M. Z. (1994) The distribution of non-specific carboxylesterases and glutathione s-transferases in different rat liver cells. *Biochemical Pharmacology* 48 No. 1, 139 – 44
- Gallaher, E. J.; Loomis, T. A. (1975) Metabolism of Ethyl Acetate in the Rat: Hydrolysis to Ethyl Alcohol *in Vitro* and *in Vivo*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 34, 309-13
- Gaustad, R.; Berg, T.; Fonnum, F. (1992) Heterogeneity of carboxylesterase in rat liver cells. *Biochemical Pharmacology* 44 (4) 827-829
- Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (LMBG - Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) vom 09.09.1997 in der aktuellen Fassung vom 25.11.2003
- Ghanayem, B. I.; Maronpot, R. R.; Methews, H. B. (1985) Ethyl Acrylate-Induced Gastric Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 80, 336-344
- Ghittori, S.; Imbriani, M.; Borlini, F.; Pezzagno, G.; Zadra, P. (1984) Studies on the stability of esters in blood *in vitro*. *Bollettino Società Italiana di Biologia Sperimentale* 60, 2207-2213
- Gnanasekharan, V.; Floros, J. D. (1997) Migration and sorption phenomena in packaged foods, *Critical reviews in food science and nutrition* 37 No. 6, 519-59
- Goldberg, M.; Thomas, D.; Legoy, M. D. (1990) The control of lipase-catalyzed transesterification and esterification reaction rates. Effects of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity. *European Journal of Biochemistry* 190 No. 3, 603-9
- Goll, M. (1992) Untersuchungen zur enteralen Resorption des Phosphorsäureesters 0,0,S-Trimethylphosphorothionat und zum Abbau von Malathion im Plasma verschiedener Spezies. Dissertation. Freie Universität Berlin. Journal-Nr. 1599, 47 ff.
- Gorski, N. P.; Nouraldin, H.; Dube, D. M.; Preffer, F. I.; Dombrowski, D. M.; Villa, E. M.; Lewandowski, K. B.; Weiss, R. D.; Hufford, C.; Laposata, M. (1996) Reduced fatty Acid Ethyl ester Synthase Activity in the White Blood Cells of Alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 20 No. 2, 268-74
- Goss, K.; Alharethi, R.; Laposata, M. (1999) Fatty acid ethyl ester synthesis in the preparation of Scotch Whiskey. *Alcohol* 17 No. 3, 241-5
- Goto, M.; Kawasaki, M.; Kometani, T. (2000) Enzymatic resolution of 2-phenyl-1-propanol by enantioselective hydrolysis of its ester having a bulk group in an acyl moiety. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9, 245-250
- Gottwald, W. (1995) GC für Anwender. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York

- Gottwald, W. (2000) Statistik für Anwender. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York
- Gräser, H. (1971) Biochemisches Praktikum. Studienbuch für Biologen, Chemiker, Pharmazeuten und Mediziner im 2. Studienabschnitt. Vieweg Verlag Braunschweig, 113 ff.
- Greenzaid, P.; Jencks, W. P. (1971) Pig Liver esterase. Reactions with Alcohols, Structure-Activity-Reactivity Correlations, and the Acyl-Enzyme Intermediate. *Biochem.* 10 Vol. 7, 1210
- Grob, K. (2001) Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography. Concepts, Processes, Practical Guidelines, Sources of Error. 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag
- Gross, R (1977) Lehrbuch der Inneren Medizin. Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 1161
- Grundschober, F. (1977) Toxicological assessment of flavouring esters. *Toxicology* 8, 387
- Haarmann & Reimer (2000) Auf den Geschmack gekommen... Informationen zu Aromen. Informationsbroschüre der Haarmann und Reimer GmbH Holzminden
- Haber, P. S.; Wilson, J. S.; Apte, M. V.; Pirola, R. C. (1993) Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 121. 759-764
- Hagan, E. C.; Hansen, W.H.; Fitzhugh, O. G.; Jenner, P. M.; Jones, W. I.; Taylor, J. M.; Long, E. L.; Nelson, A. A.; Brouwer, J. B. (1967) Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food and Cosmetic Toxicology* 5, 141-57
- Hall, L. H.; Kier, L. B. (1981) The relation of molecular connectivity to molecular volume and biological activity, *European Journal of Medical Chemistry* 16 No. 5, 399-407
- Hancock, C.K.; Meyers, E.A.; Yager, B.J. (1961) Quantitative separation of hyperconjugation effects from steric substituent constants. *Journal of the American Chemical Society* 83, 4211
- Hanes, C. S. (1932) Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochemical Journal* 26. 1406-1421
- Hansch, L.; Leo, A. (1979) Substituent constant for correlation analysis in chemistry and biology. John Wiley & Sons, New York
- Hansen, Ch. M.; Andersen, B. H. (1988) The Affinities of Organic Solvents in Biological Systems. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 49 (6) 301-308
- Hartmann, K.; Lezki, E.; Schäfer, W. (1974) Statistische Versuchsplanung und –auswertung in der Stoffwirtschaft. VEB Deutscher Verlag der Grundstoffindustrie Leipzig, 47 ff.
- Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422 – 427
- Hasan, F. B.; Cohen, S. G.; Cohen, J. B. (1980) Hydrolysis by acetylcholinesterase. Apparent molal volumes and trimethyl and methyl subsites. *Journal of Biological Chemistry* 255 No. 9, 3898-3904
- Haug, H.; Mannes, H. (1969) Zur Frage des endogenen Abbaus von Enzymen, *Klinische Wochenschrift* 47, 225 f.
- Hauptmann, S. (1988) Organische Chemie. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 319

- Hayakawa, K.; Nakamura, S.; Inaki, K.; Miyazaki, M. (1989) Determination of Carboxylesters by Indirect Photometric Ion Chromatography with an On-Line Enzyme Immobilized Column. *Analytical Sciences* 5, 691
- Henri, V. (1902) General Theory of Action of Certain Hydrolases. *Compt. rend. hebd. Acad. Sci. Paris* 135, 916-919 (1902)
- Hess, B. (1966) Enzyme im Blutplasma, Biochemie und Klinik, Monographien in zwangloser Folge; Erste Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 115 f.
- Heymann, E.; Junge, W. (1979) Characterization of the Isoenzymes of Pig-Liver Esterase. 2. Kinetic Studies. *European Journal of Biochemistry* 95, 519-525
- Hofstee, B.H.J. (1954) TITEL. *Journal of Biochemistry* 207, 219
- Holtzhauer, M. (1997) Biochemische Labormethoden. 3. Auflage. Springer Verlag Berlin, 238 f.
- Hopkins, W. G. (2002) A new view of statistics. Internet Society for Sport Science: <http://www.sportsci.org/resource/stats>
- Hosokawa, M.; Maki, T.; Satoh, T. (1990) Characterisation of molecular species of liver microsomal carboxylesterases of several animal species and humans. *Archives of biochemistry and biophysics* 277 No. 2, 219-27
- Hungund, B. L.; Goldstein, D. B.; Villegas, F.; Cooper, T. B. (1988) Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. *Biochemical Pharmacology* 37 No. 15, 3001-4
- Hungund, B. L.; Zheng, Z.; Barkai, A. I. (1995) Turnover of ethyl linoleat in rat Blutplasma and its distribution in various organs. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19, 374
- Ibanez, P. (1988) Final report on the safety assessment of amyl acetate and isoamyl acetate. *Journal of the American College of Toxicology* 7 No. 6, 705-19
- Inoue, M.; Morikowa, M.; Tsubo, M.; Ito, Y.; Sugiara, M. (1980) Comparative study of human intestinal and hepatic esterases as related to enzymatic properties and hydrolysing activity for ester-type drugs. *Japanese Journal of Pharmacology* 30, 529-35
- Järv, J.; Kesvatera, T.; Aaviksaar, A. (1976) Structure-activity relations in acetylcholinesterase reactions. Hydrolysis of non-ionic acetic esters. *European Journal of Biochemistry* 67 No. 2, 315-22
- Jahreis, G.; Bochmann, K. (1998) Speisefette im Vergleich: Zur physiologischen Wirkung enthaltener Fettsäuren. *Ernährungs-Umschau* 45 (6) 192-197
- JECFA (1996) Evaluation of certain food additives and contaminants. 46th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series. No. 868. World Health Organisation, Geneva, 221 ff.
- JECFA (1997) 49th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series. World Health Organisation, Geneva, 221 ff.
- JECFA (1999) Safety evaluation of certain food additives. 51st meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive Series No. 42. World Health Organisation, Geneva, p. 222

- JECFA (2000) 55th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series. World Health Organisation, Geneva, p. 221 ff.
- Junge, W.; Heymann, E. (1979) Characterisation of the Isoenzymes or Pig-Liver Esterase. 2. Kinetic Studies. *European Journal of Biochemistry* 95, 519-525
- Kakkar, T.; Mayersohn, M. (1998) Simultaneous quantitative analysis of methyl salicylate, ethyl salicylate and salicylic acid from biological fluids using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 718 No. 1, 69-75
- Kamlet, M. J.; Doherty, R. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. (1988) Solubility properties in biological media. 12. Regarding the mechanism of nonspecific toxicity or narcosis by organic nonelectrolytes. *Quantitative Structure-Activity Relationship* 7, 71-8
- Kaneko, T.; Wang, P.Y.; Sato, A. (1994) Partition coefficients of some acetate esters and alcohols in water, blood, olive oil, and rat tissues, *Occupational and Environmental Medicine* 51 No. 1, 68-72
- Katz, Morris H. (1967) Chemical structure and odor. Aromatic cyclic compounds, *Food Product Development* 1 No. 5, 23-6, 28, 31-2
- Kier, L. B.; Murray, W. J.; Hall, L. H. (1975) Molecular connectivity. 4. Relations to biological activities. *Journal of Medical Chemistry* 18 No. 12, 1272-4
- Kier, L. B.; Di Paolo, T.; Hall, L. H. (1977) Structure activity studies on odor molecules using molecular connectivity, *Journal of Theoretical Biology* 67 No. 3, 585-95
- Kleber, H.-P.; Schlee, D. (1987) *Biochemie I - Allgemeine und funktionelle Biochemie*. Gustav-Fischer Verlag, Jena
- Kleber, H.-P.; Schlee, D.; Schöpp, W. (1997) *Biochemisches Praktikum*. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, 11
- Knaak, J. B.; Al-Bayati, M. A.; Raabe, O. G. (1995) Development of partition coefficient, V_{max} and K_m values and allometric relationships. *Toxicology Letters* 79, 87-98
- Kolditz, L. Hrsg. (1993) *Anorganikum. Lehr- und Praktikumsbuch der anorganischen Chemie mit der Einführung in die physikalische Chemie, Band 2*, 13. völlig neu bearbeitete Auflage, Johann Ambrosius Barth Leipzig, Berlin, Heidelberg, Edition Deutscher Verlag der Wissenschaften, 318 ff; 994 ff.
- Koszinowski, J.; Piringer, O. (1987) Food/package compatibility and migration. *Journal of Plastic Film and Sheeting* 3 No. 2, 96-111
- Krebs, H. A.; Henseleit, K. (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Zeitschrift der physikalischen Chemie* 210, 33-66
- Kromidas, S. (1995) *Qualität im analytischen Labor*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Kunzek, H.; Gloyna, D. (2000) Die Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen. *Deutsche Lebensmittelrundschau* 96 No. 3, 107-115
- Landois-Garza, J.; Hotchkiss, Joseph H. (1988) Permeation of high-barrier films by ethyl esters. Effect of permeant molecular weight, relative humidity and concentration. *American Cancer Society, Symposium Series* 365 (Food Package Interaction) 42-58

- Lange, S.; Bender, R. (2001) Variabilitätsmaße. Deutsche Medizinische Wochenschrift 126 Nr. 15, T29-T30
- Lange, L. G.; Bergmann, S. R.; Sobel, B. E. (1981) Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. J. Biol. Chem. 256. 12968-12973
- Laposata, M. (1997) Fatty acid ethyl esters: Short-term and long-term serum markers of ethanol intake. Clinical Chemistry 43 No. 8 (B) 1527-34
- Laposata, M. (1998) Fatty acid ethyl esters: Ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. Progress in Lipid Research 37 No. 5, 307-16
- Laposata, M. (1999) Fatty acid ethyl esters: Current facts and speculations. Prostaglandins, Leucotriens and Essential Fatty Acids 60 No. 5&6, 313-315
- Laposata, M. (1999a) Fatty acid ethyl esters: Nonoxidative Ethanol Metabolites with Emerging Biological and Clinical Significans. Lipids 34 Supplement 281-285
- Laposata, M.; Scherrer, D. E.; Lange, L. G. (1989) Fatty acid ethyl esters in adipose tissue. A laboratory marker for alcohol-related death. Archives in Pathology Laboratory Medicine 113. 762-766
- Laposata, M.; Szczepiorkowski, Z. M.; Brown, J. E. (1995) Fatty acid ethyl esters: non-oxidative metabolites of ethanol. Prostaglandins, Leukotrienes, Essential Fatty Acids 52 No. 2&3, 87-91
- Lauridsen, C.; Hedemann, M. S.; Jensen, S. K. (2001) Hydrolysis of tocopheryl and retinyl esters by porcine carboxyl ester hydrolase is affected by their carboxylate moiety and bile acids. Journal of Nutritional Biochemistry 12 (4) 219
- Lee, X. P.; Kumazawa, T.; Sato, K.; Watanabe, K.; Seno, H.; Suzuki, O. (1998) Determination of solvent thinner components in human body fluids by capillary gas chromatography with trapping at low oven temperature for headspace samples, Analyst 123 No. 1, 147-50
- Lehninger, A. L. (2001) Biochemie, 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim New York, 153 ff.
- Leuthardt, F. (1963) Lehrbuch der physiologischen Chemie, 15. neu bearbeitete Auflage, Walter de Gruyter Verlag Berlin, 561 ff.
- Lensink, M. F.; Mavri, J.; Berendsen, H. J. C. (1999) Simulation of Slow Reaktion with Quantum Character: Neutral Hydrolysis of Carboxylic Ester. Journal of Computational Chemistry 20 No. 8, 886-95
- Lindl, T.; Bauer, J. (1994) Zell- und Gewebekulturen, 3., überarbeitete Und erweiterte Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 75
- Lineweaver, H.; Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. Journal of the American Chemical Society 56, 658-666
- London, G. M. (1988) Organic Chemistry. The Benjamin - Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, 834 ff.
- Longland, R. C.; Shilling, W. H.; Gangolli, S. D. (1977) The hydrolysis of flavouring esters by artificial gastrointestinal juices and rat tissue preparations. Toxicology 8 No. 2, 197-204

- Lottspeich, F.; Zorbas, H. (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 49 ff.
- Loudon, G. M. (1988) Organic Chemistry. 2nd Edition, Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlow Park California, 833
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randal, R. J. (1951) Protein measurement with the foline phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265-75
- Miad-Kohnert, U. (2001) Lexikon der Ernährung. Band 1. Spektrum – Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 165, 427
- Manautou, J.E.; Carlson, G. P. (1991) Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation *in vivo* and *in vitro* in rat lung. Toxicology 70 No. 3, 303-12
- March, J. (1985) Advanced Organic Chemistry – Reactions, Mechanisms and Structure, International Student 3rd Edition, John Wiley and Sons, New York, 349 ff.
- Markus, M.; Hess, B. (1975) The analysis of kinetic data in biochemistry. A critical evaluation of methods. FEBS Letters 63 No. 2, 225 - 30
- Massarrat, S. (1964) Tagesschwankungen der Enzymaktivitäten der Glutamat-oxalacetat-, Glutamat-pyruvat-Transaminasen und Lactatdehydrogenase im Serum bei Leberkranken und Gesunden. Klinische Wochenschrift 42, 91-4
- McCarthy, T. J.; Witz, G. (1997), Structure-activity relationships in the hydrolysis of acrylate and methacrylate esters by carboxylesterase *in vitro*. Toxicology 116, 153-8
- McClelland, R. A.; Santry, L. J. (1983) Reactivity of Tetrahedral Intermediates. Accounts of Chemical Research. American Chemical Society 16, 394-99
- McCracken, N. W.; Blain, P. G.; Williams, F. M. (1993) Nature and role of xenobiotic metabolizing esterases in rat liver, lung, skin and blood. Biochemical Pharmacology 45 No. 1, 31-6
- McCracken, N. W.; Blain, P. G.; Williams, F. M (1993a) Human xenobiotic metabolizing esterases in liver and blood. Biochemical Pharmacology 46 No. 7, 1125-9
- Means, G. E.; Bender, M. C. (1975) Acetylation of human serum albumin by p-nitrophenyl acetate. Biochemistry 14, 4989-4994
- Mentlein, R.; Heymann, E. (1984) Hydrolysis of ester- and amidetype drugs by the purified isoenzymes of nonspecific carboxylesterases from the rat. Biochemical Pharmacology 33, 1243-48
- Merck (2002) Produktbeschreibung Extrelut
- Michaelis, L.; Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochemische Zeitschrift. Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 49, 333-69
- Mills, G. A.; Walker, V.; Mughal, H. (1999) Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids. Journal of Chromatography B 730. 113-122
- Minagawa, T., Kohno, Y., Suwa, T., Tsuji, A. (1995) Species differences in hydrolysis of isocarbacylin methyl ester (TEI-9090) by blood esterases, Biochemical Pharmacology 49 No. 10, 1361-5

- Mitzner, R.; Lemke, F. (1981) Basic hydrolysis of alkyl acetates. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule „Karl Liebknecht“ Potsdam* 25 Nr. 5, 687-97
- Montgomery, D C. et al. (1994) *Applied Statistics and Probability for Engineers*. John Wiley and Sons. 309-310
- Moriguchi, I.; Kanada, Y. (1977) Quantitative structure-activity studies, Part III. Use of van der Waals volume in structure-activity studies. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 25 No. 5, 926 - 935
- Mosciano, G.; Long, J.; Holmgren, C.; Ahmedi, S. (1998) Organoleptic characteristics of flavor materials, *Perfumer and Flavorist* 23 No. 3, 56
- Moseley, J. D.; Staunton, J. (2000) Influence of ester chain length, enzyme, and physical parameters on lipase-catalysed hydrolyses of meso-oxiranedimethanol esters. Part 2. *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 3197 - 209
- Munro, I. C.; Shubik, P.; Hall, R. (1998) Principles for the safety evaluation of flavouring substances. *Food and Chemical Toxicology* 36, 529-40
- Mutch, E.; Blain, P. G.; Williams, F. M. (1992) Interindividual Variations in Enzymes Controlling Organophosphate Toxicity in Man. *Human and Experimental Toxicology* 11, 109-16
- Myers, R. C.; Tyler, T. R. (1992) Acute toxicological evaluation of ethyl propionate. *Acute Toxicological Data* 1 No. 3, 174
- Nayak, P. L.; Rout, Mahendra K. (1971) Influence of solvent composition on the rates of basic hydrolysis of cinnamic esters. *Journal of the Indian Chemical Society* 48 No. 2, 141-4
- Nayak, P. L.; Rout, Mahendra K. (1971) Influence of solvent composition on the rates of basic hydrolysis of cinnamic esters. *Journal of the Indian Chemical Society* 48 No. 2, 141-4
- Niyaz Khan, M.; Olagbemiro, T. O. (1982) Kinetic evidence for the occurrence of the oxydianionic tetrahedral intermediates in the hydrolysis of methyl salicylate and methyl o-methoxybenzoate in a highly alkaline medium. *Journal of Organical Chemistry* 47, 3695 - 99
- NC-IUMBM (16.02.2002) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUMBM) on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>)
- Ohta, N.; Kurono, Y.; Ikeda, K. (1983) Esterase like activity of human serum. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72, 385-388
- Opdyke D. L. J. (1975) Monographs on fragrance raw materials. *Food and Cosmetic Toxicology* 1, 99-100; 5, 545-53, 849 (Suppl.)
- Opdyke, D. L. J. (1978) Monographs on Fragrance Raw Materials, *Food and Cosmetics Toxicology, Suppl.* 1, 16, 731-91
- Opdyke, D. L. J. (1979) Monographs on Fragrance Raw Materials, *Food and Cosmetics Toxicology, Suppl.* 1, 17, 781-3
- Opdyke, D. L. J. (1981) Monographs on Fragrance Raw Materials, *Food and Cosmetics Toxicology, Suppl.* 1, 19, (2) 237-54

- Opdyke, D. L. J. (1982) Monographs on Fragrance Raw Materials, Food and Cosmetics Toxicology, Suppl. 1, 26, 321
- Otto, P.; Schmidt, E.; Schmidt, F. W. (1964) Enzymspiegel im Serum bei körperlicher Arbeit und ambulanten Patienten. *Klinische Wochenschrift* 42, 75
- Peter, G. (1972) *Klinische Chemie, Studienlehrbuch Medizin 16, Kurzlehrbuch und Kommentar zum Gegenstandskatalog für den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*, Rathgeber Verlag München, 7 f.
- Plata, J.; Orte, J. C.; Martinez, F.; Thomas, J. (1990) GLC of salicylic acid, methyl and ethyl salicylates. *Analysis* 18. 146-47
- Provencher, L.; Jones, J. B. (1994) A concluding specification of the dimension of the active site model of pig liver esterase. *Journal of Organic Chemistry* 59, 2729-2732
- Provencher, L.; Wynn, H.; Jones, J. B. (1994a) Enzymes in organic synthesis 51. Probing the dimensions of the large hydrophobic pocket of the active site of pig liver esterase. *Tetrahedron: Asymmetry* 4 (9) 2025-2040
- Pschyrembel (2001) *Klinisches Wörterbuch*, 259. komplett überarbeitete, erweiterte, aktualisierte Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York, 216
- Qinn, D. M.; Medhekar, R.; Baker, N. R. (1999) „Chapter 5: Ester Hydrolysis“ in *Comprehensive Natural Products Chemistry. 5 Enzymes, Enzyme Mechanism, Proteins and Aspects of NO Chemistry* (Poulter, C. D.; Ed.) Elsevier Science, Oxford UK pp. 101-137
- Radhakrishnamurti, P. S.; Patra, P. C. (1970) Conformational studies in ester hydrolysis. *Proceedings of Indian Acad. Sci., Sect. A* 71 No. 4, 181-8
- Rainsford, K. D.; Ford, N. L. V.; Brooks, P. M.; Watson, H. M. (1980) Plasma aspirin esterase in normal individuals, patients with alcohol liver disease and rheumatoid arthritis. Characterisation and the importance of enzymatic components. *European Journal of Clinical Investigation* 10, 413-420
- Rakshit, S. C.; Datta, S. (1976) Role of water in the mechanism of hydrolysis of cinnamic esters. *Journal of the Indian Chemical Society* 53 No. 11, 1104-7
- Rakshit, S. C.; Datta, S. (1979) Kinetic of hydrolysis of substituted cinnamic esters. *Indian Journal of Chemistry* 17A, 406 – 409
- Rakshit, S. C.; Datta, S.; Mukherjee, Bani (1981) Extremal properties in kinetic studies. *Journal of the Indian Chemical Society* 58 No. 8, 750-753
- Randebrock, R. (1986) *Geruch und Konstitution. Eine Beweisführung für die Molekulartheorie des Geruches. Teil IV. Parfümerie und Kosmetik* 67. 10 ff.
- Rapoport, M. (1987) *Medizinische Biochemie*. VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin, 121 ff., 143 ff., 540 ff.
- Renger, B.; Jehle, H.; Fischer, M.; Funk, W. (1994) Validierung von Analysenverfahren in der pharmazeutischen Analytik. *Pharm. Ind.* 56 No. 11, 993-1000
- Renner, H. W. (1986) The antiplastogenic potential of fatty acid methyl esters. *Mutation Research* 172, 265-269

Richtlinie des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über Aromen zur Verwendung in Lebensmitteln und über Ausgangsstoffe für ihre Herstellung (88/388/EWG) vom 22.06.1988

Rick, W. (1990) Klinische Chemie und Mikroskopie. 6. überarbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin, 8 f.

Riley, D. J. S.; Kyger, Erich M.; Spilburg, Curtis A.; Lange, Louis G. (1990) Pancreatic cholesterol esterases. 2. Purification and characterisation of human pancreatic fatty acid ethyl ester synthase. *Biochemistry* 29 No. 16, 3848-52

Robbi, M.; Beaufay, H. (1983) Purification and characterization of various esterases from rat liver. *European Journal of Biochemistry* 137. 293-301

Römpf-Lexikon Chemie, Hrsg.: Falbe, J.; Regitz, M. (1977) Band 2, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag

Römpf-Lexikon Chemie, Hrsg.: Falbe, J.; Regitz, M. (1977) Band 2, 10. völlig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1837 f.

Rösch, N. (1993) Mathematik für Chemiker – Eine Einführung. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 360

Rood, D. (1999) A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting in Capillary Gas Chromatographic Systems. Wiley-VCH Verlag

Rosenberry, T.L. (1975) Catalysis by acetylcholinesterase. Evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 72 No. 10, 3834-3838

Rossiter, K. (1996) Quantitative relationships between structure and the fruity odor of esters. *Perfumer and Flavorist* 21 No. 2, 33-6, 38-40, 42-4, 46

Ruzicka, V.; Cervený, L.; Procházka, J. (1970) Effect of the structure of esters on their pyrolysis rate. *Sbornik-Vysokè školy chemicko-technologickè v Praze, Organická chemie a technologie* 15, 69-84

Sachs, L. (2002) Angewandte Statistik – Anwendungen statistischer Methoden. 10. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Saghir, M.; Blodget, E.; Laposata, M. (1999) The Hydrolysis of Fatty Acid Ethyl Esters in Low-Density Lipoproteins by Red Blood Cells, White Blood Cells and Platelets. *Alcohol* 19 No. 2, 163-168

Saghir, M.; Werner, J.; Laposata, M. (1997) Rapid *in vivo* hydrolysis of fatty acid ethyl esters, toxic nonoxidative ethanol metabolites. *Research Communications in Alcohol and Substances of Abuse* 20, No. 3 & 4, 123-33

Saghir, M.; Werner, J.; Laposata, M. (1999) A comparison of the hydrolysis and metabolism in rats of fatty acid ethyl esters within human low density lipoproteins and rat density lipoproteins. *Research Communications in Alcohol and Substances of Abuse* 20, No. 3 & 4, 123-33

Saleh, R. M.; Sandulescu, D. (1982) Structure effects of alkyl group on kinetics of hydrolysis reactions. *Egyptian Journal of Chemistry* 24 No. 4-6, 249 – 56

- Salter, L. J.; Mottram, D. S.; Whitfield, F. B. (1988) Volatile Compounds Produced in Maillard Reactions Involving Glycine, Ribose and Phospholipids. *Sci. Food Agric.* 46, 227-2421
- Sanders, T.; Sandaradura, S.; Slattery, F. (1993) Influence of ethyl myristate palmitate and oleate on plasma lipoprotein metabolism in the hamster, Scientific Meeting of the Nutrition Society, Nottingham, England, UK, July 12 - 15, 1993. *Proceedings of the Nutrition Society* 52 No. 3, 364A.
- Satoh, T.; Hosokawa, M. (1998) The Mammalian Carboxylesterases: From Molecules to Function. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 257-88
- Savary, P.; Constantin, M. J. (1970) Intestinal hydrolysis and lymphatic absorption of isopropyl esters of long - chain fatty acids in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 218 No. 2, 195-200
- Savary, P. (1972) Action of rat pancreatic juice and of purified pig pancreatic lipase upon the esters of short-chain aliphatic monoacids and long-chain primary monoalcohols. *Biochimica et Biophysica Acta* 270, 463-71
- Schäfer, S. G.; Marquardt, H. - Hrsg. (2004) *Lehrbuch der Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag Mannheim Leipzig Wien Zürich, 36, 35 f., 69 f.
- Schellenberger, A. (1989) *Enzymkatalyse*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 72 ff.
- Schenk, M. (1990) *Grundriss der physiologischen Chemie*. 8. überarbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag, 101 f., 386
- Schomburg, D. ed. (1991) *The Enzyme Handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1
- Scientific Committee on Food (SCF) Practical Guidelines for Mutagenicity and Hydrolysis Testing requested by the SCF, 2.1.2
- Sell, C. S. (1986) Dependence of fruity notes on the molecular structure. *Seifen, Öle, Fette, Wachse* 112 No. 8, 267-70
- Semino, G. (1997) Application of the safety evaluation procedure to representative groups of flavouring substances. *Rivista Italiana EPPOS, Spec. Num.*, 86-95
- Shmunes, E. (1993) Solvents and plasticizer. *Occupational Skin Disease*. Adams, R. M., Editor; Grune and Stratton, New York, 279-97, 439-61
- Sigma-Aldrich (2001-02), *Flavors & Fragrances Katalog*, International Edition, Taufkirchen, Deutschland
- Silverman, R.B. (1995) *Medizinische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, 332
- Smith, M. J. H. (1966) *The Salicylates*. A critical bibliographic review. John Wiley and Sons, New York, London, Sydney
- Soderberg, B. L.; Sicinska, E. T.; Blodget, E.; Cluette-Brown, J. E.; Suter, P. M.; Schuppisser, T.; Vetter, W.; Laposata, M. (1999) Preanalytical Variables Affecting the Quantification of Fatty Acid Ethyl esters in Plasma and Serum samples. *Clinical Chemistry* 45 No. 12, 2183-90
- Solbach, H.-G.; Merten, R. (1965) Altersabhängige Änderungen von Enzymaktivitäten im Blut, *Mitteilungen der GBK II*, 389-91

Stoops, J. K.; Horgan, D. J.; Runnegar, M. T. C.; de Jersey, J.; Webb, E. C.; Zerner, B. (1969) Carboxylesterases (EC 3.1.1). Kinetic Studies on Carboxylesterases. *Biochemistry* 8 No. 5, 2026-33

Streitwieser, A.; Heathcock, C.H. (1994) *Organische Chemie*. 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 530

Südhof, H.; Wötzel, E. (1960) Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestimmung vorgesehener Serumproben, *Klinische Wochenschrift* 38, 1165-67

Szczepiorkowski, Z. M.; Dickersin, G. R.; Laposata, M. (1995) Fatty Acid Ethyl Esters Decrease Human Hepatoblastoma Cell Proliferation and Protein Synthesis. *Gastroenterology* 108, 515-22

Taft Jr., R.W. (1951) Polar and steric substituent constant for aliphatic and o-benzoate groups from rates of esterification and hydrolysis of esters. *Journal of the American Chemical Society* 74, 2729-2732

Taft Jr., R.W. (1951) Linear free energy relationship from rates of esterification and hydrolysis of aliphatic and o-substituted benzoate esters. *Journal of the American Chemical Society* 74, 3120-3128

Tanii, H.; Hashimoto, K. (1982) Structure-toxicity relationships of acrylates and methacrylates, *Toxicology Letters* 11, 125-129

Taylor, S. L.; Dormedy, E. S. (1998) The role of flavouring substances in food allergy and intolerance. *Advances in Food and Nutrition Research* 42, 1-44

Teruya, J.; Cluette-Brown, J.; Szczepiorkowski, Z. M.; Laposata, M. (1995) Mode of transport of fatty acid to endothelial cells influences intracellular fatty acid metabolism. *Journal of Lipid Research* 36. 266-276

Toennes, W.S.; Kauert, G. (1999) Vacutainer mit Fluorid/Oxalat zur Blutentnahme für die forensische-toxikologische Analytik, 8 - 14

Toone, E. J.; Werth, M. J.; Jones, J. B. (1990) Active Site Model for interpreting and predicting the specificity of pig liver esterase. *Journal of the American Chemical Society* 112. 4946-4952

Trotta, F.; Maraglio, G.; Rapposelli, A. (1995) The effect of cyclodextrin on the hydrolysis of carboxylic acid. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 20. 353-361

US Pharmacopoeia. The United States Pharmacopoeia XXII. Inc. US Pharmacopoeia Convention, Twinbrook Parkway, Rockville, MD. 1990

Verordnung (EG) Nr. 2232/96 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28.10.1996 zur Festlegung eines Gemeinschaftsverfahrens für Aromastoffe, die in oder auf Lebensmitteln verwendet werden oder verwendet werden sollen

Verordnung (EG) Nr. 1565/2000 der Kommission vom 18.07.2000 zur Festlegung der Maßnahmen, die für die Verabschiedung eines Bewertungsprogramms gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2232/96 des Europäischen Parlaments und des Rates erforderlich sind

Verordnung (EG) Nr. 622/2002 der Kommission vom 11.04.2000 zur Festsetzung von Fristen für die Einreichung von Informationen zwecks Bewertung chemisch definierter Aromastoffe, die in oder auf Lebensmitteln verwendet werden

Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (LMKV - Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung) vom 15.12.1999 in der aktuellen Fassung vom 13.01.2004

Vinnik, M.I.; Librovich, N.B. (1976) Hydrolysis of ethyl isovalerate in aqueous hydrochloric and sulfuric acid solutions. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* 25, 1415

Vollhardt, K. P. C., Schore, N. E. (1995) *Organische Chemie*. 2. Auflage, VCH Verlagsgemeinschaft mbH, Weinheim, 202, 830

Walker, C. H.; Mackness, M. I. (1983) Esterases: Problems of Identification and Classification. *Biochemical Pharmacology* 32 No. 22, 3265-69

Waynforth, H. B.; Flecknell, P. A. (1992) *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd edition, Academic press Inc. London, Ltd., p. 342

Werner, J.; Laposata, M.; Fernández-Del Castillo, C.; Saghir, M.; Iozzo, R. V.; Lewandrowski, K. B.; Warshaw, A. L. (1997) Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl esters, a nonoxidative metabolite of alcohol. *Gastroenterology* 113. 286-294

WHO (1987) *Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Food*. WHO Environmental Health Criteria. International Program on Chemical Safety in Cooperation with the Joint FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). Environmental Health Criteria 70. WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva

Williams, A. (1989) Concerted Mechanism of Acyl Group Transfer Reactions in Solution. *Acc. Chem. Res. American Chemical Society* 22, 387-92

Williams, F. M (1985) Clinical Significance of Esterases in Man. *Clinical Pharmacokinetics* 10, 392-403

Williams, F. M.; Mutch, E. M.; Nicholson, E.; Wynne, P.; Wright, D.; Lambert, D.; Rawlins (1989) Human liver and plasma aspirin esterase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 41, 407-9

Wilson, L.Y.; Famini, G.R. (1991) Using theoretical descriptors in quantitative structure-activity relationships: some toxicological indices. *Journal of Medical Chemistry* 34 No. 5, 1668-74

Yan, B.; Matoney, L. (1999) Human carboxylesterases in term placentae. *Placenta* 20, 599

Zollner, H. (1999) *Handbook of enzyme inhibitors*. Wiley-VCH Weinheim New York, 3rd revised and enlarged edition, 324 ff., 557 f., 1051 ff., 2021-25, 2747

Anhang

I Eigenschaften und Verwendung von ausgewählten Carbonsäureestern

Tab. 27: Organoleptische Eigenschaften, Vorkommen und Verwendung von Carbonsäureestern in Lebensmitteln

Ethylpropionat

Organoleptik

süß, fruchtig, etherisch, aromatisch (Mosciano, 1998; Sigma-Aldrich 2001-02, S. 43; Geruch erinnert an Rum und Ananas (Fenaroli 1995, S. 265)

Status

ADI von 1 mg /kg (COE 1974 No. 402, p. 207; FEMA No. 2456; Myers, 1988)

Vorkommen [mg /kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 370)

Apfelsaft (0,01 - 0,4), Armagnac (0,8 – 46), Arrack (2), Bergpapaya/Carica pubescens (< 0,01), Bier (0,01 - 1,0), Bourbon Whisky (0,8 - 1,0), Cider/Apfelwein (0,2), Cognac (0,3 – 40), Erdbeere/Fragaria species (0,01 - 0,1), Grapefruit Schalenöl (Spuren), Guave /Psidium guajava L. (< 0,01 - 0,05), Irish Whisky (0,06 - 0,8), Kanadischer Whisky (0,04 - 0,8), Kiwifrukt/Actinidia chinensis Planch. (0,008 - 0,1), Malt Whisky (1 - 4,4), Mandarinensaft/C. reticulata (Spuren), Miesmuschel (0,14), Parmesan (< 0,01), Passionsfruchtsaft/purpurrot (< 0,1), Rotwein (Spuren – 20), Rum (Kategorie 2)⁷ (50), Scotch Blended Whisky (0,4 – 6), Sherry (0,27), Sparkling Wein/Schaumwein (0,5 - 2,5), Tomate (1,6 - 2,3), Weinbrand (0,4 – 79), Weißwein (0 - 0,9)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 265)

Backwaren (84,72), Fette, Öle (0,10), Tiefgekühlte Milchprodukte (49,47), Fleischwaren (1,5), Weichbonbon (53,52), Gelatine, Pudding (33,66), Alkoholfreie Getränke (19,92), Alkoholische Getränke (83,47), Soßen (4,00), Hartbonbon (77,04), Kaugummi (678,7)

Ethylvalerat

Organoleptik

fruchtig, apfelartig (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 44; Fenaroli 1995, S. 272), Primärgeschmack: bittersüß; Aromatyp: Apfel, Banane (Fenaroli 1995, S. 805)

Status

(COE 1974 No. p. ; FEMA No. 2462)

Vorkommen [mg/kg]

(IVO-TNO 1991, S. 351)

Apfelsaft (Spuren), (Bergpapaya/Carica pubescens (< 0,01), Guave/Psidium guajava L. (< 0,01), Kiwifrukt/Actinidia chinensis/lanch. (Spuren), Parmesan (0,01 - 0,05), Passionsfruchtsaft/purpurrot (< 0,1), Portwein (Spuren), Rotwein (5,0 - 10,0), Rum/Kategorie 2 (40), Weinbrand (0,1), Weißwein (1,3)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 272)

Backwaren (39,71), Tiefgekühlte Milchprodukte (14,03), Weichbonbon (29,63), Gelatine, Pudding (13,64) Alkoholfreie Getränke (7,99), Alkoholische Getränke (3,93), Hartbonbon (16,95), Kaugummi (103,1)

⁷Rum (Kategorie 2): total volatiles 1100-3600 ppm

Fortsetzung Tab. 27

Ethylisovalerat**Organoleptik**

streng, fruchtig, an Apfel erinnernd in Verbindung mit süßem Geschmack (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 40; Fenaroli 1995, S. 243), Primärgeschmack: süß; Aromatyp: Apfel (Fenaroli 1995, S. 805)

Status

Level8 von 30 mg /kg (COE 1974, No. 442, p. 216; FEMA No. 2463)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 228)

Apfelsaft (0,9 - 3,5), Ananas/Ananas comosus (0,4), Bergpapaya/Carica pubescens (< 0,01), Bier (0,01), Cider/Apfelwein) (4), Cognac (0,1), Erdbeere/Fragaria species (0,01 - 0,3), Heidelbeere/Vaccinium myrtillus L. (0,001 - 0,06), Mango/roh (0 - 0,01), Miesmuschel (0,07), Orangensaft/C. sinensis L. Osbeck (0,01), Parmesan (0,01 - 0,05), Portwein (Spuren), Rotwein (0,01 - 0,11), Rum/(Kategorie 2 (2,5), Sherry (0,29), Sparkling Wein/Schaumwein (0,01 - 0,16), Weinbrand (0,2 - 0,8), Weißwein (0,01 - 0,06)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 243)

Backwaren (80,0), Frühstückscerealien (0,022), Milchprodukte (1,0), Käse (13), Tiefgefrorene Milchprodukte (13,0), Fruchtsaft (10), Fruchteis (25), Fleischwaren (0,10), Weichbonbon (100), Zuckerwaren, Zuckerglasur (25), Marmelade (100,0), Gelatine, Pudding (50,0), Snacks (2,0), Alkoholfreie Getränke (97), Alkoholische Getränke (3,3), Hartbonbon (13,08), Kaugummi (98,0), Gewürze (30)

Ethylheptanoat**Organoleptik**

weinartig, fruchtig, Geruch und Geschmack erinnern an Cognac (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 39; Fenaroli 1995, S. 234)

Status

ADI von 1 mg /kg (COE 1974 No. 365, p. 202; FEMA No. 2437)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 289)

Apfel, roh (0,05), Bier (0,03), Birnenbrandy (Spuren), Bourbon Whisky (< 0,8), Cognac (0,04), Grapefruitsaft/C. paradisi (0,001), Irish Whisky (0 - 0,8), Malt Whisky (< 0,8), Parmesan (< 0,01), Passionsfruchtsaft/purpurrot (< 0,1), Portwein (Spuren), Rum/Kategorie 2 (2,5), Scotch Blended Whisky (< 0,8), Weinbrand (0 - 1,2)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 234)

Backwaren (41,74), Käse (13,07), Tiefgekühlte Milchprodukte (29,84), Weichbonbon (37,60), Gelatine, Pudding (52,41), Alkoholfreie Getränke (13,81), Alkoholische Getränke (13,96), Hartbonbon (814,62), (Kaugummi (248,4)

Ethylundecanoat**Organoleptik**

Geruch und Geschmack erinnern an Cognac und Kokosnuss (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 42; Fenaroli 1995, S. 271)

Status

(COE 1974 No. p. ; FEMA No. 3492)

Vorkommen

(CIVO-TNO 1991, S. 413)

Bourbon Whisky (0,8), Malt Whisky (< 0,8), Scotch Blended Whisky (< 0,8), Rum/Kategorie 3)9 (0,1),

Verwendung

(Fenaroli 1995, S. 271)

Alkoholfreie Getränke (2,0), Tiefkühl-desserts (8,0), Zuckerwaren, Zuckerglasur (16,00), Alkoholische Getränke (8,0)

8 Level, that may be added to foodstuffs without hazard to public health

⁹ Rum (Kategorie 3): total volatiles 240-1100 ppm

Fortsetzung Tab. 27

Ethylmyristat

Organoleptik

mild wachsig, seifig (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 44), Geruch erinnert an Schwertlilie (Fenaroli 1995, S. 256)

Status

Level¹⁰ von 30 mg /kg (COE 1974, No. 385, p. 205; FEMA No. 2445)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 400)

Armagnac (0,8), Bergpapaya/Carica pubescens (< 0,01), Birnenbrandy (Spuren), Bourbon Whisky (0,8 – 7,8), Brombeerbrandy (0,7), Cognac (0,2 – 6), Guave/Psidium guajava L. (0,0004 - 0,14), Irish Whisky (0,14 – 2,6), Japanischer Whisky (Spuren - 1,5), Kanadischer Whisky (0,3 – 0,8), Kokosnuss/Cocos nucifera L. (< 0,1), Malt Whisky (0,3 – 3,7), Mango/roh (0 - 0,25), Muscat Traube (0,1 – 0,6), Ouzo (0 - 0,04), Parmesan (< 0,01), Portwein (Spuren), Rum (Kategorie 1)¹¹ (1,0 – 6,0), Rum/Kategorie 2 (1,0 - 2,0), Rum/Kategorie 3 (Spuren - 0,9), Scotch Blended Whisky (0,6 – 5,2), Sparkling Wein/Schaumwein (0,2 – 18), Weinbrand (0,09 – 1,2)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 256)

Backwaren (154,8), Tiefgekühlte Milchprodukte (195,1), Weichbonbon (156,1), Gelatine, Pudding (157,5), Alkoholfreie Getränke (52,52), Alkoholische Getränke (30,00), Hartbonbon (28,78), Kaugummi (0,56)

Ethyltiglat

Organoleptik

fruchtig, caramelartig (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 44)

Status

empfohlenen Maximalkonzentration in Verbraucherzeugnissen von 0,5 % (Ford, 1988), (COE 1981 No. 2185 p. 274; FEMA No. 2460)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 235)

Naranzilla Frucht (k. A.), (Solanum quitoense Lam. (k. A.), Sternfrucht (k. A.), (Averrhoa carambola L. (k.A.)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 271)

Backwaren (35,00), Tiefgekühlte Milchprodukte (9,90), Weichbonbon (25,00), Gelatine, Pudding (15,00), Alkoholfreie Getränke (7,00), Hartbonbon (0,84), Kaugummi (0,64)

Benzyltiglat

Organoleptik

pilzartiger Geruch mit rosenartigem Unterton (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 12)

Status

(FEMA No. 3330)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 235)

Gewürznelke /Eugenia caryophyllata Thunberg (Spuren)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 66)

Backwaren (8), Speisewürze (8)

¹⁰ Level, that may be added to foodstuffs without hazard to public health

¹¹ Rum (Kategorie 1): total volatiles > 3600 ppm

Fortsetzung Tab. 27

Benzylsalicylat

Organoleptik

schwach süßer Geruch (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 12), Primärgeschmack: süß; Aromatyp: Himbeere (Fenaroli 1995, S. 803)

Status

(FEMA No. 2151)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 216)

Amerikanische Preiselbeere/. macrocarpon (k. A.), Gewürznelke/ Eugenia caryophyllata Thunberg (k. A.), Pfefferminzöl/Mentha piperita (k. A.)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 66)

Backwaren (16,02), Tiefgekühlte Milchprodukte (4,12), Weichbonbon (6,15), Gelatine/Pudding (17,51), Alkoholfreie Getränke (2,70)

Benzylphenylacetat

Organoleptik

süßer, blumiger (Jasmin, Rose) Geruch, leicht honigartiger Geschmack, (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 12; Fenaroli 1995, S. 64)

Status

(FEMA No. 2149)

Vorkommen [mg/kg]

unbekannt

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 64)

Backwaren (14,82), Fette, Öle (0,109), Tiefgekühlte Milchprodukte (12,039), Weichbonbon (18,99), Gelatine, Pudding (14,699), Alkoholfreie Getränke (4,249), Alkoholische Getränke (3,00), Kaugummi (7,49)

Ethylphenylacetat

Organoleptik

Geruch angenehm, streng, süß, an Honig erinnernd, bittersüßer Geschmack, (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 43; Fenaroli 1995, S. 263), Primärgeschmack: bittersüß; Aromatyp: Honig (Fenaroli 1995, S. 805)

Status

(COE 1970 No. 169 p. 101; FEMA No. 2452)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 197)

Grapefruitsaft/C. paradisis (0,003), Armagnac (< 0,8), Bergpapaya/Carica pubescens (< 0,01), Birnenbrandy (Spuren), Botrytisierter Wein/Trockenbeerenauslese (0,01), Cider/Äpfelwein (0,02), Cognac (0,02 - 0,8), Guave/Psidium guajava L. (0,01 - 0,25), Kakao (0,1), Papaya/Carica papaya (0,002), Portwein (0,2 - 2), Rotwein (Spuren - 0,02), Weinbrand (0 - 0,8), Weißwein (Spuren - 0,01)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 263)

Backwaren (18,57), Tiefgekühlte Milchprodukte (9,84), Weichbonbon (13,53), Gelatine, Pudding (12,62), Alkoholfreie Getränke (5,20), Alkoholische Getränke (5,00), Hartbonbon (20,32)

Fortsetzung Tab. 27

Ethylcinnamat**Organoleptik**

süß, honigartig, balsamisch, pflaumenartig, zimtartig (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 37), Primärgeschmack: süß; Aromatyp: Aprikose, Pfirsich (Fenaroli 1995, S. 805)

Status

(FEMA No. 2430)

Vorkommen

(CIVO-TNO 1991, S. 242)

Bier (< 0,01), Erdbeere/Fragaria species (0,02 - 0,05), Gewürznelke (Spuren), Kakao (Spuren - 1,1), Rotwein (0 - 0,008), Weißwein (0,06)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 222)

Backwaren (54,36), Tiefgekühlte Milchprodukte (41,26), Fleischwaren (20,00), Zuckerwaren/Zuckerglasur (20,00), Weichbonbon (47,95), Gelatine/Pudding (19,73), Alkoholfreie Getränke (20,88), Alkoholische Getränke (31,61), Kaugummi (9,82)

Methyloctanoat**Organoleptik**

grün, fruchtig (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 84) Geruch kraftvoll, weinartig, fruchtig, nach Orange; ölig und nach Orange schmeckend (Fenaroli 1995, S. 534)

Status

(FEMA No. 2728)

Vorkommen [mg/kg]

(CIVO-TNO 1991, S. 340)

Apfel/roh (0,002), Gewürznelke (Spuren), Ananas/Ananas comosus (0,8), Bergpapaya/Carica pubescens (0,3 - 0,8), Birnenbrandy (Spuren), Cider/Apfelwein (0,02), Erdbeere/Fragaria species (0,01 - 0,1), Guave/Psidium guajava L. (0,05 - 1,25), Kohlrabi (Spuren), Kokosnuß/Cocos nucifera L. (0,1), Miesmuschel (0,14), Papaya/Carica papaya (0,0002), Parmesan (< 0,01), Portwein (Spuren) Rum/Kategorie 2 (0,1), Schwarzer Tee (3,0 - 8,09), Weinbrand (0 - 0,3)

Verwendung [mg/kg]

(Fenaroli 1995, S. 534)

Backwaren (34,12), Tiefgekühlte Milchprodukte (20,46), Weichbonbon (25,13), Gelatine, Pudding (21,48), Alkoholfreie Getränke (6,94), Alkoholische Getränke (1,00)

Isoamylbutyrat**Organoleptik**

fruchtig, aprikosenartig, nach Ananas, Banane (Sigma-Aldrich 2001-02, S. 61) strenger, charakteristischer, fruchtiger (birnenartig) Geruch; süß (Fenaroli 1995, S. 377)

Status

(FEMA No. 2060)

Vorkommen

(CIVO-TNO 1991, S. 340)

Apfel /roh (0,003), Bergpapaya/Carica pubescens (0,01 - 0,05), Erdbeere/Fragaria species (0,01 - 0,05), Guave/Psidium guajava L. (0,01 - 0,25), Kumquat Schalenöl/Fortunella species (60), Mango/roh (0 - 0,05), Muscat Traube (0,1), Parmesan (< 0,01), Rum/Kategorie 2 (1,5), Tomate (0,2)

Anwendung

(Fenaroli 1995, S. 377)

Backwaren (36,02), Tiefgekühlte Milchprodukte (25,20), Weichbonbon (24,44), Gelatine/Pudding (25,91), Alkoholfreie Getränke (69,24), Alkoholische Getränke (20,00), Hartbonbon (42,14), Kaugummi (376,7)

Tab. 28: Verwendung von ausgewählten Carbonsäureestern in kosmetischen Mitteln

Konzentrationen [%] Mittelwert (Maximum)					
Substanz	Seife	Detergenzien	Cremes /Lotions	Parfum	Referenz
Ethylpropionat	0,01 (0,01)	0,001 (0,01)	0,005 (0,03)	0,08 (0,4)	<ul style="list-style-type: none"> • COE (1974) No. 402, p. 207 • FEMA (1965) No. 2456 • Opdyke (1978), S. 749
Ethylisovalerat	0,01 (0,06)	0,001 (0,006)	0,005 (0,02)	0,08 (0,2)	<ul style="list-style-type: none"> • COE (19784) No. 442, S. 216 • FEMA (1965) No. 2463 • Opdyke (1978), S. 743
Ethylheptanoat	0,005 (0,05)	0,001 (0,01)	0,003 (0,02)	0,04 (0,4)	<ul style="list-style-type: none"> • COE (1974) No. 365, p. 202 • FEMA (1965) No. 2437 • Opdyke (1981), S. 247
Ethylmyristat	0,03 (0,3)	0,003 (0,03)	0,015 (0,1)	0,2 (1,2)	<ul style="list-style-type: none"> • COE (1974) No. 385, S. 205 • FEMA (1965) No. 2445 • Opdyke (1978), S. 745
Ethylphenylacetat	0,05 (0,2)	0,005 (0,02)	0,01 (0,05)	0,2 (0,8)	<ul style="list-style-type: none"> • COE (1970) No. 169, p. 101 • FEMA (1965) No. 2452 • Opdyke (1975)

II Messdaten und Validierungsparameter GC-Analytik

Tab. 29: Messdaten - Ethylester

Konzentration [10^{-6} mol/L]							
Substrat / Analyt		Ethylpropionat / Propionsäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
4	40.0 ± 8.2	45.8 ± 4.1	48.6 ± 0.9	69.0 ± 4.9	84.0 ± 14.5	85.0 ± 11.8	111.2 ± 7.4
8	64.4 ± 3.1	87.2 ± 2.1	105.6 ± 13.2	129.1 ± 8.3	144.5 ± 13.3	169.8 ± 4.9	211.6 ± 5.5
12	95.7 ± 8.7	124.2 ± 15.3	164.1 ± 6.7	184.4 ± 6.8	200.8 ± 22.2	234.5 ± 10.3	291.3 ± 12.6
16	112.6 ± 3.9	165.9 ± 3.1	193.5 ± 26.8	233.3 ± 3.4	288.7 ± 37.1	313.8 ± 6.3	368.3 ± 10.5
20	127.4 ± 6.2	184.0 ± 9.1	246.7 ± 6.0	283.7 ± 7.9	340.4 ± 24.6	369.5 ± 8.7	452.2 ± 11.3
NWG Analyt / BG Analyt: 2.60 μ M / 7.80 μ M							
Substrat / Analyt		Ethylvalerat / Valeriansäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
2	34.2 ± 7.9	42.4 ± 4.5	53.9 ± 7.0	65.5 ± 10.4	66.0 ± 8.3	70.5 ± 8.5	77.7 ± 6.5
4	63.0 ± 7.1	83.7 ± 10.9	104.5 ± 3.8	117.0 ± 3.3	125.7 ± 4.6	131.7 ± 7.0	178.2 ± 38.8
6	85.7 ± 14.7	125.6 ± 3.0	153.6 ± 11.9	175.4 ± 4.4	197.7 ± 10.5	210.8 ± 4.0	223.1 ± 10.6
8	107.2 ± 12.4	168.1 ± 17.9	204.5 ± 11.8	232.4 ± 6.9	248.8 ± 10.5	275.6 ± 8.8	316.5 ± 28.6
10	130.5 ± 6.6	207.0 ± 13.0	249.5 ± 10.7	302.7 ± 17.8	308.0 ± 7.5	343.1 ± 14.9	403.6 ± 17.5
NWG Analyt / BG Analyt: 4.83 μ M / 14.49 μ M							
Substrat / Analyt		Ethylheptanoat / Heptansäure / Plasma-Pool: (h) 014.704					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
4	14.6 ± 3.4	19.7 ± 6.2	22.6 ± 6.1	36.2 ± 9.5	28.5 ± 4.0	35.2 ± 6.0	40.3 ± 4.7
8	27.4 ± 10.2	32.5 ± 14.2	50.4 ± 4.9	58.5 ± 3.3	52.9 ± 5.7	68.2 ± 13.1	79.8 ± 4.8
12	35.4 ± 17.2	56.8 ± 6.8	59.4 ± 26.2	89.5 ± 9.3	81.5 ± 6.1	111.2 ± 12.8	128.4 ± 32.3
16	56.9 ± 17.2	75.0 ± 13.1	91.6 ± 6.6	108.2 ± 10.2	115.2 ± 6.2	152.6 ± 0.9	182.6 ± 15.3
20	68.2 ± 8.0	97.5 ± 15.1	111.4 ± 14.6	154.7 ± 14.4	151.8 ± 12.6	190.4 ± 8.2	240.9 ± 12.8
NWG Analyt / BG Analyt: 0.62 μ M / 1.87 μ M							
Substrat / Analyt		Ethylundecanoat / Undecansäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
10	< 1.55	< 1.55	12.9 ± 3.9	16.6 ± 1.1	16.7 ± 0.8	14.9 ± 1.7	23.4 ± 6.1
20	< 1.55	24.4 ± 5.9	26.0 ± 6.9	30.6 ± 7.5	32.4 ± 6.0	40.1 ± 13.4	44.3 ± 6.0
30	26.7 ± 11.3	36.8 ± 8.9	36.5 ± 5.3	37.1 ± 6.4	57.8 ± 3.0	69.2 ± 9.9	75.5 ± 24.6
40	33.2 ± 3.8	55.3 ± 11.4	56.4 ± 9.5	76.3 ± 10.9	76.0 ± 4.6	101.2 ± 19.0	106.3 ± 54.1
50	51.5 ± 5.1	89.4 ± 7.6	92.8 ± 15.3	97.1 ± 24.8	122.6 ± 11.3	141.2 ± 22.6	106.4 ± 29.8
NWG Analyt / BG Analyt: 1.55 μ M / 4.65 μ M							
Konzentration [10^{-6} mol/L]							
Substrat / Analyt		Ethylmyristat / Myristinsäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
10	19.7 ± 7.2	< 1.42	14.0 ± 2.9	< 1.42	15.8 ± 1.6	14.4 ± 1.4	< 1.42
20	14.4 ± 3.1	< 1.42	32.3 ± 25.1	14.4 ± 1.5	15.7 ± 2.6	27.8 ± 12.8	18.8 ± 1.1
30	17.2 ± 3.2	17.9 ± 2.8	28.7 ± 16.9	17.8 ± 3.6	17.8 ± 2.4	17.1 ± 1.6	17.8 ± 3.8
40	19.6 ± 0.6	16.4 ± 1.0	17.7 ± 0.8	16.8 ± 1.2	18.3 ± 2.9	17.4 ± 1.8	24.4 ± 3.6
50	21.4 ± 6.1	21.0 ± 4.3	15.3 ± 3.4	18.1 ± 1.6	17.3 ± 2.2	20.3 ± 6.4	26.0 ± 6.8
NWG Analyt / BG Analyt: 1.42 μ M / 4.26 μ M							

vorbehaltlich anderer Angaben gilt für alle Ergebnisse: n = 4; Verdünnungsfaktoren berücksichtigt

Fortsetzung Tab. 29

Konzentration [10^{-6} mol /L]							
Substrat / Analyt		Ethylisovalerat / Isovaleriansäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
5	28.5 ± 5.9	30.4 ± 2.1	39.1 ± 3.3	39.3 ± 5.2	43.1 ± 1.5	45.0 ± 4.2	53.8 ± 4.1
10	44.1 ± 4.4	43.2 ± 9.7	65.2 ± 1.8	68.8 ± 7.6	72.3 ± 2.4	68.0 ± 4.1	74.6 ± 6.2
15	62.5 ± 5.5	71.8 ± 6.6	84.9 ± 5.1	93.4 ± 6.2	133.5 ± 72.9	92.7 ± 4.9	96.8 ± 10.8
20	75.9 ± 10.5	97.2 ± 9.1	111.8 ± 4.8	121.6 ± 13.6	130.9 ± 11.2	118.2 ± 5.3	130.6 ± 4.9
25	96.4 ± 10.6	116.1 ± 12.8	144.6 ± 8.4	103.8 ± 42.1	151.2 ± 12.4	143.3 ± 10.2	164.1 ± 9.4
NWG Analyt / BG Analyt: 2.05 µM / 6.15 µM							
Substrat / Analyt		Ethyltiglat / Tiglinsäure / Plasma-Pool: (h) 014.704					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
10	15.2 ± 5.6	< 0.90	< 0.90	15.5 ± 1.5	21.7 ± 3.2	18.4 ± 2.2	20.9 ± 2.1
20	20.5 ± 1.5	16.8 ± 5.0	23.1 ± 5.3	22.7 ± 1.8	25.3 ± 2.1	27.9 ± 1.3	28.2 ± 1.4
30	32.4 ± 3.9	23.2 ± 4.3	32.8 ± 8.6	34.1 ± 3.2	35.9 ± 2.8	39.3 ± 1.2	43.8 ± 2.2
40	43.6 ± 1.8	31.2 ± 2.9	39.9 ± 15.7	43.7 ± 2.3	45.0 ± 1.3	48.2 ± 2.6	52.9 ± 1.2
50	55.6 ± 2.3	36.0 ± 3.5	53.5 ± 18.8	51.5 ± 0.8	49.5 ± 4.2	59.1 ± 1.9	65.6 ± 2.5
NWG Analyt / BG Analyt: 0.90 µM / 2.70 µM							
Substrat / Analyt		Ethylphenylacetat / Phenylelessigsäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
5	43.3 ± 2.4	63.4 ± 6.3	70.3 ± 12.4	96.5 ± 3.5	101.1 ± 18.3	126.7 ± 13.4	246.4 ± 3.7
10	66.1 ± 6.1	103.1 ± 2.2	120.0 ± 6.3	182.5 ± 5.3	181.0 ± 35.1	247.5 ± 19.8	364.9 ± 15.3
15	87.9 ± 4.4	142.5 ± 2.6	176.1 ± 4.8	264.7 ± 6.8	276.8 ± 19.5	369.8 ± 23.6	541.6 ± 12.8
20	102.7 ± 5.3	165.9 ± 14.2	242.7 ± 15.9	339.5 ± 20.8	374.1 ± 27.6	510.6 ± 16.6	738.3 ± 65.9
25	123.6 ± 8.4	231.2 ± 2.5	318.9 ± 4.9	423.2 ± 20.5	487.0 ± 35.2	626.9 ± 39.8	931.0 ± 56.9
NWG Analyt / BG Analyt: 1.78 µM / 5.34 µM							
Substrat / Analyt		Ethylsalicylat / Salicylsäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
20	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1
40	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1
60	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1
80	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1
100	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1	< 12.1
NWG Analyt / BG Analyt: 12.1 µM / 36.3 µM							
Substrat / Analyt		Ethylcinnamat / Zimtsäuresäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
20	< 6.40	< 6.40	< 6.40	< 6.40	< 6.40	30.3 ± 1.1	34.9 ± 1.8
40	< 6.40	39.4 ± 5.0	45.5 ± 6.4	49.7 ± 6.2	49.0 ± 2.7	48.2 ± 3.0	44.0 ± 3.0
60	42.4 ± 6.8	60.8 ± 9.2	57.1 ± 6.0	62.0 ± 3.8	59.6 ± 8.3	63.9 ± 3.3	59.2 ± 5.4
80	55.6 ± 8.6	72.8 ± 7.6	70.0 ± 9.7	79.7 ± 5.4	78.1 ± 8.7	79.0 ± 3.6	74.6 ± 7.2
100	65.2 ± 4.3	69.6 ± 5.3	90.2 ± 7.6	99.8 ± 3.0	98.8 ± 12.8	89.5 ± 4.4	93.3 ± 7.0
NWG Analyt / BG Analyt: 6.4 µM / 19.2 µM							

vorbehaltlich anderer Angaben gilt für alle Ergebnisse: n = 4; Verdünnungsfaktoren berücksichtigt

Tab. 30: Messdaten - Benzylester

Konzentration [10^{-6} mol /L]							
Substrat / Analyt	Benzyltiglat / Benzylalkohol / Plasma-Pool: (h) 020.504						
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
10	25.5 ± 15.8	38.9 ± 4.8	50.4 ± 3.2	50.6 ± 8.9	81.2 ± 6.9	86.8 ± 3.4	174.1 ± 29.0
20	29.2 ± 5.0	70.3 ± 5.4	86.0 ± 7.7	102.6 ± 4.2	151.0 ± 10.5	168.3 ± 1.3	300.4 ± 21.3
30	37.5 ± 3.3	89.0 ± 8.0	129.2 ± 7.1	158.4 ± 5.6	218.8 ± 4.8	254.3 ± 12.1	448.0 ± 33.0
40	49.3 ± 4.0	126.5 ± 2.0	169.7 ± 8.9	218.5 ± 10.8	291.2 ± 10.6	342.1 ± 4.4	595.7 ± 50.2
50	68.0 ± 8.9	155.4 ± 3.4	220.5 ± 8.7	271.3 ± 9.1	361.8 ± 4.0	444.1 ± 10.9	727.3 ± 38.9
NWG Analyt / BG Analyt: 0.60 μ M / 1.80 μ M							
Substrat / Analyt	Benzyltiglat / Tiglinsäure / Plasma-Pool: (h) 020.504						
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
10	42.1 ± 33.3	26.8 ± 3.5	29.7 ± 2.0	37.3 ± 4.9	52.2 ± 9.1	50.5 ± 2.9	115.6 ± 21.8
20	35.3 ± 20.0	54.2 ± 4.1	60.3 ± 4.5	77.1 ± 5.2	123.0 ± 10.4	124.2 ± 1.2	232.9 ± 19.5
30	29.8 ± 1.4	77.7 ± 11.1	107.0 ± 6.6	135.5 ± 2.9	192.1 ± 8.6	208.5 ± 9.3	381.7 ± 27.3
40	43.0 ± 5.6	110.7 ± 0.9	157.4 ± 1.8	189.6 ± 8.2	258.3 ± 13.2	301.2 ± 11.2	513.0 ± 40.9
50	47.9 ± 4.8	140.9 ± 3.8	199.9 ± 5.2	249.3 ± 14.6	327.3 ± 5.8	397.1 ± 14.8	659.2 ± 31.9
NWG Analyt / BG Analyt: 0.90 μ M / 2.70 μ M							
Substrat / Analyt	Benzylphenylacetat / Benzylalkohol / Plasma-Pool: (h) 014.704						
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
0.5	42.0 ± 9.7	91.5 ± 25.8	84.2 ± 15.4	96.9 ± 33.0	93.5 ± 22.9	147.6 ± 76.6	169.5 ± 35.7
1.0	82.7 ± 3.2	168.1 ± 24.3	233.4 ± 119.9	225.4 ± 61.6	262.9 ± 85.0	296.7 ± 142.4	307.6 ± 41.3
2.0	138.0 ± 12.3	271.7 ± 39.6	376.8 ± 80.4	393.9 ± 63.6	441.7 ± 88.3	825.6 ± 290.2	657.4 ± 15.1
3.0	190.2 ± 3.8	328.7 ± 56.4	494.8 ± 53.4	661.4 ± 63.5	718.7 ± 46.7	1012 ± 223	1003 ± 273
4.0	216.6 ± 12.9	409.5 ± 38.2	581.1 ± 46.3	702.7 ± 69.8	811.6 ± 74.4	1122 ± 188	1303 ± 140
NWG Analyt / BG Analyt: 0.60 μ M / 1.80 μ M							
Substrat / Analyt	Benzylsalicylat / Benzylalkohol / Plasma-Pool: (h) 014.704						
t [min]	$S_0 = 0.25$ mM	$S_0 = 0.50$ mM	$S_0 = 0.75$ mM	$S_0 = 1.00$ mM	$S_0 = 1.25$ mM	$S_0 = 1.75$ mM	$S_0 = 2.50$ mM
10	7.8 ± 2.0	13.2 ± 3.1	14.0 ± 5.4	17.1 ± 4.1	21.8 ± 3.9	28.6 ± 10.3	59.6 ± 13.5
20	18.0 ± 7.4	33.0 ± 6.5	36.9 ± 11.9	40.6 ± 5.9	62.9 ± 6.2	50.5 ± 37.8	133.6 ± 14.5
30	24.7 ± 3.6	48.4 ± 10.8	61.6 ± 3.8	66.6 ± 13.6	98.5 ± 26.9	89.7 ± 32.3	180.3 ± 15.4
40	30.9 ± 3.9	77.1 ± 16.3	92.8 ± 11.1	119.6 ± 17.5	143.7 ± 65.1	160.9 ± 74.4	229.9 ± 37.2
50	44.8 ± 6.6	102.4 ± 11.3	120.7 ± 8.9	162.1 ± 34.8	197.5 ± 23.4	233.0 ± 13.3	292.6 ± 40.7
NWG Analyt / BG Analyt: 0.60 μ M / 1.80 μ M							

vorbehaltlich anderer Angaben gilt für alle Ergebnisse: n = 4; Verdünnungsfaktoren berücksichtigt

Tab. 31: Messdaten – Methyloctanoat, Isoamylbutyrat, Phenylacetat

Konzentration [10^{-6} mol /L]							
Substrat / Analyt		Methyloctanoat / Octansäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	S ₀ = 0.25 mM	S ₀ = 0.50 mM	S ₀ = 0.75 mM	S ₀ = 1.00 mM	S ₀ = 1.25 mM	S ₀ = 1.75 mM	S ₀ = 2.50 mM
4.0	13.7 ± 5.3	9.2 ± 1.2	10.2 ± 1.5	10.9 ± 1.7	14.4 ± 3.6	23.6 ± 8.5	32.9 ± 7.1
8.0	25.4 ± 7.7	18.5 ± 6.1	16.6 ± 4.5	20.8 ± 5.2	24.9 ± 5.2	44.3 ± 17.6	51.6 ± 8.3
12.0	37.1 ± 3.8	24.6 ± 2.9	29.0 ± 3.7	35.0 ± 3.4	39.2 ± 2.8	62.5 ± 17.0	89.7 ± 18.7
16.0	52.0 ± 4.5	33.5 ± 3.7	39.6 ± 6.4	46.3 ± 2.6	60.6 ± 5.7	93.0 ± 7.8	117.9 ± 116
20.0	65.5 ± 7.0	44.7 ± 4.5	59.6 ± 12.7	63.5 ± 4.5	76.3 ± 9.4	118.9 ± 22.2	174.8 ± 40.2
NWG Analyt / BG Analyt: 1.22 µM / 3.66 µM							
Substrat / Analyt		Isoamylbutyrat / Buttersäure / Plasma-Pool: (h) 020.504					
t [min]	S ₀ = 0.25 mM	S ₀ = 0.50 mM	S ₀ = 0.75 mM	S ₀ = 1.00 mM	S ₀ = 1.25 mM	S ₀ = 1.75 mM	S ₀ = 2.50 mM
0.5	71.6 ± 9.1	102.1 ± 24.0	71.6 ± 10.7	103.9 ± 22.2	125.5 ± 58.8	164.1 ± 25.3	213.5 ± 19.0
1.0	123.9 ± 6.2	204.6 ± 23.7	145.8 ± 23.5	209.0 ± 29.7	215.9 ± 17.4	369.5 ± 38.0	421.5 ± 62.2
2.0	183.7 ± 8.9	303.8 ± 17.1	254.1 ± 24.7	378.0 ± 28.7	429.1 ± 25.5	687.8 ± 78.9	855.0 ± 109.3
3.0	224.5 ± 1.4	427.1 ± 25.1	396.2 ± 44.1	573.2 ± 37.5	643.3 ± 35.3	1057 ± 33	1235 ± 149
4.0	245.8 ± 4.5	458.4 ± 15.6	521.1 ± 62.6	692.5 ± 39.4	877.6 ± 31.4	1302 ± 42	1633 ± 93
NWG Analyt / BG Analyt: 1.80 µM / 5.40 µM							
Substrat / Analyt		Phenylacetat / Phenylacetat / Plasma-Pool: (h) 014.704 (1:100 verdünnt)					
t [min]	S ₀ = 0.25 mM	S ₀ = 0.50 mM	S ₀ = 1.00 mM	S ₀ = 2.00 mM	S ₀ = 3.00 mM	S ₀ = 4.00 mM	
0.5	84.5 ± 8.7	190.8 ± 13.8	185.2 ± 23.6	841.2 ± 109.6	1238 ± 197	1716 ± 213	
1.0	62.9 ± 15.8	150.3 ± 25.1	148.8 ± 23.1	712.6 ± 59.4	1104 ± 147	1709 ± 261	
2.0	37.2 ± 13.1	83.8 ± 26.4	88.1 ± 15.2	451.5 ± 24.5	804 ± 89	1378 ± 76	
3.0	23.0 ± 11.8	48.5 ± 20.8	51.6 ± 14.1	320.0 ± 71.5	510 ± 239	1068 ± 194	
4.0	15.1 ± 9.7	35.9 ± 16.4	28.6 ± 7.8	231.7 ± 47.5	247 ± 39	910 ± 106	
NWG Analyt / BG Analyt: 1.03 µM / 3.08 µM							

vorbehaltlich anderer Angaben gilt für alle Ergebnisse: n = 4; Verdünnungsfaktoren berücksichtigt

Tab. 32: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der gaschromatographischen Analyse

GC-Säule	Analyt	s_v [10^{-6} g /L]	NWG / BG [10^{-6} mol /L]	GC-Säule (vgl. 8.2.3)	Analyt	s_v [10^{-6} g /L]	NWG / BG [10^{-6} mol /L]	BW [10^{-6} mol /L]
MN FFAP	Buttersäure	k. A.	1.80 / 5.40		Ethylpropionat	k. A.	2.22 / 6.66	< 2.22
	Propionsäure	k. A.	2.60 / 7.80		Ethylvalerat	k. A.	1.32 / 3.97	< 1.32
	Valeriansäure	k. A.	4.83 / 14.49		Ethylisovalerat	k. A.	1.31 / 3.94	< 1.31
	Isovaleriansäure	k. A.	2.05 / 6.15		Ethyltiglat	225.7	2.70 / 8.09	< 2.70
	Heptansäure	52.9	0.62 / 1.87		Phenylacetat	136.5	1.53 / 4.60	< 1.53
	Tiglinsäure	k. A.	0.90 / 2.70					
	Benzylalkohol	43.4	0.60 / 1.80					
MN SE-52	Octansäure	k. A.	1.22 / 3.66		Ethylheptanoat	14.0	0.14 / 0.41	< 0.14
	Undecansäure	k. A.	1.55 / 4.65		Ethylundecanoat	k. A.	0.07 / 0.21	< 0.07
	Myristinsäure	k. A.	1.42 / 4.26		Ethylmyristat	0.84	0.005 / 0.015	< 0.005
	Salicylsäure	k. A.	12.1 / 36.3		Ethylphenyl- acetat	k. A.	2.29 / 6.88	< 2.29
	Phenyllessigsäure	k. A.	1.78 / 5.34		Ethylcinnamat	k. A.	2.00 / 6.00	< 2.00
	Zimtsäure	k. A.	6.4 / 19.2		Ethylsalicylat	k. A.	2.29 / 6.86	< 2.29
					Benzyltiglat	208.6	1.68 / 5.04	< 1.68
					Benzylphenyl- acetat	74.9	0.51 / 1.52	< 0.51
					Benzylsalicylat	149.1	1.00 / 3.00	< 1.00
					Methyloctanoat	1.24	0.012 / 0.036	< 0.012
					Isoamylbutyrat	k. A.	1.02 / 3.06	< 1.02
					Phenylacetat	91.4	1.03 / 3.09	< 1.03

Bestimmungsgrenze berechnet aus der Verfahrenstandardabweichung s_v gemäß vereinfachter Methode nach DIN 32 645 (P = 99 %), n = 10

Blindwert, bestimmt als Nulltoleranz des Esterhydrolyseprodukts (Alkohol und Carbonsäure) in der SubstratstammLösung

Tab. 33: Wiederfindungsrate der Analyten in Humanplasma und Krebs-Henseleit-Puffer in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

Wiederfindungsrate [%] in Abhängigkeit von S ₀ (n = 4)							
Analyt	Extrelut®		Probenahme [min]	hitzeinaktiviertes Blutplasma (pH 7,4)		Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4)	
	0.25 mM	1.00 mM		0.25 mM	1.00 mM	0.25 mM	1.00 mM
Benzylalkohol	102,4 ± 3,2	105,1 ± 2,4	10	99,0 ± 4,3	100,8 ± 6,6	99,4 ± 2,9	101,4 ± 0,9
			20	99,8 ± 3,8	98,6 ± 5,0	101,2 ± 10,7	104,0 ± 2,6
			30	101,8 ± 5,5	108,4 ± 4,0	96,7 ± 3,4	104,4 ± 3,2
			40	104,1 ± 5,3	104,0 ± 3,1	95,6 ± 1,5	104,8 ± 1,4
			50	103,6 ± 5,5	102,2 ± 5,4	92,1 ± 5,4	103,7 ± 1,0
Propionsäure	103,1 ± 2,9	105,3 ± 2,4	4	98,3 ± 3,3	92,1 ± 3,5	99,0 ± 1,1	100,8 ± 3,3
			8	95,7 ± 2,6	93,6 ± 3,8	98,1 ± 3,5	103,0 ± 3,1
			12	91,4 ± 4,4	92,0 ± 1,2	99,0 ± 1,7	103,5 ± 1,8
			16	94,8 ± 3,6	94,6 ± 3,3	95,9 ± 3,4	104,7 ± 3,1
			20	105,9 ± 2,4	94,5 ± 0,8	97,3 ± 2,7	97,9 ± 8,7
Buttersäure	103,5 ± 2,9	102,7 ± 1,5	0,5	99,1 ± 4,6	96,0 ± 4,0	99,6 ± 6,7	96,8 ± 2,2
			1,0	95,6 ± 5,8	96,3 ± 4,1	96,9 ± 10,0	96,0 ± 4,5
			2,0	97,4 ± 5,4	94,4 ± 2,9	102,1 ± 8,5	94,9 ± 3,3
			3,0	96,5 ± 5,1	96,4 ± 5,4	99,9 ± 8,5	96,2 ± 2,6
			4,0	98,9 ± 2,9	97,0 ± 5,1	102,5 ± 7,3	95,6 ± 2,8
Valeriansäure	100,6 ± 3,3	103,8 ± 1,3	2	98,8 ± 3,7	94,4 ± 3,0	103,7 ± 2,8	94,0 ± 2,5
			4	97,7 ± 4,5	96,3 ± 2,6	105,2 ± 2,2	100,3 ± 2,9
			6	94,5 ± 1,8	96,3 ± 0,8	99,6 ± 1,4	101,7 ± 1,0
			8	97,2 ± 1,1	96,7 ± 1,6	99,8 ± 2,5	102,5 ± 3,1
			10	97,7 ± 1,2	100,2 ± 1,1	100,1 ± 1,3	104,1 ± 2,0
Isovaleriansäure	99,3 ± 1,3	102,0 ± 1,4	5	105,5 ± 7,0	104,4 ± 1,6	99,0 ± 5,3	97,7 ± 4,5
			10	99,8 ± 5,1	107,2 ± 1,3	98,6 ± 3,7	96,6 ± 1,4
			15	102,5 ± 5,2	104,4 ± 2,4	98,1 ± 2,7	96,4 ± 3,6
			20	101,6 ± 3,7	104,6 ± 4,4	98,4 ± 3,1	97,9 ± 5,8
			25	106,6 ± 6,1	105,7 ± 3,4	97,2 ± 1,6	99,3 ± 1,4
Heptansäure			4	101,6 ± 2,9	102,0 ± 1,9	105,5 ± 3,9	102,7 ± 5,5
			8	107,3 ± 4,0	102,9 ± 0,8	105,6 ± 5,5	100,2 ± 4,2
			12	108,5 ± 1,5	103,0 ± 1,1	96,6 ± 2,1	98,1 ± 5,1
			16	106,7 ± 2,5	102,8 ± 1,6	103,1 ± 1,9	101,2 ± 0,7
			20	108,3 ± 1,2	104,6 ± 6,2	106,0 ± 2,2	106,0 ± 6,7
Octansäure			2	94,1 ± 4,4	97,8 ± 4,2	98,3 ± 2,4	98,6 ± 2,8
			4	95,3 ± 2,1	99,1 ± 4,4 ±	99,7 ± 3,5	98,4 ± 4,7
			6	95,4 ± 3,2	100,5 ± 5,8	101,1 ± 5,9	100,0 ± 2,8
			8	95,1 ± 3,1	101,3 ± 5,5	97,9 ± 3,9	99,3 ± 4,0
			10	93,6 ± 2,4	100,6 ± 6,2	99,1 ± 4,1	101,7 ± 2,8
Undecansäure			10	107,3 ± 3,6	102,4 ± 0,8	100,4 ± 4,4	101,9 ± 3,7
			20	107,6 ± 5,9	101,0 ± 1,2	99,8 ± 11,8	102,3 ± 1,5
			30	107,5 ± 5,1	101,2 ± 0,8	99,8 ± 10,2	101,4 ± 2,9
			40	107,2 ± 5,3	102,1 ± 1,3	99,6 ± 6,9	99,8 ± 1,5
			50	107,9 ± 4,7	101,3 ± 0,7	101,0 ± 7,7	99,9 ± 0,9
Myristinsäure			10	99,4 ± 3,4	100,4 ± 3,4	98,4 7,2	101,3 ± 1,4
			20	97,9 ± 6,0	94,9 ± 6,0	95,9 5,6	101,8 ± 1,2
			30	97,4 ± 6,4	96,9 ± 4,0	95,2 ± 7,3±	101,1 ± 4,4
			40	98,9 ± 6,6	94,4 ± 5,4	94,7 ± 3,0	101,1 ± 3,5
			50	95,2 ± 8,0	97,9 ± 6,0	95,4 ± 5,9	100,2 ± 2,9
Tiglinsäure			10	91,5 ± 3,4	96,1 ± 3,7	110,6 ± 6,2	110,7 ± 4,1
			20	91,5 ± 3,2	95,9 ± 1,4	109,3 ± 1,5	113,5 ± 1,4
			30	90,8 ± 1,0	99,2 ± 1,1	111,2 ± 3,1	110,4 ± 4,5
			40	94,4 ± 3,9	98,0 ± 2,3	110,6 ± 1,4	112,9 ± 2,8
			50	89,4 ± 1,8	98,9 ± 0,7	112,1 ± 2,5	112,1 ± 3,0

III Methodenvalidierung

Tab. 34: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Puffer im Vergleich mit Ratten- und Humanplasma

Bestandteil	Konzentration [mmol /L]		
	Krebs-Henseleit-Puffer	Humanplasma ¹²	Rattenplasma ¹³
Natrium (Na ⁺)	143,0	135 – 148	135,0
Kalium (K ⁺)	5,95	3,6 - 5,1	4,90
Magnesium (Mg ²⁺)	1,20	0,41 - 1,23	1,30
Chlorid (Cl ⁻)	122,7	99 – 109	100,0
anorgan. Phosphat (PO ₃ ⁴⁻)	1,20	0,87 - 1,94	2,30
Kalzium (Ca ²⁺)	1,25	2,25 – 2,74	2,60

Tab. 35: Hydrolyse von Ethylheptanoat in künstlicher Magenflüssigkeit

Hydrolysezeit [min]	Konzentration [mmol /L]		
	Ethylheptanoat	Ethanol	Heptansäure
0	0,275	0,000	0,000
30	0,258	0,016	0,018
60	0,255	0,016	0,023
90	0,251	0,025	0,024
120	0,252	0,023	0,023
150	0,242	0,031	0,036
180	0,240	0,034	0,035
210	0,236	0,042	0,037
240	0,230	0,039	0,050
270	0,229	0,041	0,051
300	0,227	0,046	0,049
330	0,220	0,049	0,061
360	0,222	0,050	0,056
390	0,228	0,053	0,042
420	0,215	0,058	0,062

Tab. 36: Hydrolyse von Ethylheptanoat in 1:100 verdünntem Rattenplasma

Hydrolysezeit [min]	Konzentration [mmol /l]		
	Ethylheptanoat	Ethanol	Heptansäure
0	1,58	0,00	0,00
10	1,10	0,29	0,12
20	0,92	0,53	0,52
30	0,73	0,85	0,81
45	0,53	1,18	1,21
60	0,24	1,43	1,45
90	0,07	1,50	1,45
120	0,01	1,54	1,58

¹² Buddeke, 1999; Krebs, 1950; Leuthardt, 1963; Pschyrembel, 2001; Schenk, 1990

¹³ Waynforth, 1980

Tab. 37: Kinetische Parameter in Abhängigkeit von der Darstellungsform für Phenylacetat in Humanplasma

Darstellungsform	mittlerer Graf der Funktion	K_m [mol /L]	V_{max} [mol /min-g Protein]	V_{max} /K_m [L /min-g Protein]
Lineweaver-Burk	$y = 1,681x + 0,611$	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$1,64 \cdot 10^{-3}$	0,59
Hanes-Woolf	$y = 0,224x + 2,100$	$9,36 \cdot 10^{-3}$	$4,46 \cdot 10^{-3}$	0,48
Eadie-Hofstee	$y = -3,315x + 2,040$	$3,32 \cdot 10^{-3}$	$2,04 \cdot 10^{-3}$	0,62
Cornish-Bowen	-	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	0,65
VK (%)	-	64,1	48,4	11,6

Tab. 38: Kinetische Parameter in Abhängigkeit von der Darstellungsform für Ethylphenylacetat in Humanplasma

Darstellungsform	Graf der linearen Regression	K_m [mol /L]	V_{max} [mol /min-g Protein]	V_{max} /K_m [L /min-g Protein]
Lineweaver-Burk	$y = 3,814x + 0,681$	$5,60 \cdot 10^{-3}$	$1,47 \cdot 10^{-6}$	0,26
Hanes-Woolf	$y = 0,607x + 3,902$	$6,43 \cdot 10^{-3}$	$1,65 \cdot 10^{-6}$	0,26
Eadie-Hofstee	$y = -4,690x + 1,276$	$4,69 \cdot 10^{-3}$	$1,28 \cdot 10^{-6}$	0,27
Cornish-Bowen	-	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,29
VK (%)	-	19,7	14,4	5,9

Tab. 39: Kinetische Parameter für Phenylacetat in Humanplasma in Abhängigkeit vom Tangentenanstieg

	mittlere Tangentenfunktion	K_m [mol /L]	V_{max} [mol /min-g Protein]	V_{max} /K_m [L /min-g Protein]
$t_i = 0.00$ min	$y = 1.5537x + 0.5935$	$2,62 \cdot 10^{-3}$	$1,68 \cdot 10^{-3}$	0,64
$t_i = 0.10$ min	$y = 1.6812x + 0.6111$	$2,75 \cdot 10^{-3}$	$1,64 \cdot 10^{-3}$	0,59
$t_i = 0.20$ min	$y = 1.8185x + 0.6288$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	$1,59 \cdot 10^{-3}$	0,55
$t_i = 0.50$ min	$y = 2.2981x + 0.6816$	$3,37 \cdot 10^{-3}$	$1,47 \cdot 10^{-3}$	0,44
VK (%)	-	11,3	5,9	16,0

Tab. 40: Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse von Ethylvalerat und -isovalerat in Rattenplasma in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

S_0 [mmol/L]	v_i [10^{-6} mol /L *min]					
	Ethylvalerat			Ethylisovalerat		
	Plasma 1:50 verdünnt	Plasma 1:10 verdünnt	Plasma un- verdünnt	Plasma 1:50 verdünnt	Plasma 1:10 verdünnt	Plasma un- verdünnt
0,53	11,5	35,0	215,5	k. A.	3,38	17,13
1,31	k. A.	k. A.	398,5	k. A.	k. A.	k. A.
2,10	k. A.	k. A.	748,9	k. A.	k. A.	k. A.
3,00	41,9	137,0	786,1	8,01	13,11	97,15
5,50	42,9	220,0	k. A.	13,08	24,02	129,43
8,02	73,4	256,8	k. A.	17,52	33,43	172,02
10,50	64,9	264,9	k. A.	21,90	35,44	k. A.
11,10	63,2	248,0	k. A.	24,05	43,68	k. A.
14,97	k. A.	k. A.	k. A.	25,30	49,03	k. A.
15,20	69,4	268,3	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.

(n = 1)

IV Biologisches Material und pharmakokinetische Parameter

Tab. 41: Hydrolyseaktivität von Rattenplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Substrat ($S_0 = 0,25 \text{ mM}$)	spezifische Hydrolyseaktivität H_a [$10^{-6} \text{ mol/min g Protein}$]			
Pool-Nummer	(r) 015.002	(r) 015.004	(r) 001.703 (w26)	(r) 012.001 (w21)
Lagerdauer	„frisch“ (1 h bei 4°C)		26 Wochen bei -84°C	21 Wochen bei -84°C
Phenylacetat	$99,2 \pm 1,3$ (n = 5)	$93,4 \pm 1,2$ (n = 5)	$87,6 \pm 2,88$ (n = 4)	$75,8 \pm 3,9$ (n = 4)
Ethylheptanoat	$25,7 \pm 7,6$ (n = 5)	$18,7 \pm 1,8$ (n = 5)	$18,3 \pm 0,08$ (n = 5)	$7,1 \pm 1,7$ (n = 4)
Ethyltiglat	$0,298 \pm 0,036$ (n = 4)	$0,218 \pm 0,019$ (n = 4)	$0,169 \pm 0,114$ (n = 3)	$0,147 \pm 0,060$ (n = 4)
Benzyltiglat	$0,515 \pm 0,079$ (n = 4)	$0,338 \pm 0,033$ (n = 4)	$0,302 \pm 0,005$ (n = 4)	$0,126 \pm 0,021$ (n = 4)

Tab. 42: Hydrolyseaktivität von Humanplasma in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Substrat ($S_0 = 0,25 \text{ mM}$)	spezifische Hydrolyseaktivität H_a [$10^{-6} \text{ mol/min g Protein}$]			
Pool-Nummer	(h) 014.704	(h) 020.504	(h) 014.704 (w8)	(h) 020.504 (w12)
Lagerdauer	„frisch“ (1 h bei 4°C)		8 Wochen bei -84°C	12 Wochen bei -84°C
Phenylacetat	$92,4 \pm 3,5$ (n = 4)	$75,1 \pm 6,0$ (n = 4)	$66,9 \pm 3,0$ (n = 4)	$63,5 \pm 0,6$ (n = 4)
Ethylheptanoat	k. A.	$0,039 \pm 0,006$ (n = 4)	$0,041 \pm 0,007$ (n = 4)	k. A.
Ethyltiglat	k. A.	$0,030 \pm 0,004$ (n = 4)	$0,012 \pm 0,001$ (n = 4)	k. A.
Benzyltiglat	k. A.	$0,010 \pm 0,001$ (n = 4)	$0,009 \pm 0,002$ (n = 4)	k. A.

Tab. 43: Substratumsatz von Phenylacetat in Rattenplasma („frisch“; 1:100 verdünnt) in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Lagerdauer bei 4°C	Substratumsatz [%]	Substratumsatz [$\mu\text{mol/L je min}$]
1,00 h	$92,6$ (n = 1)	$57,9$ (n = 1)
1,25 h	$93,1$ (n = 1)	$58,2$ (n = 1)
1,50 h	$93,9$ (n = 1)	$58,7$ (n = 1)
3,00 h	$93,0$ (n = 1)	$58,1$ (n = 1)
12,00 h	$95,7$ (n = 1)	$59,8$ (n = 1)
Blindwert in Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4)	$2,20 \pm 1,63$ (n = 5)	$5,40 \pm 4,07$ (n = 5)

Reaktionsdauer 4 min, $S_0 = 0.25 \text{ mM}$
Plasma-Pool (r) 015.004

Tab. 44: Spezifische Hydrolyseaktivität künstlicher und physiologischer Körperflüssigkeiten anhand von Ethyltiglat, Benzyltiglat und Phenylacetat

$S_0 = 0,25 \text{ mM}$	spezifische Hydrolyseaktivität $H_{a, \text{spez.}}$ [$10^{-6} \text{ mol/min * g Protein}$]		
Hydrolysemedium	Ethyltiglat	Benzyltiglat	Phenylacetat
Künstliche Magenflüssigkeit (pH 1,2)	$< 0,0043 \pm 0,0000$ (n = 4)	$< 0,0043 \pm 0,0000$ (n = 4)	k. A.
Humanplasma „frisch“ (h)020.504	$0,0301 \pm 0,0044$ (n = 4)	$0,0100 \pm 0,0010$ (n = 4)	$63,5 \pm 0,6$ (n = 4)
Rattenplasma „frisch“ (r)015.002	$0,2983 \pm 0,0359$ (n = 4)	$0,5151 \pm 0,0791$ (n = 4)	$98,5 \pm 0,8$ (n = 4)
Rattenplasma „frisch“ (r)015.004	$0,2182 \pm 0,0189$ (n = 4)	$0,3380 \pm 0,0325$ (n = 5)	$93,4 \pm 1,2$ (n = 4)
S9-Fraktion (Ratte) (s9)003.605 (19 Monate bei -84°C gelagert)	$164,3 \pm 4,9$ (n = 4)	$168,1 \pm 14,2$ (n = 4)	k. A.

Tab. 45: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

spezifische Hydrolyseaktivität H_a [10^{-6} mol /min * g Protein]						
S_0	Ethylpropionat	Ethylvalerat	Ethylisovalerat	Ethylheptanoat	Ethylundecanoat	Ethylmyristat
0,25 mM	0,0668 ± 0,0033 (n = 4)	0,137 ± 0,007 (n = 4)	0,0414 ± 0,0044 (n = 4)	0,0351 ± 0,076 (n = 4)	0,0107 ± 0,0011 (n = 4)	0,0046 ± 0,0011 (n = 4)
0,50 mM	0,095 ± 0,007 (n = 4)	0,213 ± 0,014 (n = 4)	0,0468 ± 0,0080 (n = 4)	0,052 ± 0,009 (n = 4)	0,0161 ± 0,0043 (n = 4)	0,0051 ± 0,0016 (n = 4)
0,75 mM	0,127 ± 0,007 (n = 4)	0,254 ± 0,020 (n = 4)	0,0580 ± 0,0077 (n = 4)	0,063 ± 0,008 (n = 4)	0,0178 ± 0,0059 (n = 4)	0,0032 ± 0,0007 (n = 4)
1,00 mM	0,143 ± 0,013 (n = 4)	0,297 ± 0,046 (n = 4)	0,0393 ± 0,0099 (n = 4)	0,087 ± 0,008 (n = 4)	0,0178 ± 0,0052 (n = 4)	0,0039 ± 0,0004 (n = 4)
1,25 mM	0,178 ± 0,013 (n = 4)	0,323 ± 0,008 (n = 4)	0,0634 ± 0,0052 (n = 4)	0,085 ± 0,007 (n = 4)	0,0257 ± 0,0024 (n = 4)	0,0036 ± 0,0005 (n = 4)
1,75 mM	0,194 ± 0,005 (n = 4)	0,360 ± 0,016 (n = 4)	0,0601 ± 0,0043 (n = 4)	0,107 ± 0,005 (n = 4)	0,0296 ± 0,0047 (n = 4)	0,0045 ± 0,0012 (n = 4)
2,50 mM	0,237 ± 0,006 (n = 4)	0,423 ± 0,018 (n = 4)	0,0715 ± 0,0069 (n = 4)	0,135 ± 0,007 (n = 4)	0,00223 ± 0,0062 (n = 4)	0,0055 ± 0,0014 (n = 4)
S_0	Ethyltiglat	Ethylphenylacetat	Ethylsalicylat	Benzyltiglat	Benzylphenylacetat	Benzylsalicylat
0,25 mM	0,0125 ± 0,0009 (n = 4)	0,052 ± 0,004 (n = 4)	< 12,1 µM	0,014 ± 0,002 (n = 4)	0,608 ± 0,036 (n = 4)	0,010 ± 0,001 (n = 4)
0,50 mM	0,0133 ± 0,0011 (n = 4)	0,088 ± 0,018 (n = 4)	< 12,1 µM	0,033 ± 0,001 (n = 4)	1,194 ± 0,184 (n = 4)	0,023 ± 0,003 (n = 4)
0,75 mM	0,0170 ± 0,0012 (n = 4)	0,126 ± 0,013 (n = 4)	< 12,1 µM	0,046 ± 0,002 (n = 4)	1,702 ± 0,259 (n = 4)	0,027 ± 0,002 (n = 4)
1,00 mM	0,0193 ± 0,0006 (n = 4)	0,170 ± 0,022 (n = 4)	< 12,1 µM	0,057 ± 0,002 (n = 4)	2,129 ± 0,421 (n = 4)	0,036 ± 0,008 (n = 4)
1,25 mM	0,0192 ± 0,0018 (n = 4)	0,204 ± 0,015 (n = 4)	< 12,1 µM	0,076 ± 0,001 (n = 4)	2,277 ± 0,209 (n = 4)	0,044 ± 0,005 (n = 4)
1,75 mM	0,0221 ± 0,0007 (n = 4)	0,263 ± 0,017 (n = 4)	< 12,1 µM	0,093 ± 0,002 (n = 4)	3,149 ± 0,527 (n = 4)	0,052 ± 0,003 (n = 4)
2,50 mM	0,0251 ± 0,0014 (n = 4)	0,976 ± 0,060 (n = 4)	< 12,1 µM	0,153 ± 0,008 (n = 4)	3,655 ± 0,394 (n = 4)	0,066 ± 0,009 (n = 4)
S_0	Ethylcinnamat	Methyloctanoat	Isoamylbutyrat	S_0	Phenylacetat	
0,25 mM	0,0066 ± 0,0006 (n = 4)	0,034 ± 0,004 (n = 4)	0,644 ± 0,012 (n = 4)	0,25 mM	66,9 ± 3,0 (n = 4)	
0,50 mM	0,0073 ± 0,0006 (n = 4)	0,042 ± 0,008 (n = 4)	1,205 ± 0,042 (n = 4)	0,50 mM	130,6 ± 3,9 (n = 4)	
0,75 mM	0,0095 ± 0,0008 (n = 4)	0,060 ± 0,016 (n = 4)	1,271 ± 0,280 (n = 4)	k. A.	k. A.	
1,00 mM	0,0105 ± 0,0003 (n = 4)	0,062 ± 0,010 (n = 4)	1,751 ± 0,171 (n = 4)	1,00 mM	273,1 ± 2,1 (n = 4)	
1,25 mM	0,0104 ± 0,0013 (n = 4)	0,080 ± 0,010 (n = 4)	2,301 ± 0,082 (n = 4)	2,00 mM	496,0 ± 10,9 (n = 4)	
1,75 mM	0,0094 ± 0,0005 (n = 4)	0,125 ± 0,023 (n = 4)	3,413 ± 0,110 (n = 4)	3,00 mM	745,2 ± 55,0 (n = 4)	
2,50 mM	0,0098 ± 0,0007 (n = 4)	0,183 ± 0,042 (n = 4)	4,281 ± 0,245 (n = 4)	4,00 mM	865,5 ± 24,6 (n = 4)	

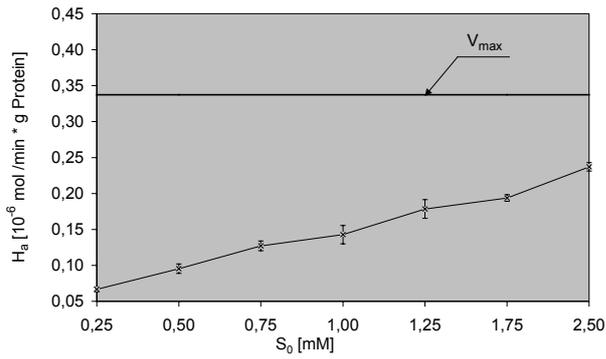
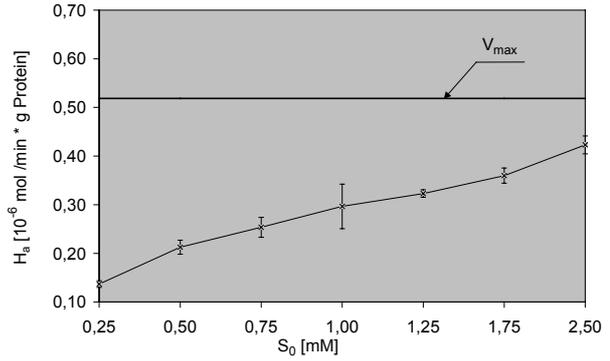
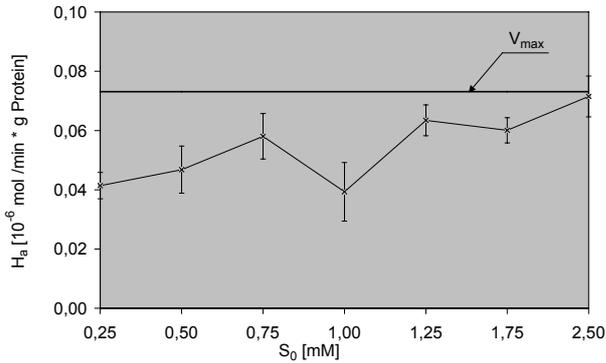
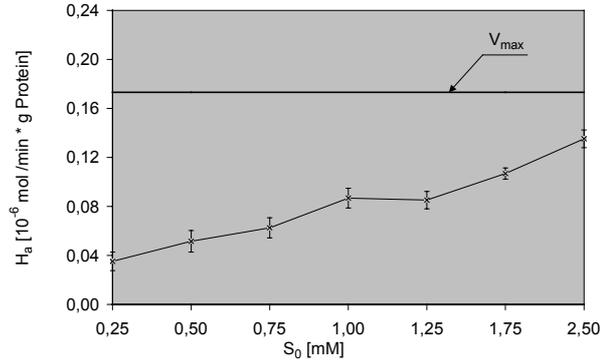
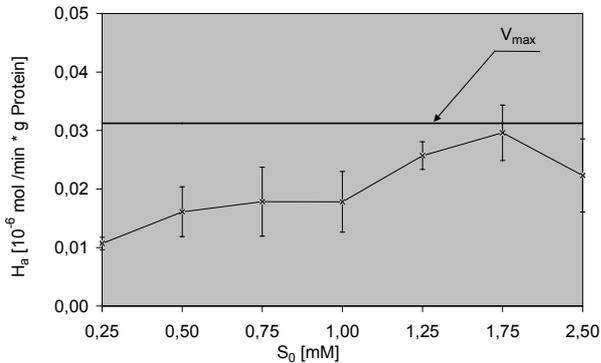
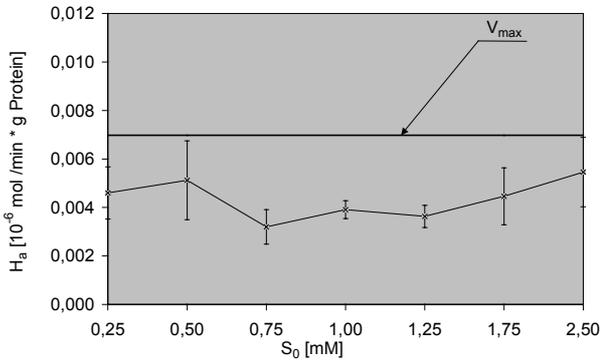
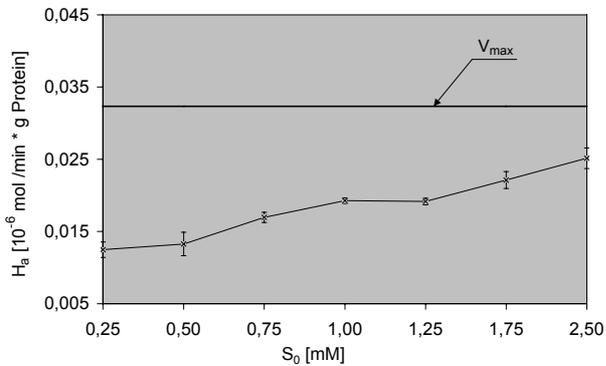
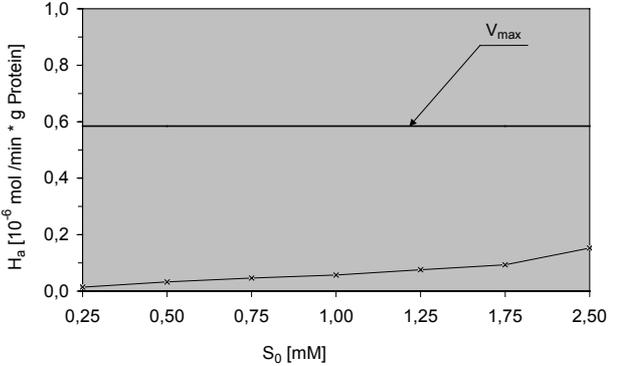
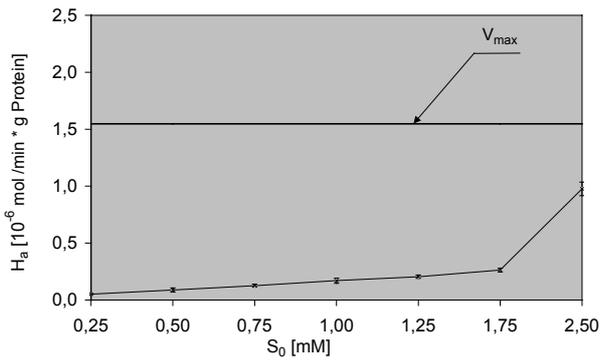
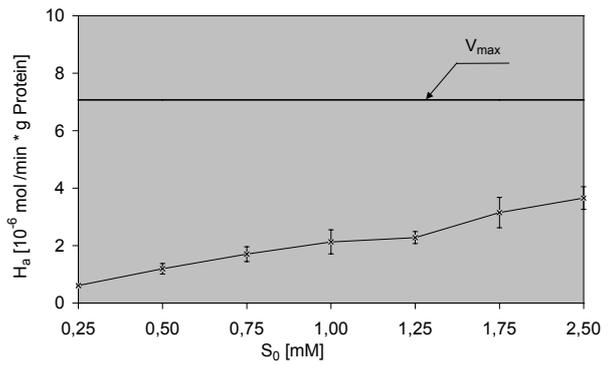
Ethylpropionat**Ethylvalerat****Ethylisovalerat****Ethylheptanoat****Ethylundecanoat****Ethylmyristat****Ethyltiglat****Benzyltiglat**

Abb. 82: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration im Vergleich zu V_{max}

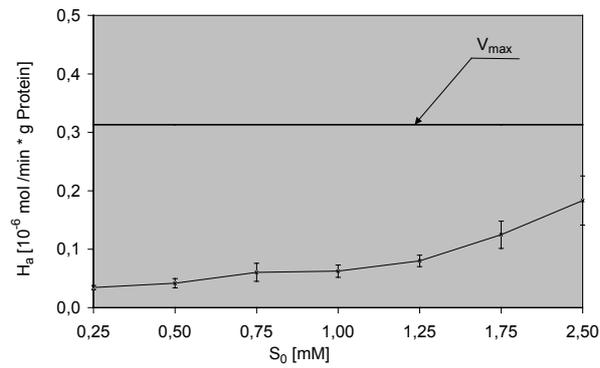
Ethylphenylacetat



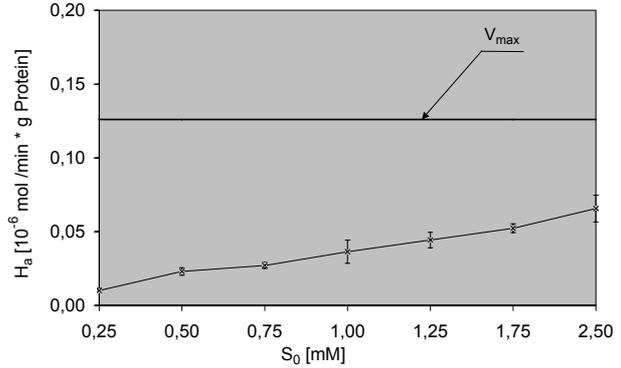
Benzylphenylacetat



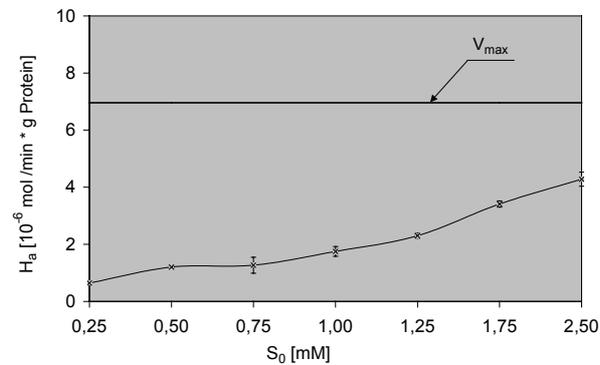
Methyloctanoat



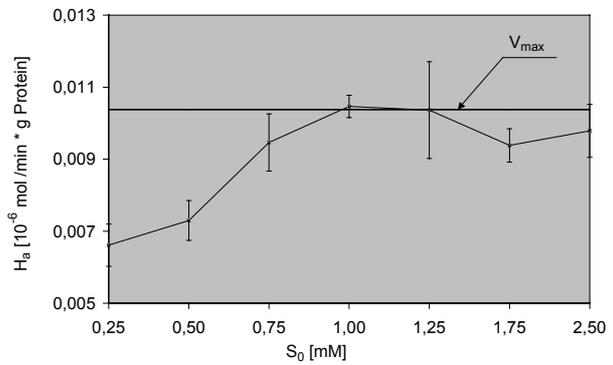
Benzylsalicylat



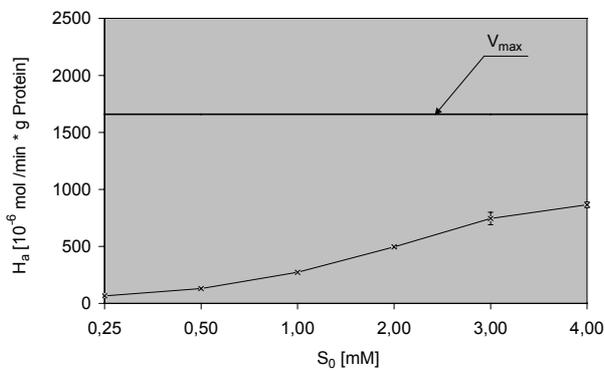
Isoamylbutyrat



Ethylcinnamat



Phenylacetat



Fortsetzung Abb. 82

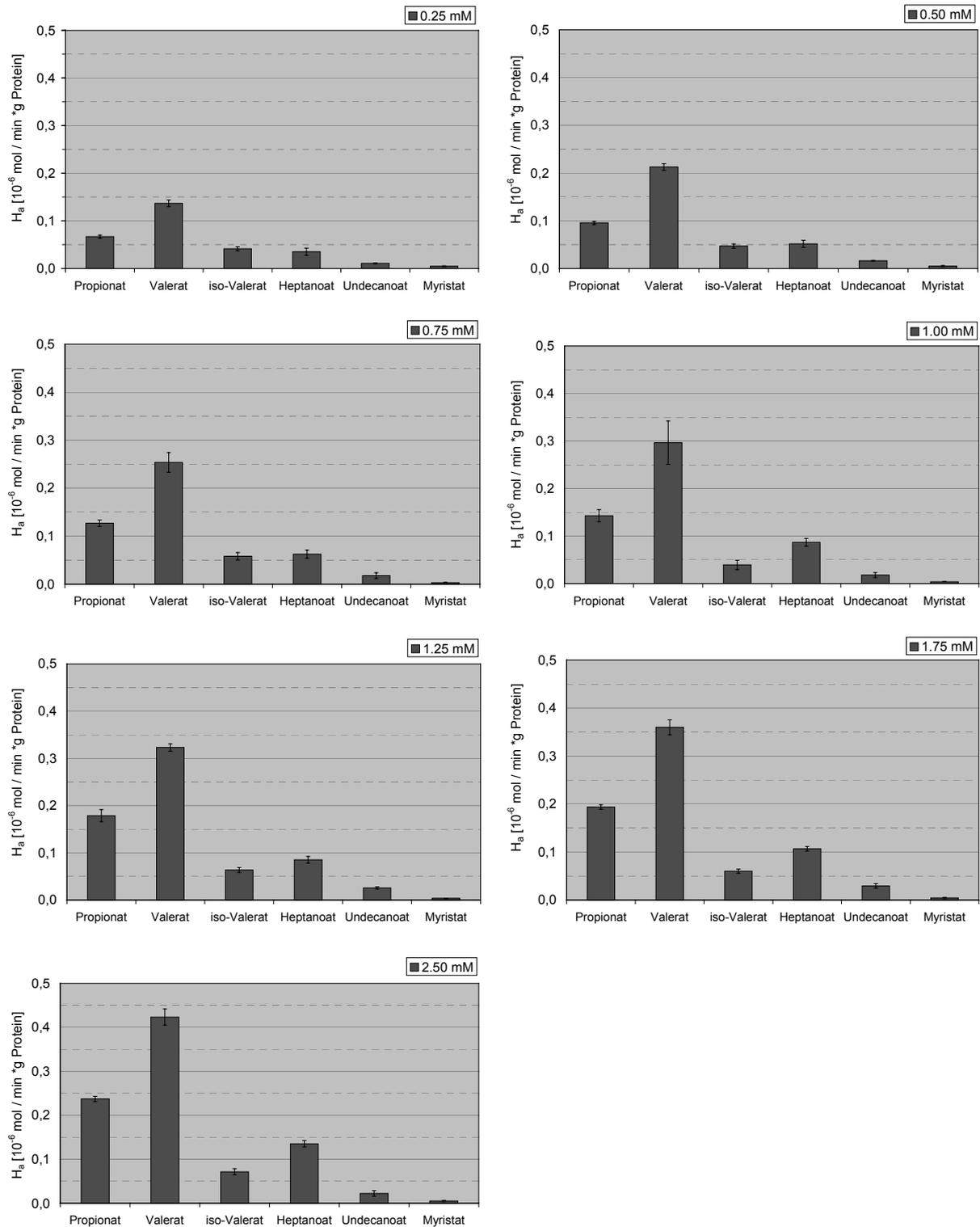


Abb. 83: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

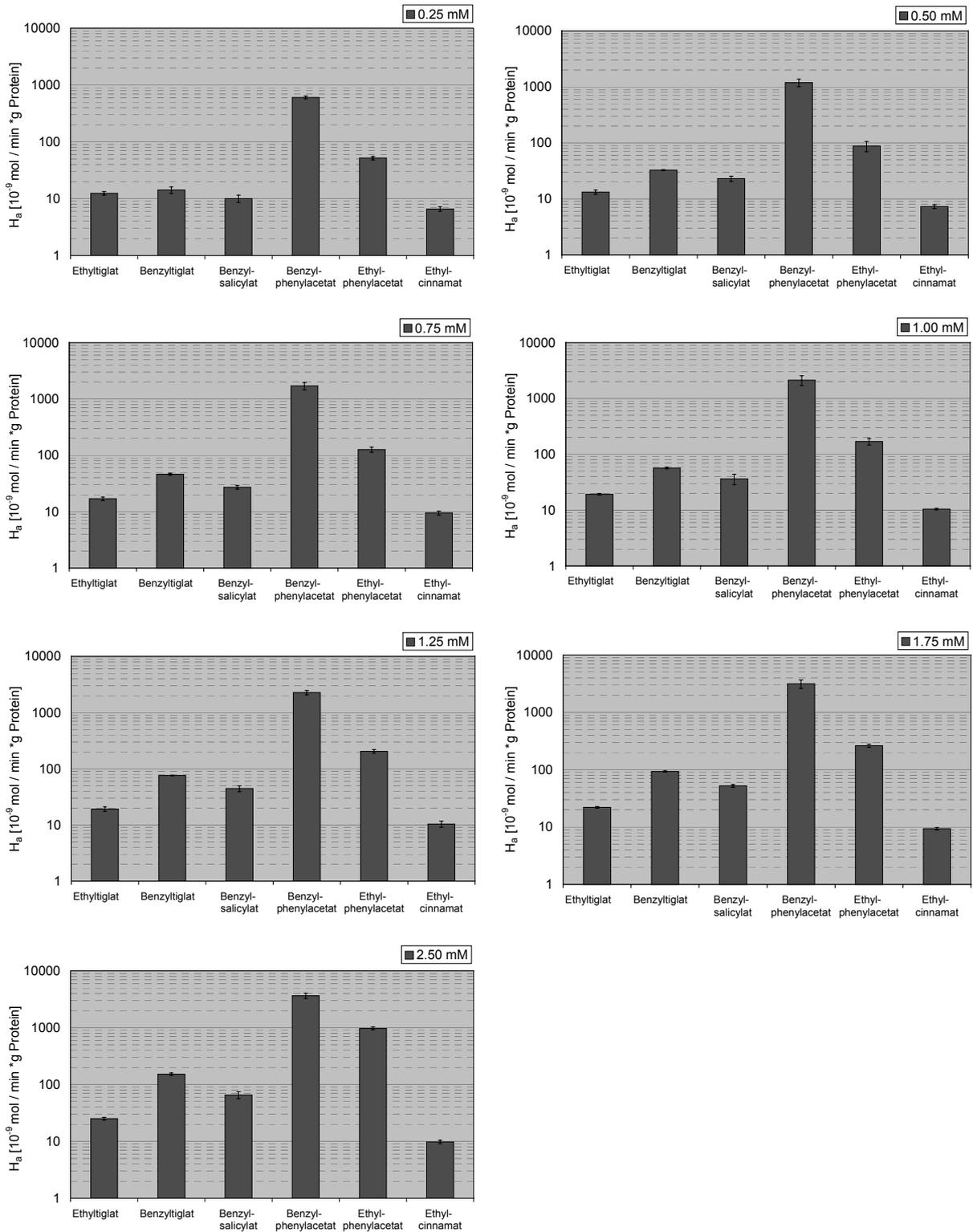


Abb. 84: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (logarithmische Darstellung)

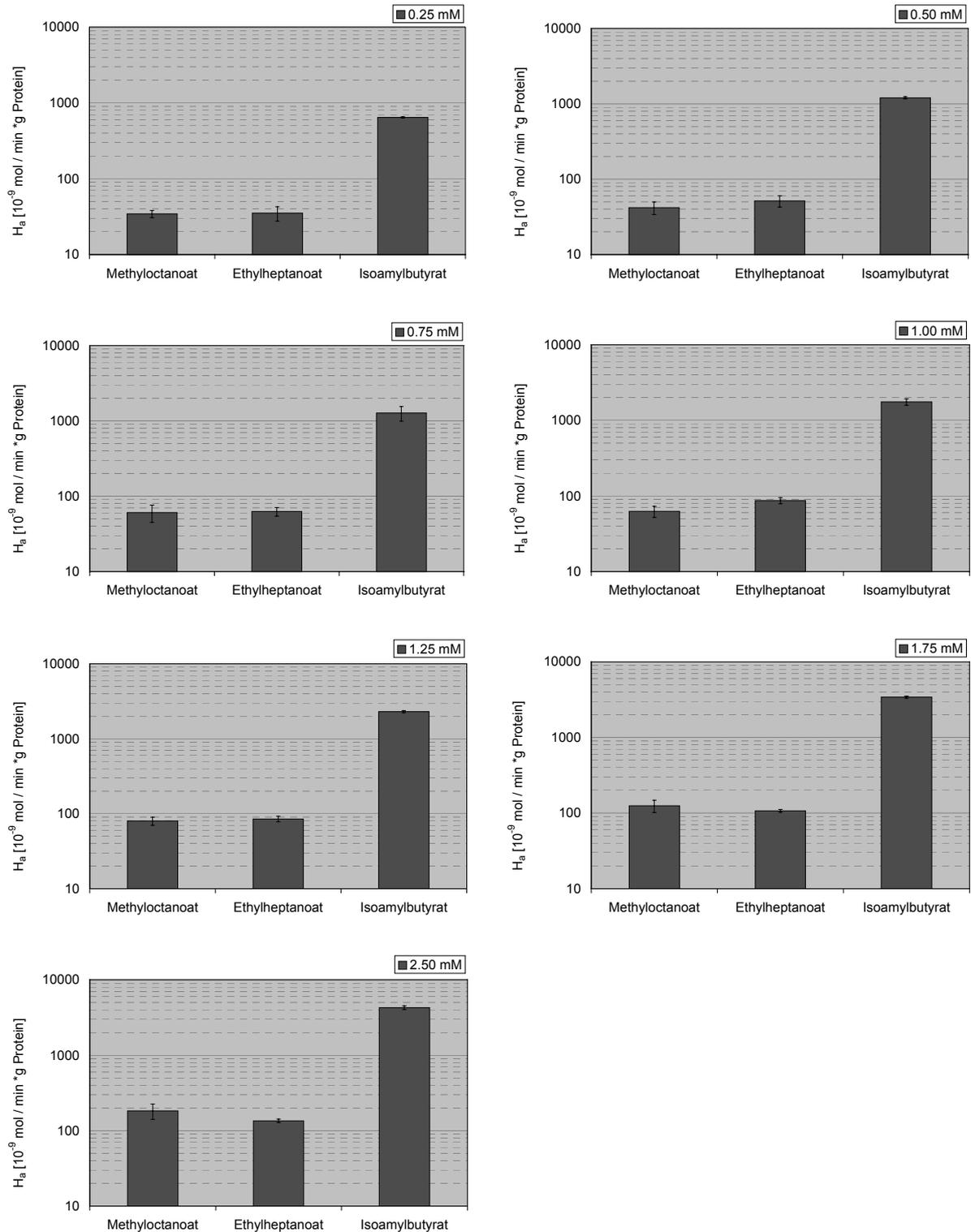


Abb. 85: Spezifische Hydrolyseaktivität von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (logarithmische Darstellung)

Tab. 46: Halbwertszeit von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]						
S_0	Ethylpropionat	Ethylvalerat	Ethylisovalerat	Ethylheptanoat	Ethylundecanoat	Ethylmyristat
0,25 mM	18,67 ± 0,90 (n = 4)	9,70 ± 1,20 (n = 4)	36,17 ± 3,39 (n = 4)	45,04 ± 7,83 (n = 4)	168,6 ± 18,6 (n = 4)	341,0 ± 72,7 (n = 4)
0,50 mM	29,08 ± 0,87 (n = 4)	13,56 ± 0,82 (n = 4)	66,23 ± 5,72 (n = 4)	68,11 ± 11,26 (n = 4)	212,4 ± 26,4 (n = 4)	690,5 ± 162,4 (n = 4)
0,75 mM	35,50 ± 1,46 (n = 4)	17,52 ± 1,02 (n = 4)	82,37 ± 3,22 (n = 4)	91,83 ± 15,05 (n = 4)	321,3 ± 51,1 (n = 4)	1127,1 ± 459,5 (n = 4)
1,00 mM	41,27 ± 0,86 (n = 4)	20,31 ± 0,67 (n = 4)	126,46 ± 23,15 (n = 4)	87,94 ± 4,90 (n = 4)	373,7 ± 45,9 (n = 4)	1646,2 ± 173,3 (n = 4)
1,25 mM	44,08 ± 4,64 (n = 4)	24,72 ± 0,47 (n = 4)	121,19 ± 13,39 (n = 4)	113,39 ± 7,47 (n = 4)	391,3 ± 20,7 (n = 4)	1877,3 ± 288,8 (n = 4)
1,75 mM	57,30 ± 1,22 (n = 4)	32,34 ± 1,03 (n = 4)	197,21 ± 12,25 (n = 4)	123,01 ± 7,43 (n = 4)	461,6 ± 65,6 (n = 4)	2310,5 ± 0,0 (n = 4)
2,50 mM	68,31 ± 1,28 (n = 4)	40,50 ± 1,27 (n = 4)	239,18 ± 29,34 (n = 4)	146,45 ± 9,97 (n = 4)	778,0 ± 349,4 (n = 4)	3176,9 ± 577,6 (n = 4)
S_0	Ethyltiglat	Ethylphenylacetat	Ethylsalicylat	Benzyltiglat	Benzylphenylacetat	Benzylsalicylat
0,25 mM	141,0 ± 7,5 (n = 4)	25,01 ± 1,61 (n = 4)	n.m.	115,8 ± 11,1 (n = 4)	1,44 ± 0,17 (n = 4)	192,3 ± 24,5 (n = 4)
0,50 mM	276,6 ± 28,4 (n = 4)	30,30 ± 1,12 (n = 4)	n.m.	95,0 ± 2,4 (n = 4)	1,76 ± 0,34 (n = 4)	170,0 ± 26,6 (n = 4)
0,75 mM	352,9 ± 29,7 (n = 4)	34,17 ± 1,09 (n = 4)	n.m.	104,8 ± 5,2 (n = 4)	1,94 ± 0,14 (n = 4)	214,2 ± 16,0 (n = 4)
1,00 mM	402,1 ± 11,3 (n = 4)	32,71 ± 1,47 (n = 4)	n.m.	131,0 ± 6,4 (n = 4)	2,19 ± 0,36 (n = 4)	229,3 ± 41,6 (n = 4)
1,25 mM	478,6 ± 19,1 (n = 4)	38,28 ± 3,92 (n = 4)	n.m.	103,9 ± 2,3 (n = 4)	2,68 ± 0,40 (n = 4)	230,9 ± 54,1 (n = 4)
1,75 mM	617,0 ± 26,3 (n = 4)	40,75 ± 2,29 (n = 4)	n.m.	124,4 ± 2,8 (n = 4)	2,51 ± 0,46 (n = 4)	296,0 ± 60,8 (n = 4)
2,50 mM	775,0 ± 71,0 (n = 4)	39,17 ± 2,58 (n = 4)	n.m.	102,8 ± 8,3 (n = 4)	4,00 ± 0,57 (n = 4)	279,5 ± 27,6 (n = 4)
S_0	Ethylcinnamat	Methyloctanoat	Isoamylbutyrat	S_0	Phenylacetat ¹⁴	
0,25 mM	232,4 ± 41,7 (n = 4)	47,66 ± 3,28 (n = 4)	0,75 ± 0,13 (n = 4)	0,25 mM	0,80 ± 0,23 (n = 4)	
0,50 mM	387,0 ± 32,3 (n = 4)	77,27 ± 1,87 (n = 4)	1,14 ± 0,14 (n = 4)	0,50 mM	0,91 ± 0,15 (n = 4)	
0,75 mM	525,3 ± 39,3 (n = 4)	94,74 ± 7,19 (n = 4)	2,62 ± 0,50 (n = 4)	k. A.	k. A.	
1,00 mM	661,6 ± 36,4 (n = 4)	112,07 ± 6,55 (n = 4)	2,47 ± 0,25 (n = 4)	1,00 mM	0,67 ± 0,05 (n = 4)	
1,25 mM	849,2 ± 104,4 (n = 4)	116,17 ± 10,28 (n = 4)	2,59 ± 0,14 (n = 4)	2,00 mM	1,13 ± 0,07 (n = 4)	
1,75 mM	1213,0 ± 115,5 (n = 4)	105,38 ± 22,61 (n = 4)	2,21 ± 0,14 (n = 4)	3,00 mM	1,15 ± 0,23 (n = 4)	
2,50 mM	1732,9 ± 0,0 (n = 4)	107,96 ± 17,26 (n = 4)	2,87 ± 0,36 (n = 4)	4,00 mM	2,06 ± 0,21 (n = 4)	

¹⁴ Hydrolyse in 1:100 verdünntem Humanplasma

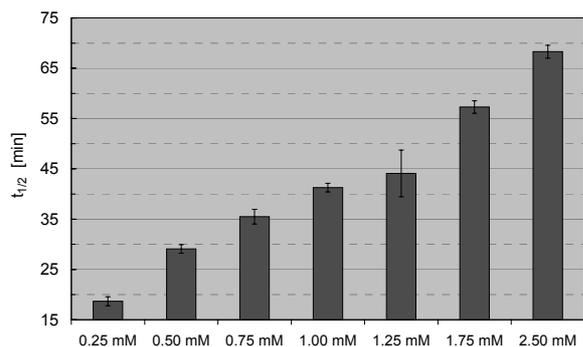
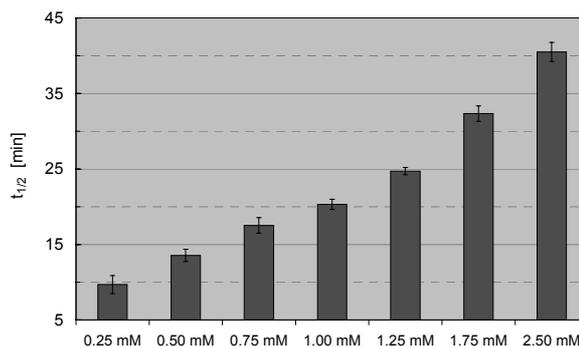
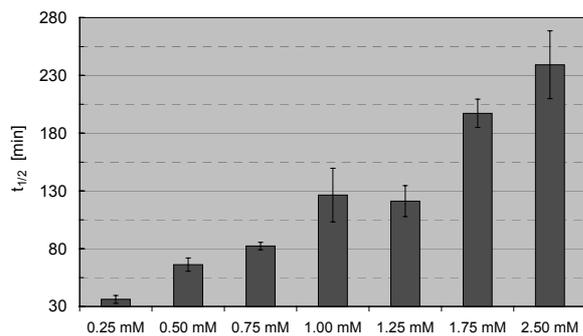
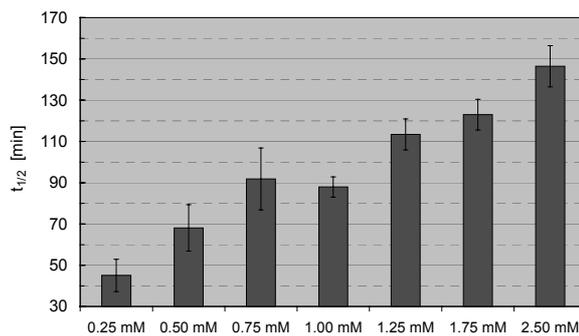
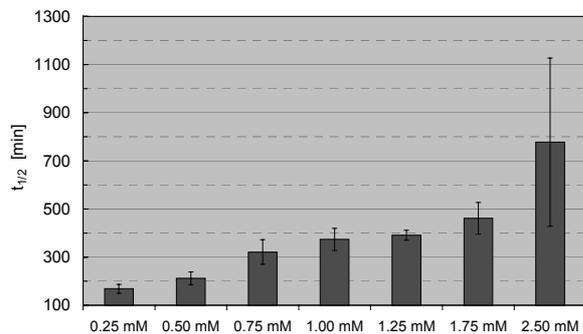
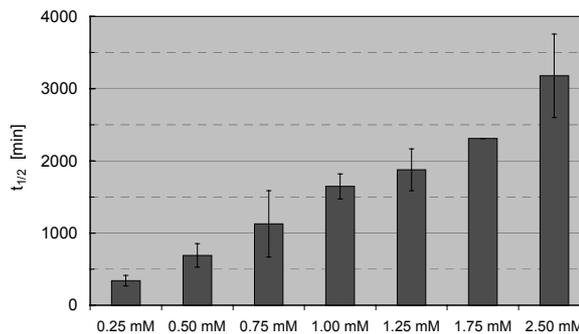
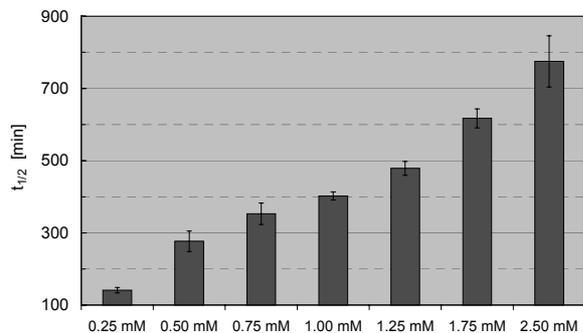
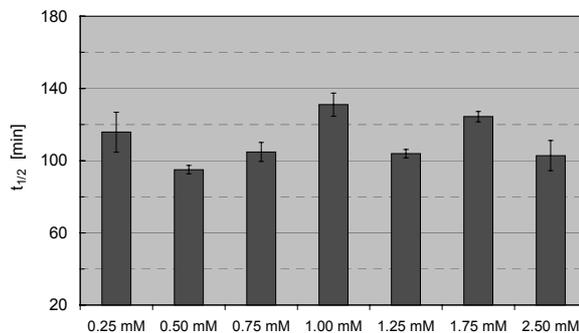
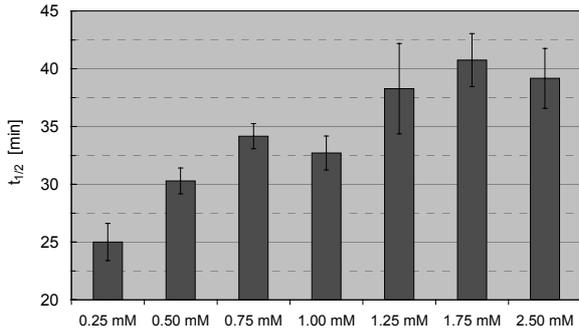
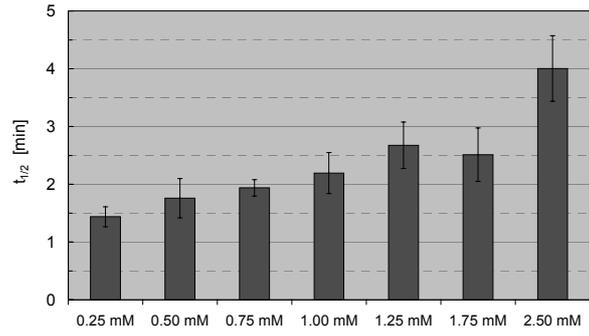
Ethylpropionat**Ethylvalerat****Ethylisovalerat****Ethylheptanoat****Ethylundecanoat****Ethylmyristat****Ethyltiglat****Benzyltiglat**

Abb. 86: Halbwertszeit von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

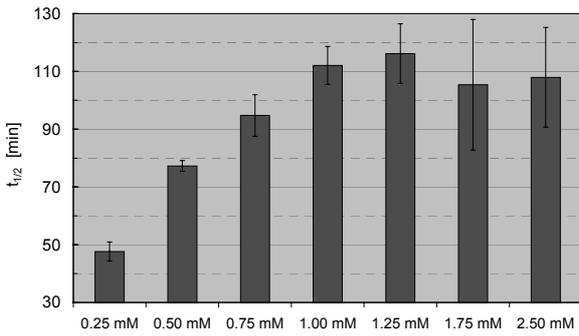
Ethylphenylacetat



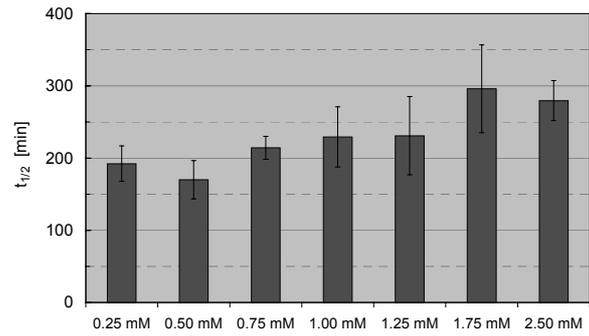
Benzyphenylacetat



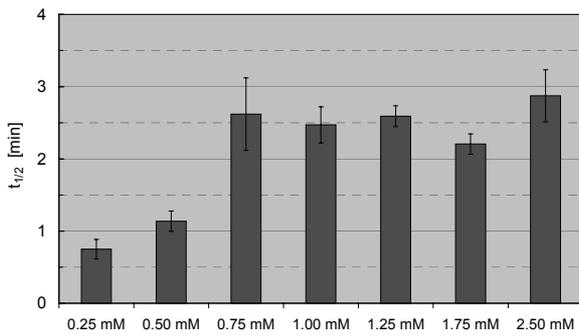
Methyloctanoat



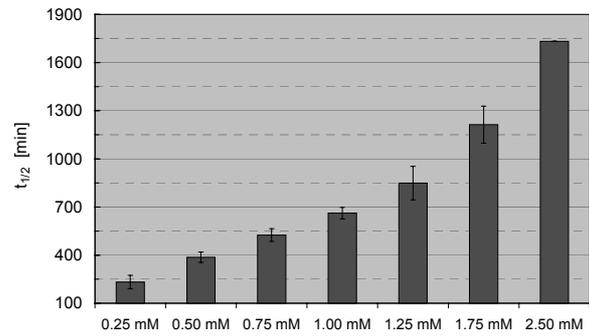
Benzylsalicylat



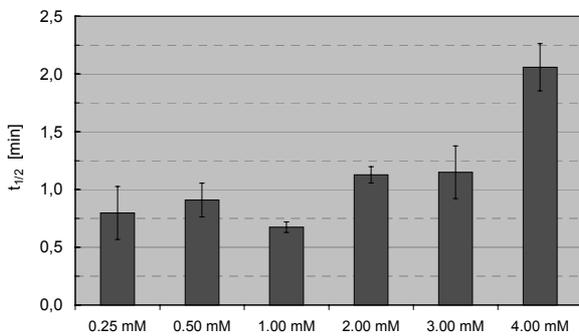
Isoamylbutyrat



Ethylcinnamat



Phenylacetat¹⁵



Fortsetzung Abb. 86

¹⁵ Hydrolyse in 1:100 verdünntem Humanplasma

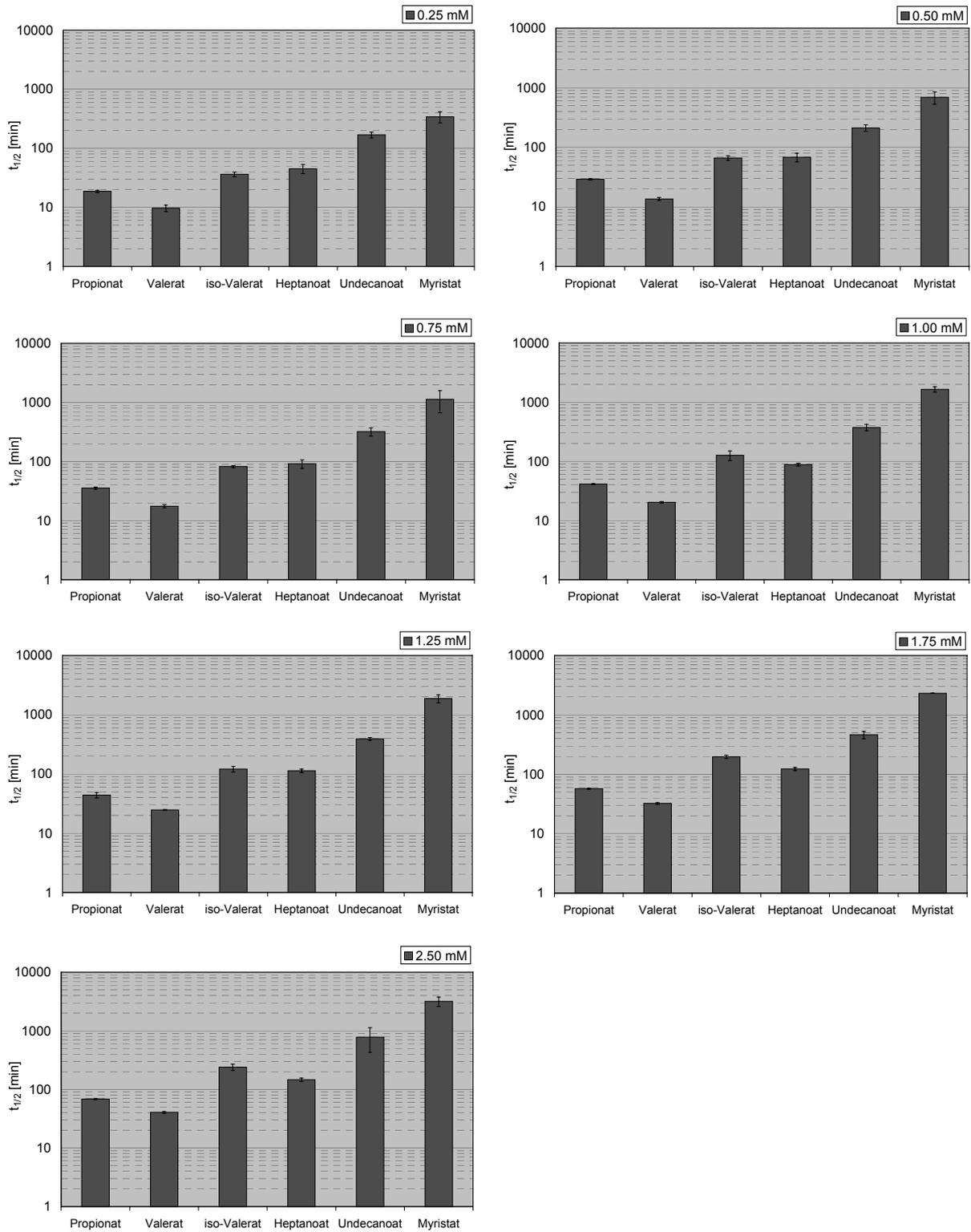


Abb. 87: Halbwertszeit von Ethylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (logarithmische Darstellung)

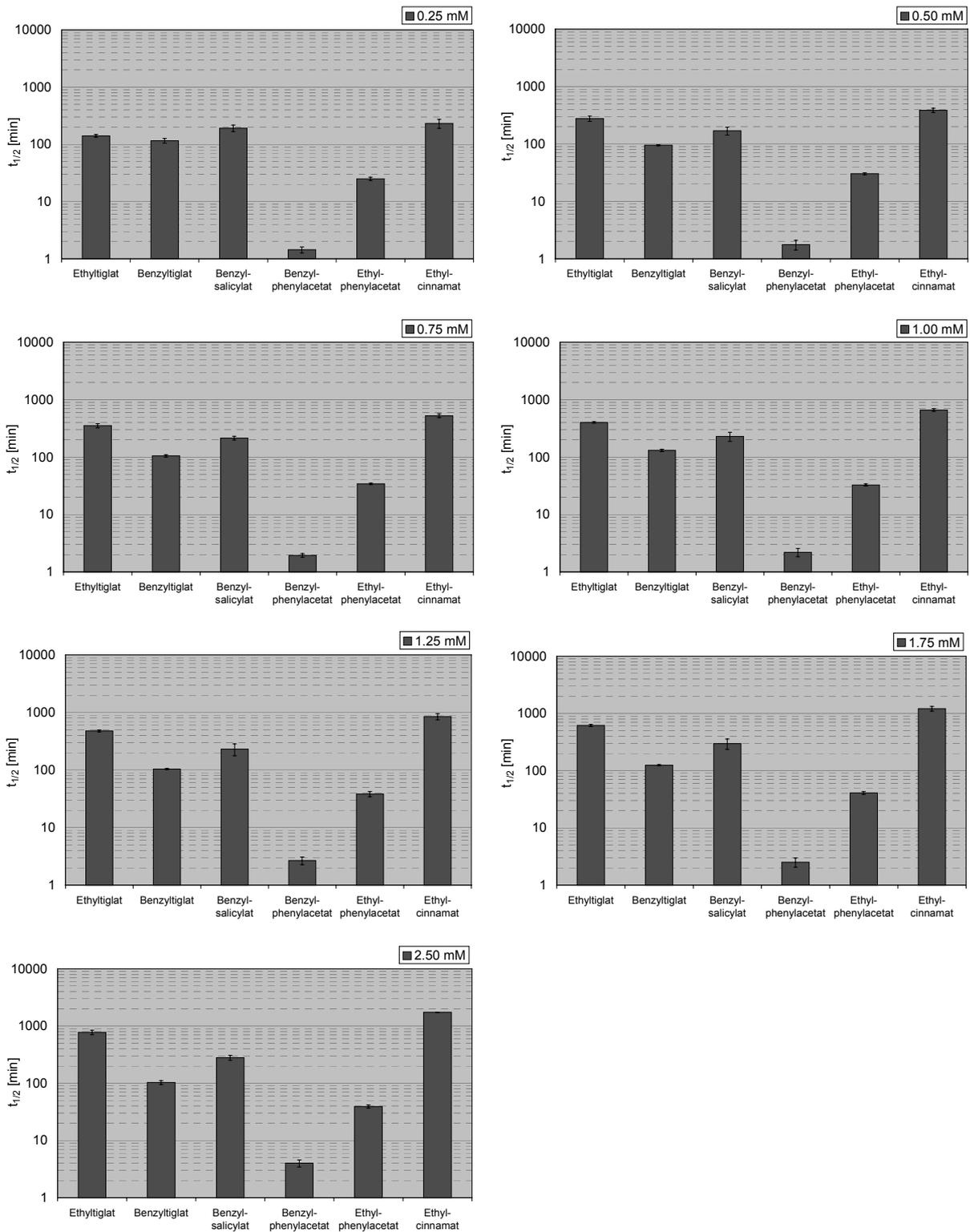


Abb. 88: Halbwertszeit von Ethyl- und Benzylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (logarithmische Darstellung)

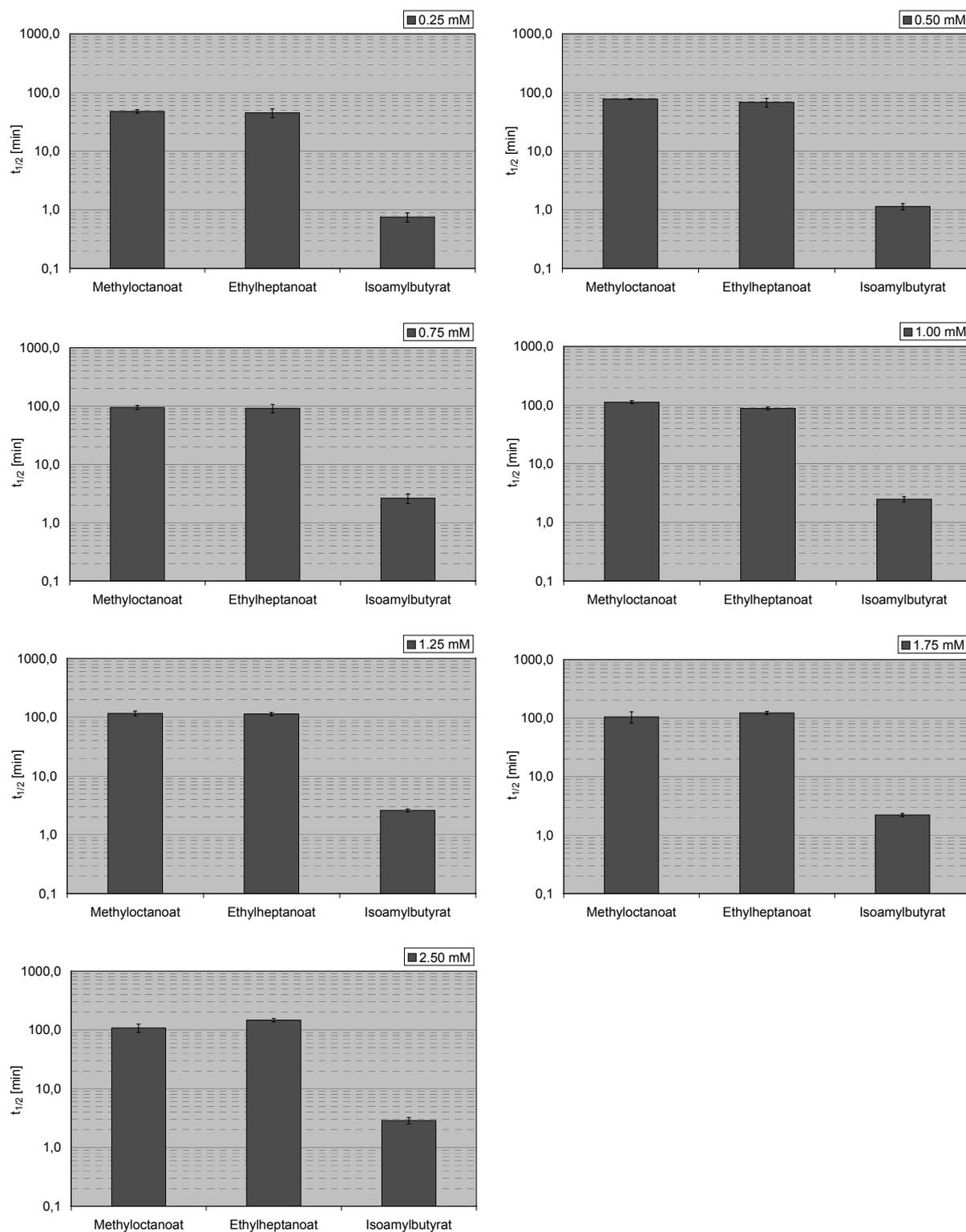


Abb. 89: Halbwertszeit von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (logarithmische Darstellung)

Tab. 47: Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ [10^{-6} mol / L * Protein]						
S_0	Ethylpropionat	Ethylvalerat	Ethylisovalerat	Ethylheptanoat	Ethylundecanoat	Ethylmyristat
0,25 mM	0,0919 ± 0,0039 (n = 4)	0,1890 ± 0,0215 (n = 4)	0,0493 ± 0,0072 (n = 5)	0,042 ± 0,005 (n = 5)	0,0113 ± 0,0012 (n = 4)	0,0041 ± 0,0014 (n = 4)
0,50 mM	0,1234 ± 0,0057 (n = 4)	0,2840 ± 0,0267 (n = 4)	0,0555 ± 0,0072 (n = 4)	0,058 ± 0,008 (n = 6)	0,0197 ± 0,0022 (n = 4)	0,0044 ± 0,0020 (n = 4)
0,75 mM	0,1568 ± 0,0058 (n = 4)	0,3192 ± 0,0154 (n = 4)	0,0637 ± 0,0028 (n = 4)	0,060 ± 0,019 (n = 5)	0,0195 ± 0,0034 (n = 4)	0,0027 ± 0,0004 (n = 4)
1,00 mM	0,1707 ± 0,0035 (n = 4)	0,3715 ± 0,0252 (n = 4)	0,0687 ± 0,0066 (n = 4)	0,083 ± 0,015 (n = 5)	0,0216 ± 0,0034 (n = 4)	0,0037 ± 0,0006 (n = 4)
1,25 mM	0,2080 ± 0,0235 (n = 4)	0,3710 ± 0,0069 (n = 4)	0,0665 ± 0,0054 (n = 4)	0,090 ± 0,006 (n = 4)	0,0257 ± 0,0026 (n = 4)	0,0029 ± 0,0007 (n = 4)
1,75 mM	0,2185 ± 0,0018 (n = 4)	0,4019 ± 0,0245 (n = 4)	0,0593 ± 0,0035 (n = 4)	0,114 ± 0,005 (n = 4)	0,0304 ± 0,0056 (n = 4)	0,0032 ± 0,0009 (n = 4)
2,50 mM	0,2555 ± 0,0066 (n = 4)	0,4541 ± 0,0214 (n = 4)	0,0679 ± 0,0032 (n = 5)	0,144 ± 0,013 (n = 4)	0,203 ± 0,0095 (n = 4)	0,0059 ± 0,0025 (n = 4)
S_0	Ethyltiglat	Ethylphenylacetat	Ethylsalicylat	Benzyltiglat	Benzylphenylacetat	Benzylsalicylat
0,25 mM	0,0139 ± 0,0008 (n = 4)	0,0661 ± 0,0071 (n = 4)	< 12,1 µM	0,0141 ± 0,0010 (n = 4)	1,519 ± 0,343 (n = 4)	0,0106 ± 0,0017 (n = 4)
0,50 mM	0,0120 ± 0,0007 (n = 4)	0,1203 ± 0,0028 (n = 4)	< 12,1 µM	0,380 ± 0,0007 (n = 4)	2,202 ± 0,453 (n = 4)	0,0250 ± 0,0030 (n = 4)
0,75 mM	0,0171 ± 0,0019 (n = 4)	0,1711 ± 0,0043 (n = 4)	< 12,1 µM	0,0533 ± 0,0024 (n = 4)	3,042 ± 0,602 (n = 4)	0,0305 ± 0,0013 (n = 4)
1,00 mM	0,0199 ± 0,0006 (n = 4)	0,2367 ± 0,0175 (n = 4)	< 12,1 µM	0,0675 ± 0,0042 (n = 4)	3,937 ± 0,717 (n = 4)	0,0384 ± 0,0056 (n = 4)
1,25 mM	0,0193 ± 0,0014 (n = 4)	0,2577 ± 0,0183 (n = 4)	< 12,1 µM	0,0887 ± 0,0015 (n = 4)	3,971 ± 0,430 (n = 4)	0,0515 ± 0,0100 (n = 4)
1,75 mM	0,0226 ± 0,0011 (n = 4)	0,3306 ± 0,0240 (n = 4)	< 12,1 µM	0,1063 ± 0,0025 (n = 4)	4,786 ± 0,243 (n = 4)	0,0567 ± 0,0075 (n = 4)
2,50 mM	0,0224 ± 0,0023 (n = 4)	0,4797 ± 0,0343 (n = 4)	< 12,1 µM	0,1596 ± 0,0324 (n = 4)	5,311 ± 1,045 (n = 4)	0,0673 ± 0,0136 (n = 4)
S_0	Ethylcinnamat	Methylctoanoat	Isoamylbutyrat	S_0	Phenylacetat	
0,25 mM	0,0075 ± 0,0010 (n = 4)	0,0397 ± 0,0007 (n = 4)	3,510 ± 1,238 (n = 4)	0,25 mM	143 ± 12 (n = 4)	
0,50 mM	0,0083 ± 0,0004 (n = 4)	0,0477 ± 0,0049 (n = 4)	3,552 ± 0,415 (n = 4)	0,50 mM	218 ± 31 (n = 4)	
0,75 mM	0,0092 ± 0,0014 (n = 4)	0,0624 ± 0,0076 (n = 4)	2,409 ± 0,580 (n = 4)	k. A.	k. A.	
1,00 mM	0,0105 ± 0,0009 (n = 4)	0,0677 ± 0,0032 (n = 4)	3,175 ± 0,368 (n = 4)	1,00 mM	358 ± 21 (n = 4)	
1,25 mM	0,0101 ± 0,0013 (n = 4)	0,0830 ± 0,0093 (n = 4)	3,987 ± 0,490 (n = 4)	2,00 mM	743 ± 91 (n = 4)	
1,75 mM	0,0091 ± 0,0001 (n = 4)	0,1276 ± 0,0174 (n = 4)	6,536 ± 0,360 (n = 4)	3,00 mM	1268 ± 228 (n = 4)	
2,50 mM	0,0098 ± 0,0013 (n = 4)	0,1813 ± 0,0345 (n = 4)	7,023 ± 0,843 (n = 4)	4,00 mM	1278 ± 171 (n = 4)	

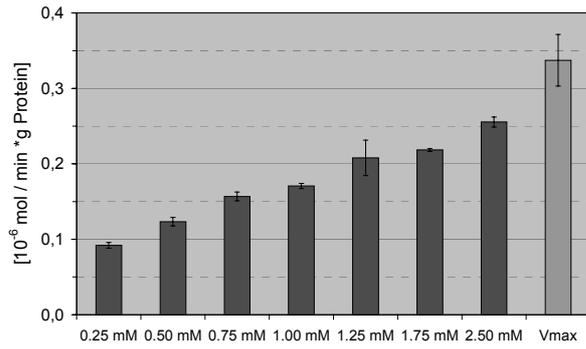
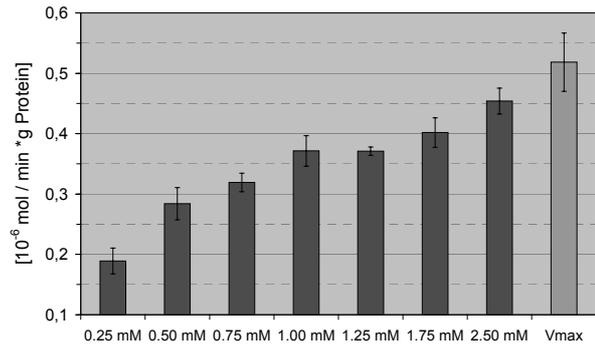
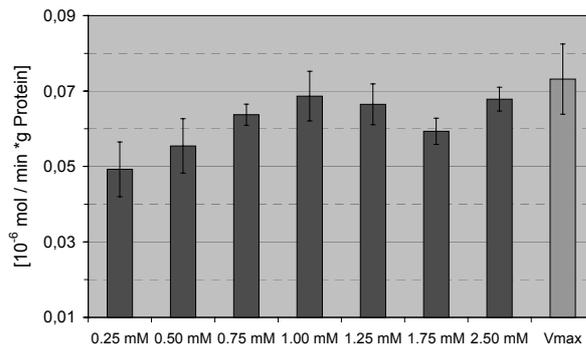
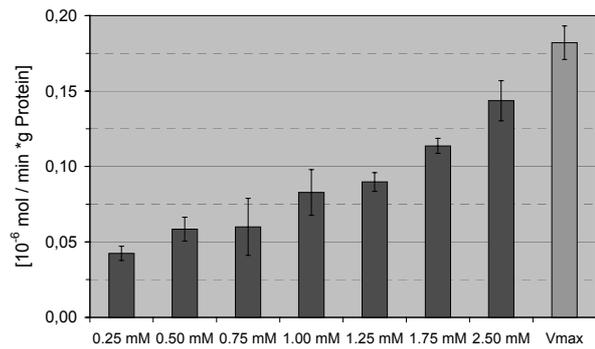
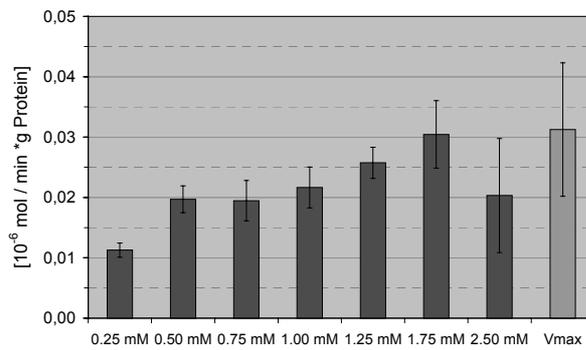
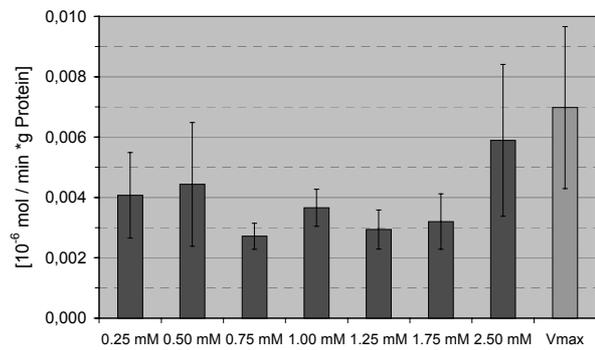
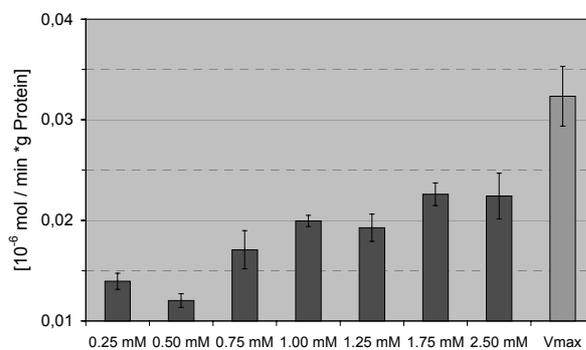
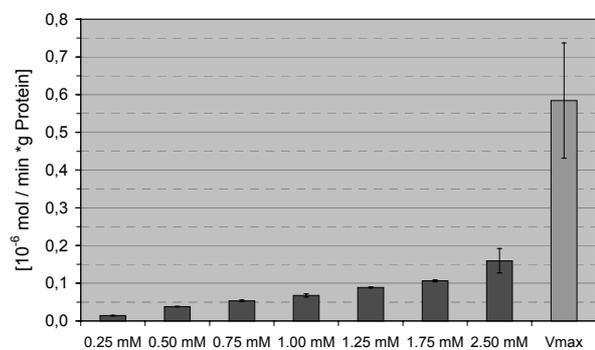
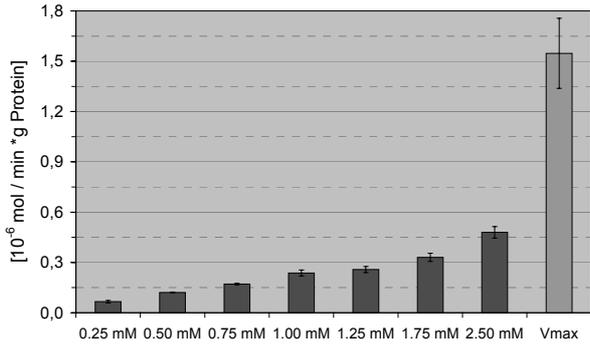
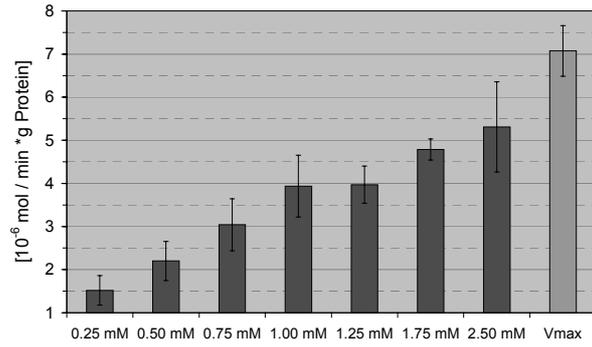
Ethylpropionat**Ethylvalerat****Ethylisovalerat****Ethylheptanoat****Ethylundecanoat****Ethylmyristat****Ethyltiglat****Benzyltiglat**

Abb. 90: Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration und Maximalgeschwindigkeit V_{max} bei der Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma

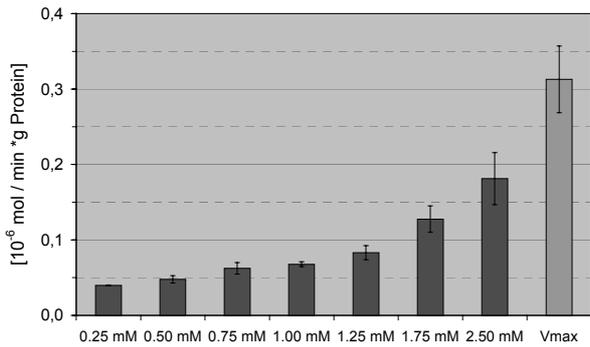
Ethylphenylacetat



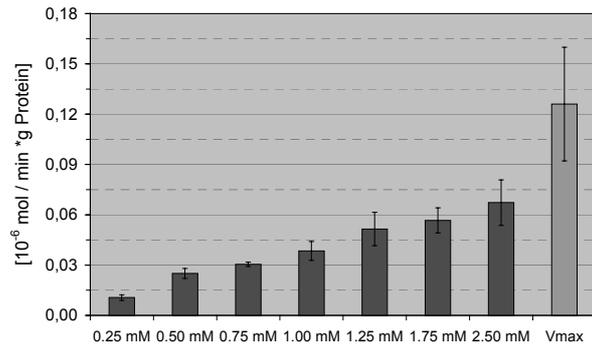
Benzylphenylacetat



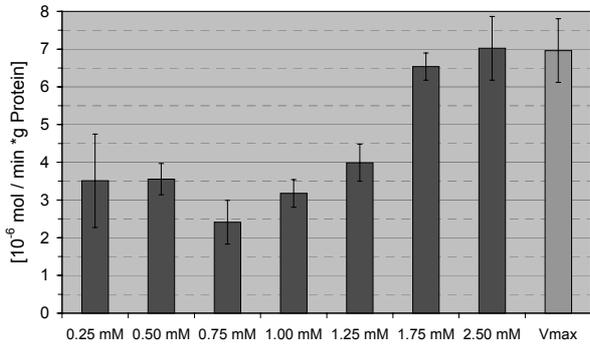
Methyloctanoat



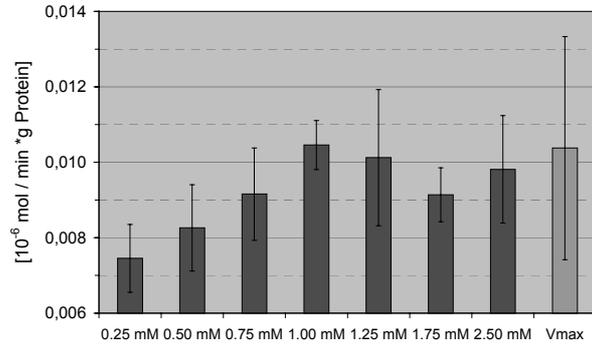
Benzylsalicylat



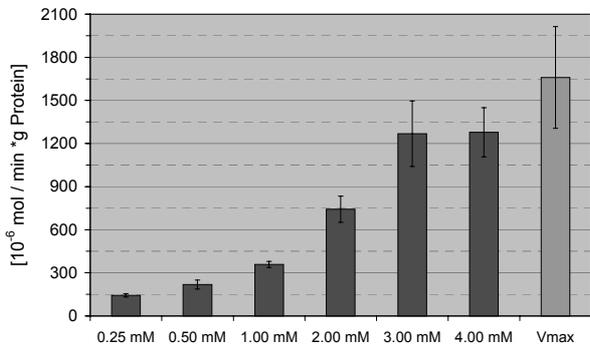
Isoamylbutyrat



Ethylcinnamat

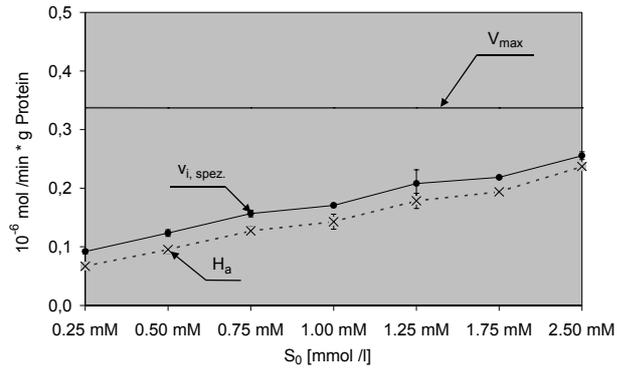


Phenylacetat

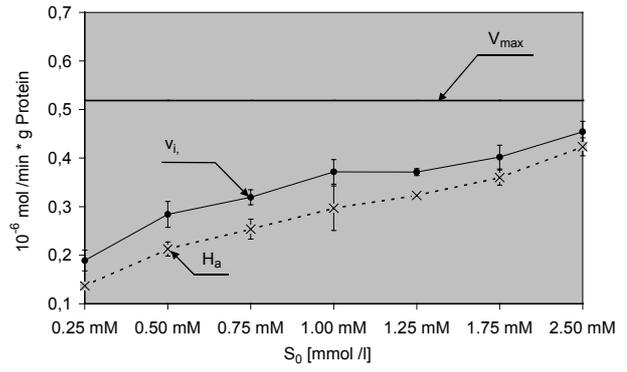


Fortsetzung Abb. 90

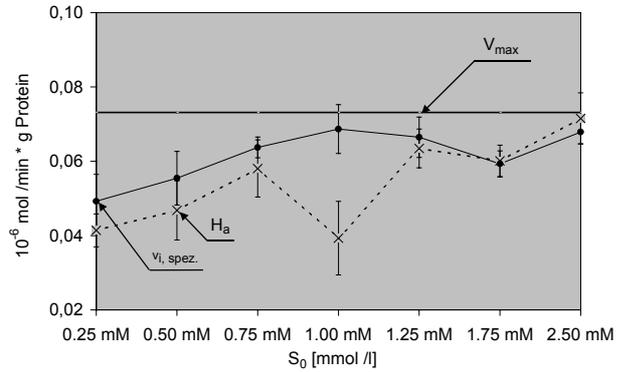
Ethylpropionat



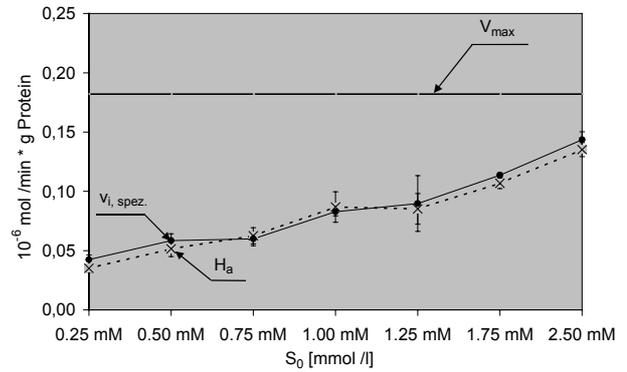
Ethylvalerat



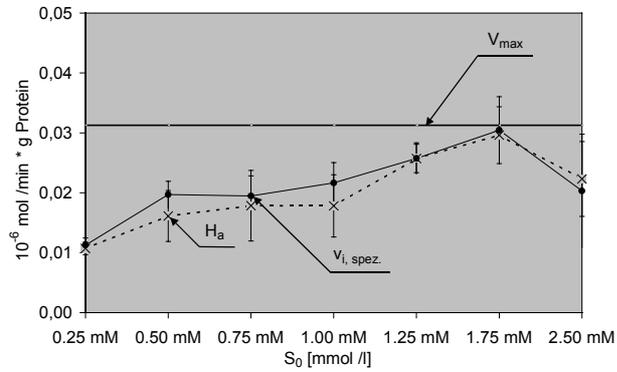
Ethylisovalerat



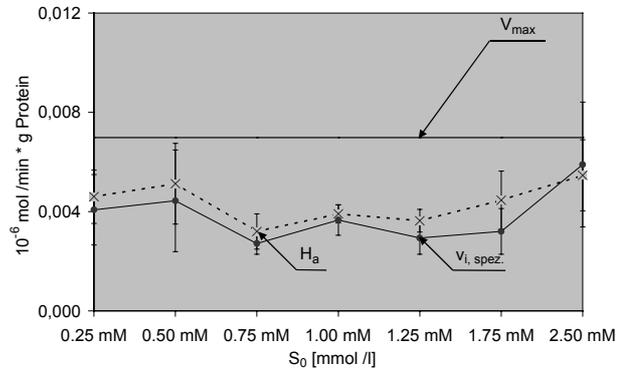
Ethylheptanoat



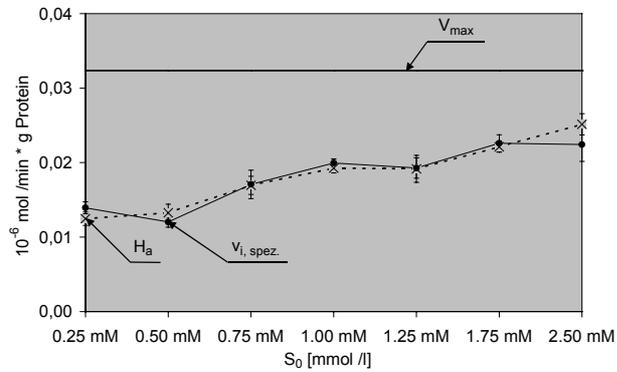
Ethylundecanoat



Ethylmyristat



Ethyltiglat



Benzyltiglat

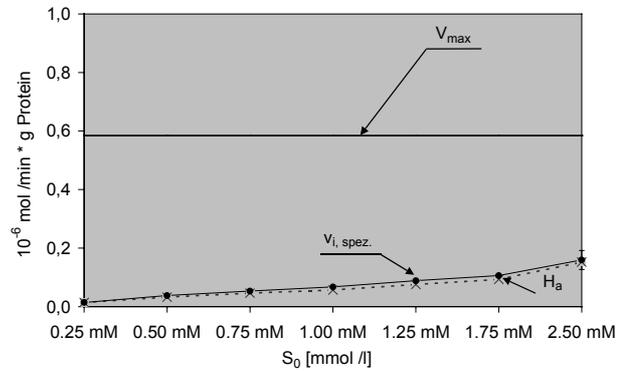
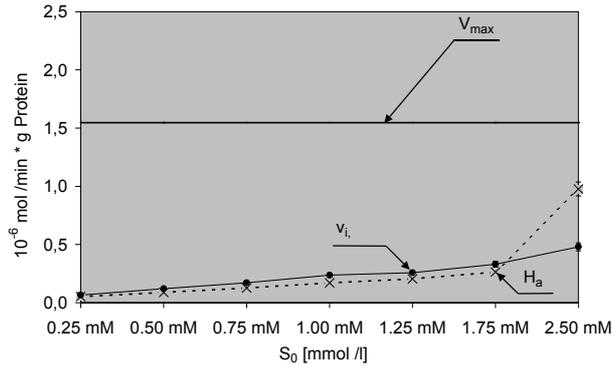
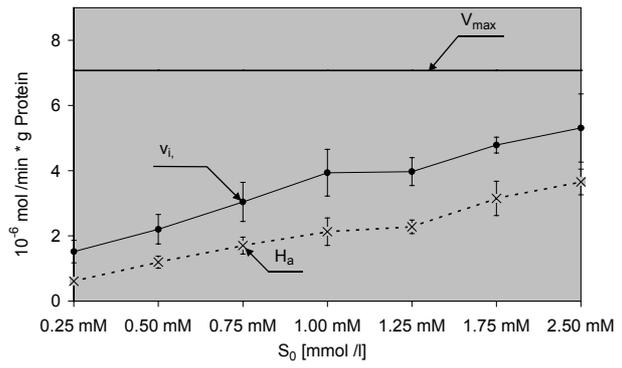


Abb. 91: Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ spezifische Hydrolyseaktivität H_a sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} bei der Hydrolyse von Carbonsäureestern in Humanplasma

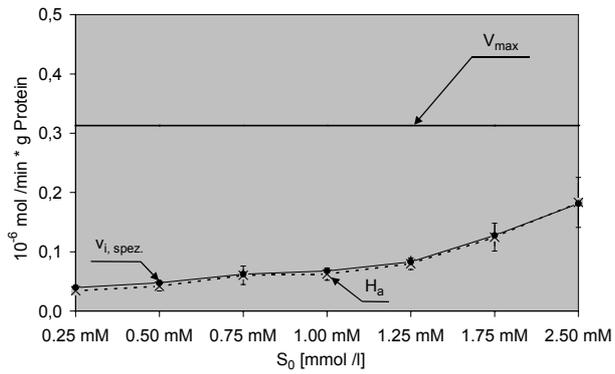
Ethylphenylacetat



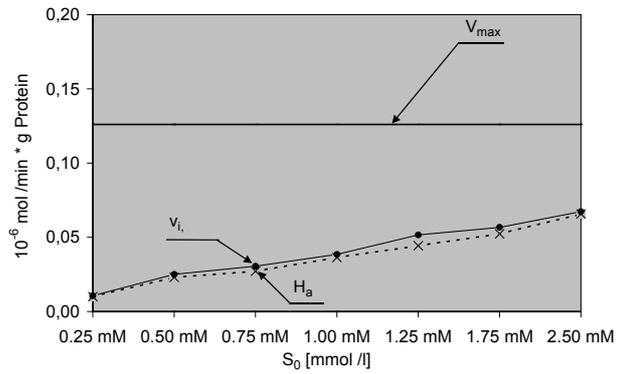
Benzylphenylacetat



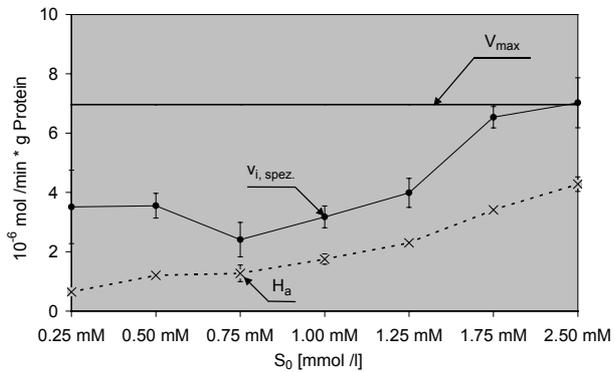
Methyloctanoat



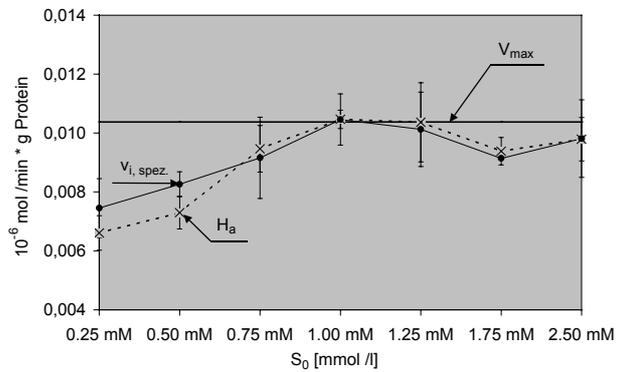
Benzylsalicylat



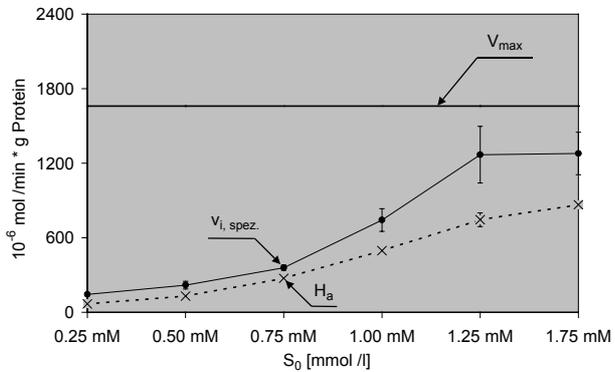
Isoamylbutyrat



Ethylcinnamat



Phenylacetat



Fortsetzung Abb. 91

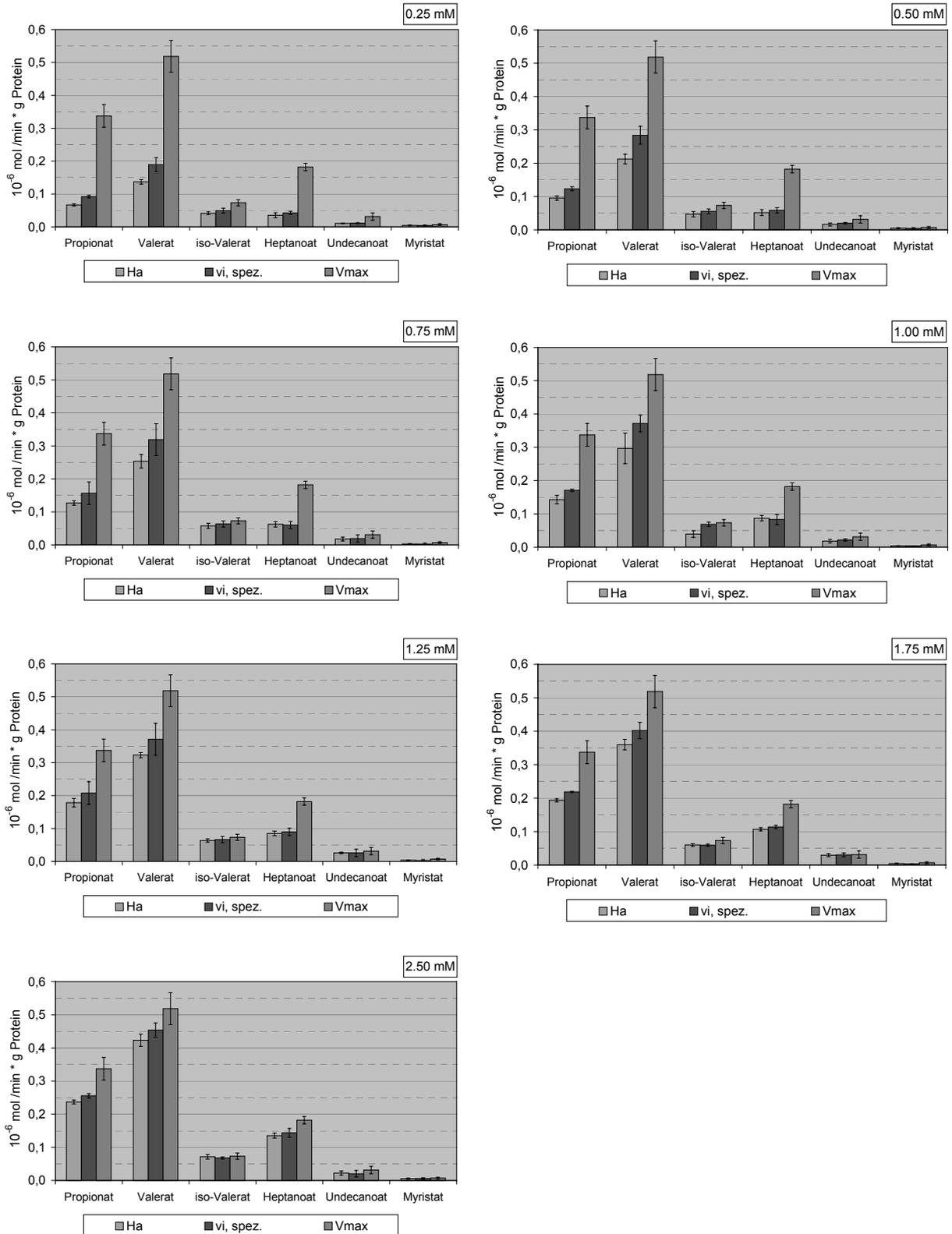


Abb. 92: Spezifische Hydrolyseaktivität H_a , spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

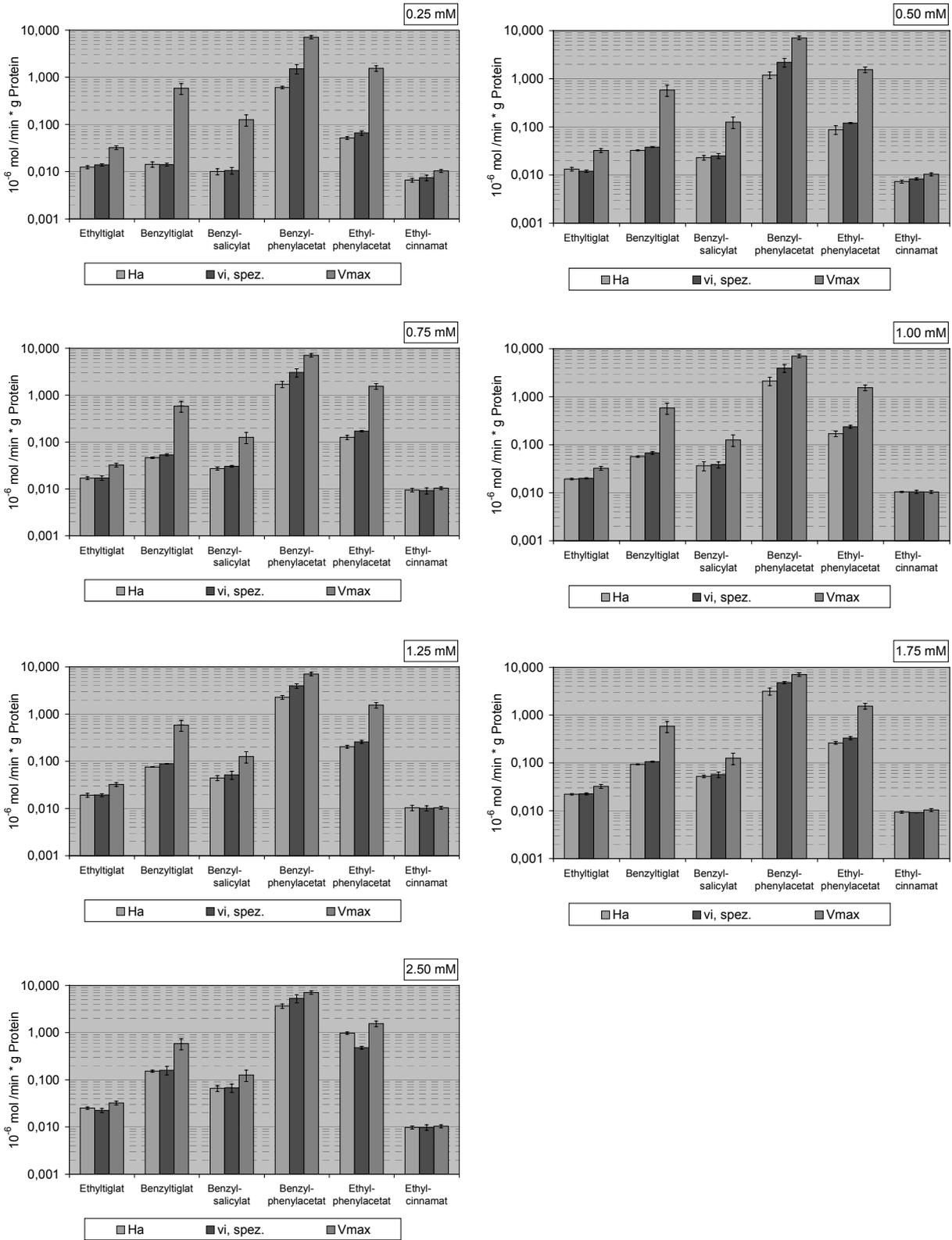


Abb. 93: Spezifische Hydrolyseaktivität H_a , Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Ethyl- und Benzylestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (logarithmische Darstellung)

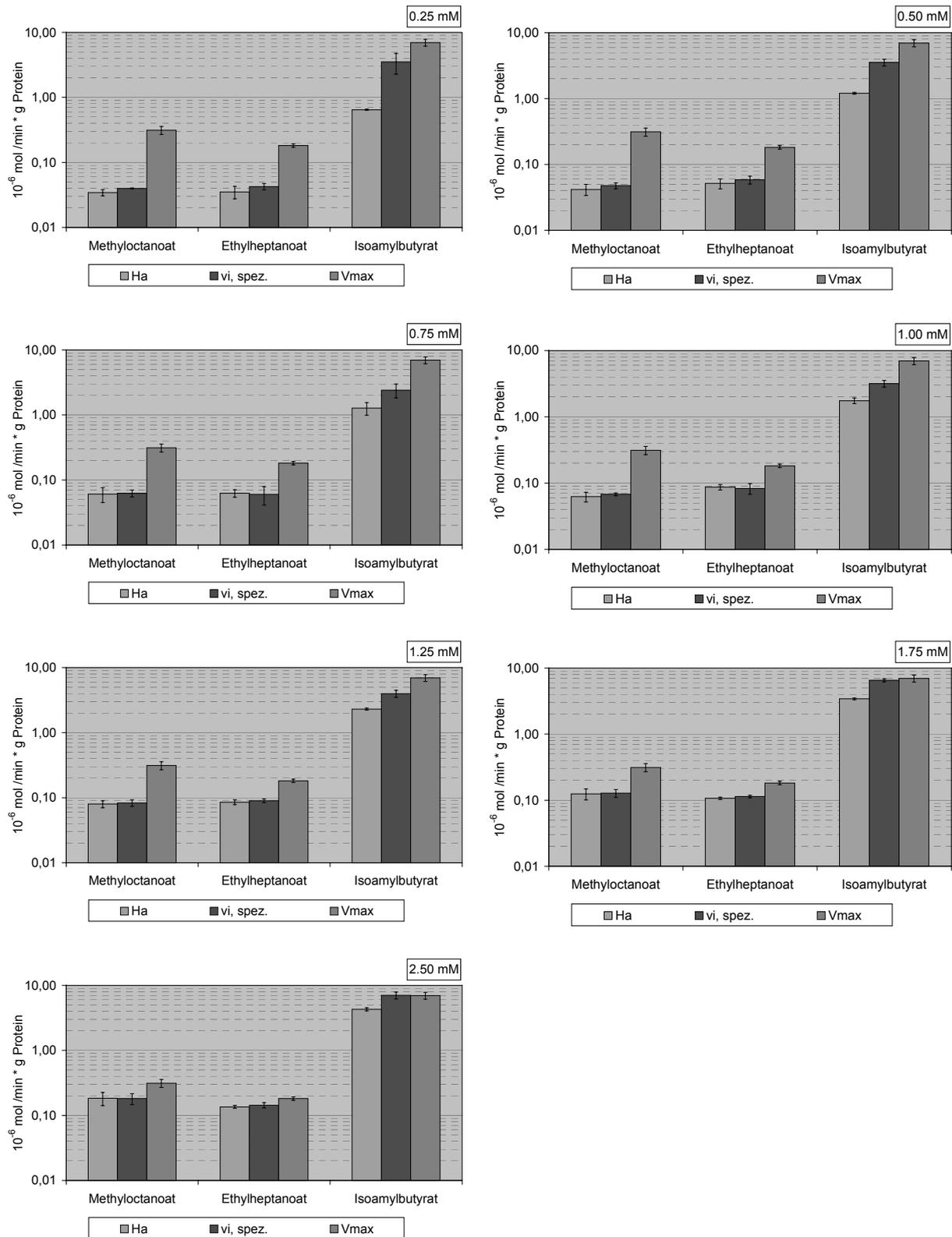


Abb. 94: Spezifische Hydrolyseaktivität H_a , Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ sowie Maximalgeschwindigkeit V_{max} von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

(logarithmische Darstellung)

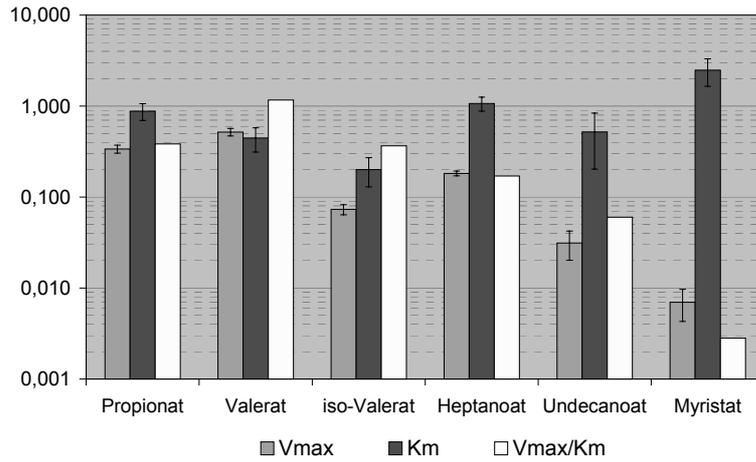


Abb. 95: Kinetische Parameter von Ethylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma

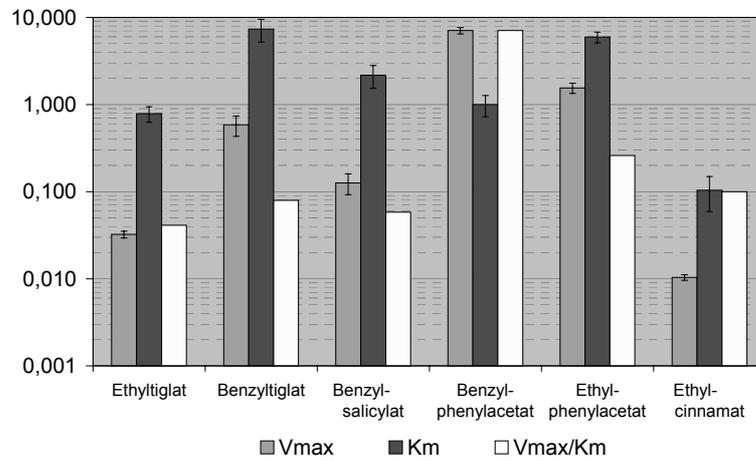


Abb. 96: Kinetische Parameter von Ethyl- und Benzylestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma

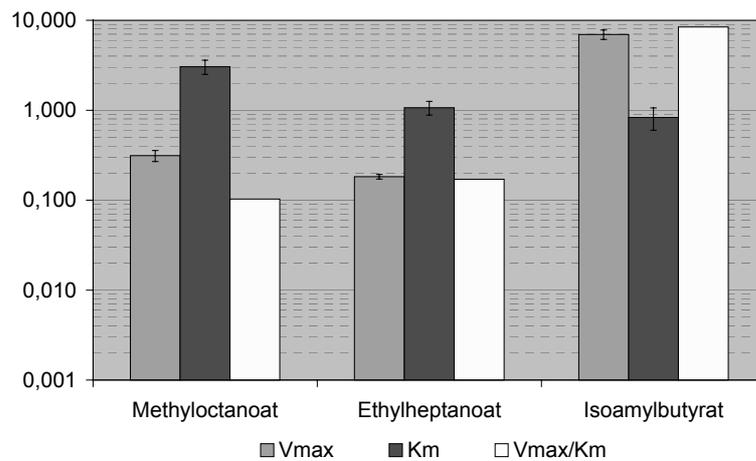


Abb. 97: Kinetische Parameter von Estern mit identischer Summenformel und verschiedener chemischer Struktur bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma

V_{max} [10⁻⁶ mol/min * g Protein]; K_m [10⁻³ mol/L]; V_{max}/K_m [10⁻³ l/min * g Protein]

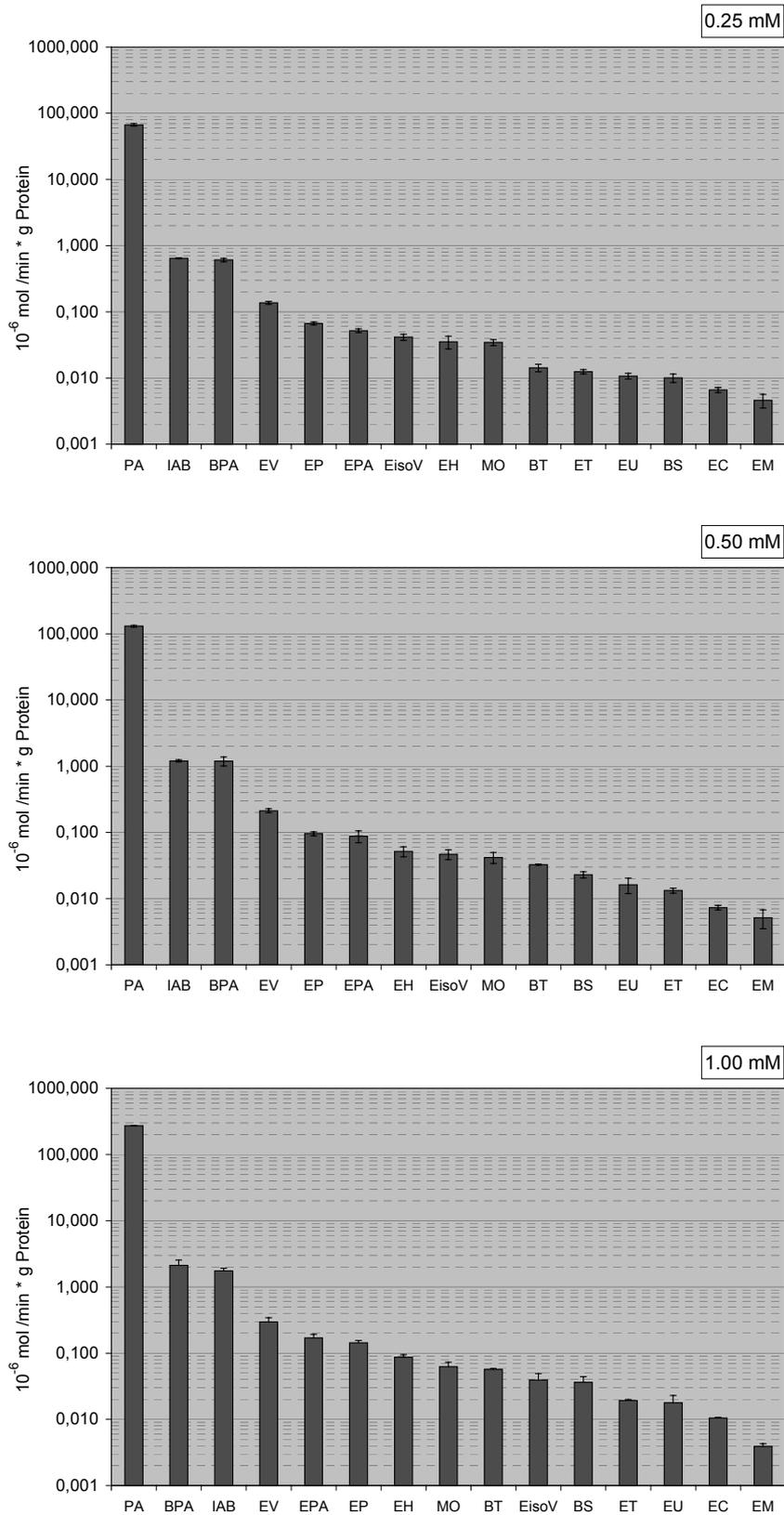


Abb. 98: Spezifische Hydrolyseaktivität H_a von Humanplasma bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration (Auswahl) (logarithmische Darstellung)

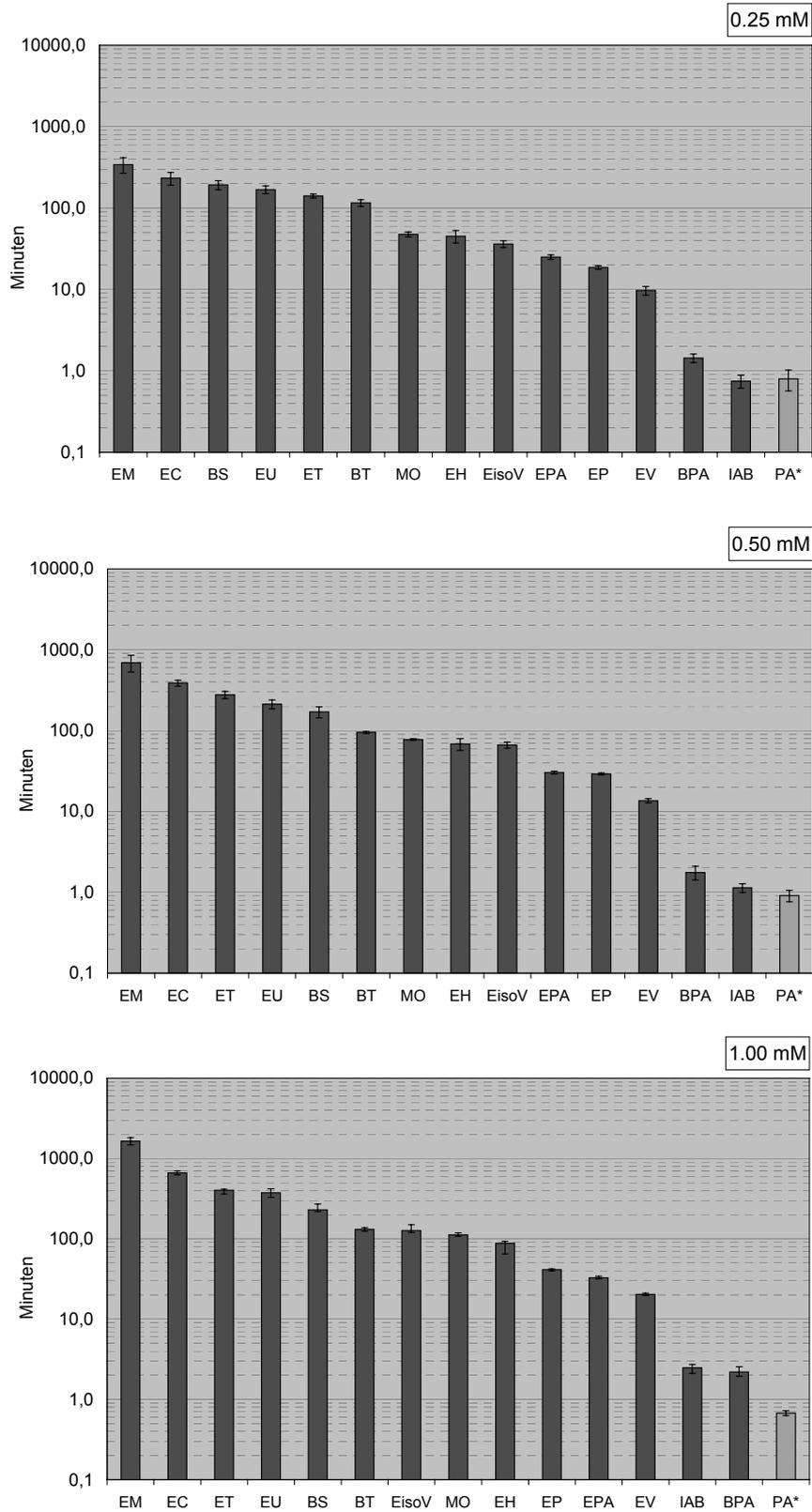


Abb. 99: Halbwertszeit $t_{1/2}$ von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma in Abhängigkeit von der Substratanfangskonzentration

(Auswahl) (logarithmische Darstellung)

* Humanplasma 1:100 verdünnt

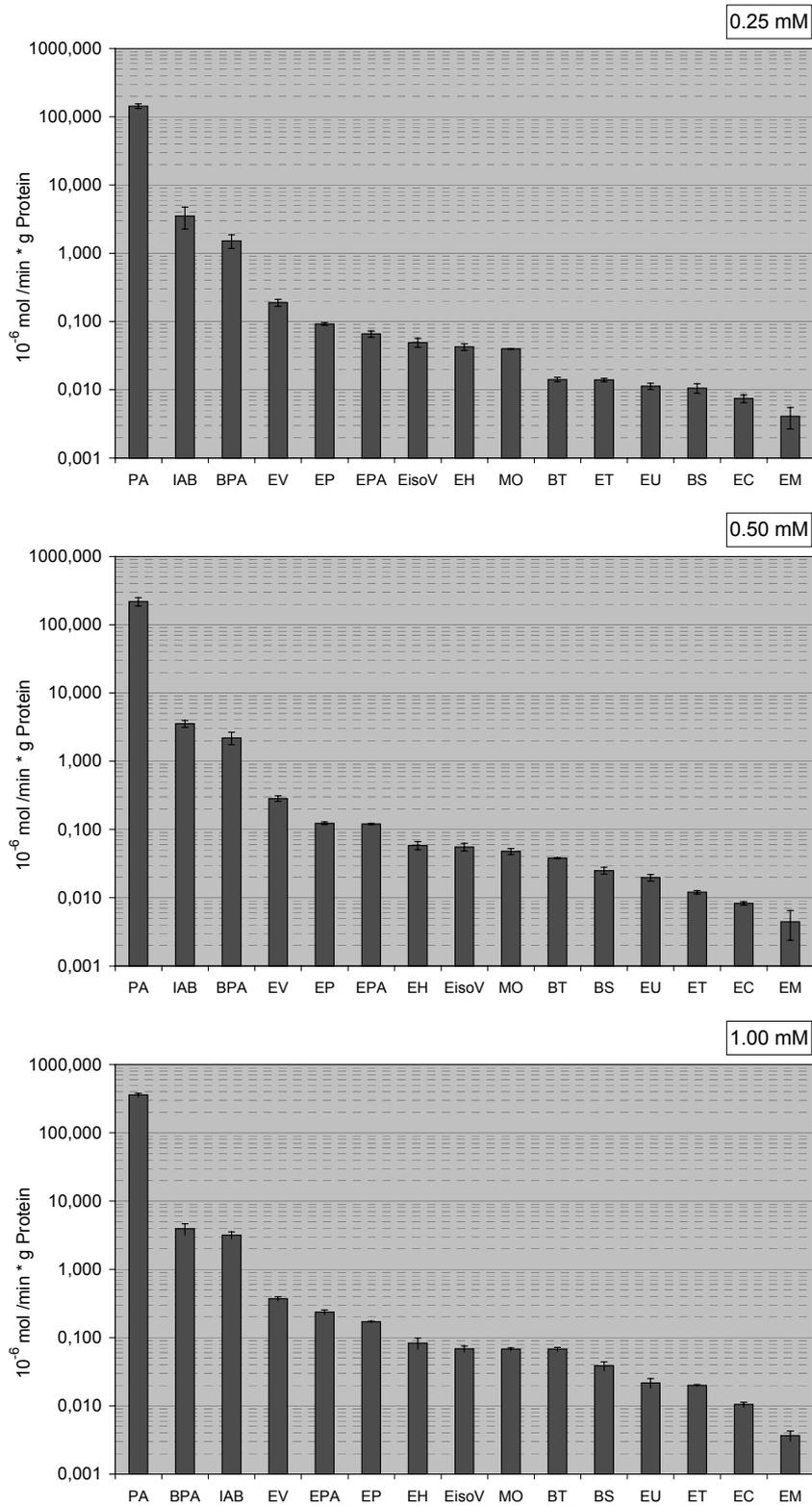


Abb. 100: Spezifische Initialgeschwindigkeit $v_{i, \text{spez.}}$ von Carbonsäureestern bei der enzymatischen Hydrolyse in Humanplasma

Lebenslauf

Name: Verena Arnold, geb. List
 Geburtsdatum: 02.07.1971
 Geburtsort: Annahütte /Niederlausitz
 Familienstand: verheiratet
 Kinder: eine Tochter (geb. 10.09.2004)

Ausbildung

Schule: 1978 – 1988 Polytechnische Oberschule in Annahütte/Niederlausitz
 Abschluss: mittlere Reife
 1988 – 1990 Erweiterte Oberschule in Senftenberg
 Abschluss: Abitur

Hochschulstudium: 1990 – 1991 Studium Fachrichtung Biotechnologie,
 Technische Hochschule Köthen /Sachsen-Anhalt
 1991 – 1996 Studium der Lebensmittelchemie,
 Technische Universität Berlin
 Abschluss: 16.01.1996 Staatsprüfung in Lebensmittelchemie, Teil A
 01 – 09/1996 Diplomarbeit „Analytik zur Charakterisierung von Alkylpoly-
 glucosiden mittels Carbohydrolasen“,
 Abschluss: 30.09.1996 Diplom-Hauptprüfung

10/1996 - 09/1997 Praktikantin der Lebensmittelchemie an der Landesuntersuchungsanstalt
 für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen
 Abschluss: 26.09.1997 Staatsprüfung in Lebensmittelchemie, Teil B

Promotion: 02/1998 – 02/2003 Prüfleiterin und Doktorandin im Fachbereich
 „Toxikologie der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände“ des
 Bundesinstituts für Risikobewertung (früher BgVV, Bundesinstitut für
 gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) in Berlin
 Thema: „Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der enzymatischen Hydrolyse
 von Carbonsäureestern“

Beruf: seit 05/2003 Qualitätsmanagerin und stellvertretende Laborleiterin im
 Bereich Produktanalytik der Dr. Weßling Gruppe in Altenberge

Münster, 27.03.2005