

Aus der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Entwicklung einer Analysenmethode zur sensitiven Bestimmung  
von Retinoiden in biologischen Matrices  
sowie  
ihre Anwendung in der Untersuchung des Einflusses  
von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin auf den Vitamin-A-Metabolismus**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Chem. Carsten Schmidt**  
geboren am 25.03.1971 in Schwerte/Ruhr

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. H. Nau

Referent: Prof. Dr. G. Wunsch

Korreferent: Prof. Dr. H. Nau

Tag der Promotion: 29.11.2001

Meinen Eltern





## Zusammenfassung

Vitamin A und seine Derivate (Retinoide) sind für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Mensch und Tier von grundlegender Bedeutung. Toxische Umweltchemikalien aus der Gruppe der Organohalogen-Verbindungen, wie polychlorierte Dibenzodioxine, können die Homöostase von Retinoiden beeinflussen.

Ausgehend von methodischen Ansätzen aus der Literatur und deren Anpassung und Optimierung mit Hilfe von theoretischen Betrachtungen wurde eine neue empfindliche Methodik zur Messung von Retinoiden in unterschiedlichen biologischen Matrices ausgearbeitet. Nach einer einfachen Flüssig-Extraktion von polaren und unpolaren Retinoiden aus der Matrix, werden der aktive Metabolit *all-trans*-Retinsäure und andere polare Retinoide über eine automatisierte Festphasenextraktion von unpolaren Retinoiden und einem Großteil der Matrix abgetrennt. Die beiden entstehenden Retinoid-Fractionen werden anschließend getrennt voneinander über zwei HPLC-UV-Systeme vermessen. Für die unpolaren Retinoide wurde ein *Normalbore-Reversed-Phase*-System etabliert. Dieses System ermöglicht eine schnelle Trennung von Retinol, Retinal und allen wichtigen Retinylestern. Im Bereich der polaren Retinoide wird zur Steigerung der Empfindlichkeit eine *Reversed-Phase*-Trennung mit einer *Microbore*-Säule (2 mm) eingesetzt. Die Methodik wurde validiert und ist routinetauglich. Ausgehend von einer Probenmenge von 200 mg liegt die Nachweisgrenze für *all-trans*-Retinsäure bei ca. 0,3 ng/g Gewebe. Die Methodik wurde auf ein großes Spektrum biologischer Proben verschiedener Spezies angewandt. Endogene Gehalte polarer und unpolarer Retinoide wurden in Plasma, Niere, Leber, Gehirn, Plazenta, fetalen Geweben und Embryonen von Nagern (Mäuse und Ratten) und in humanen Leber- und Plasma-Proben bestimmt. Vielfach wurden die endogenen Spiegel der polaren Retinoide im Rahmen dieser Arbeit erstmalig bestimmt. Dabei wurde ein neuer endogener Vitamin-A-Metabolit entdeckt: 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure. In einer Fütterungsstudie in Mäusen konnte gezeigt werden, daß dieser Metabolit bei einer gesteigerten Vitamin-A-Zufuhr in Serum, Leber und Niere deutlich erhöhte Konzentrationen aufweist. Interessanterweise führte die subchronische Exposition mit erhöhten Mengen Retinylpalmitat aber auch zu verringerten *all-trans*-Retinsäure-Spiegeln in Serum, Niere und Gehirn.

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) zeigt einen beachtlichen Einfluß auf den Stoffwechsel von unpolaren und –wie hier erstmals gezeigt- polaren Retinoiden in Ratte und Maus. TCDD-belastete Ratten und Mäuse wiesen drastisch verringerte hepatische Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten auf. Ratten zeigten niedrigere 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Serum und höhere *all-trans*-Retinsäure-Spiegel in Niere, Leber und Serum. Untersuchungen mit verschiedenen Retinoid-Bindeprotein-*Knock-Out*-Mäusen haben gezeigt, daß das zelluläre Retinol-bindende Protein CRBP-I Retinol vor einer übermäßigen

Oxidation durch TCDD-induzierte Enzyme schützen kann. Eine pränatale TCDD-Exposition in trächtigen Ratten bewirkte leichte, aber signifikante Änderungen fetaler und embryonaler Retinoid-Spiegel. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnte unter Berücksichtigung relevanter Erkenntnisse aus der Literatur eine Hypothese aufgestellt werden, die den Mechanismus einer Störung des Vitamin-A-Metabolismus durch TCDD erklärt. Demnach führt die Induktion TCDD-abhängiger Enzyme zu einem gesteigerten Metabolismus von Retinol. Steigende all-*trans*-Retinsäure-Spiegel können ihrerseits sowohl durch eine Autoinduktion ihres Abbaus als auch durch TCDD-induzierte Enzyme teilweise ausgeglichen werden. Im Netto ergibt sich eine erhöhte Oxidation und Ausscheidung von Retinoiden bei höheren (Ratte) oder unveränderten (Maus) all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln. Die einschneidende Störung des Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure in TCDD-belasteten Ratten weist darauf hin, daß eine TCDD-Belastung über veränderte all-*trans*-Retinsäure-Spiegel möglicherweise die Transkription einer Vielzahl von Genen verändern kann. Die Beeinflussung der Vitamin-A-Homöostase durch TCDD hat damit das Potential signifikant zur Gesamttoxizität von TCDD beizutragen.

Schlagworte: Retinoid; Analytik; 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin

## Abstract

Vitamin A and its derivatives (retinoids) are essential for a number of physiological processes in the animal and human. Toxic, environmental pollutants of the organohalogen compound family such as polychlorinated dibenzodioxins are capable of disturbing the homeostasis of retinoids.

Starting out from methodical approaches from the literature that have been adapted and optimized with the help of theoretical considerations, a novel sensitive method for the analysis of retinoids in various biological matrices has been developed. Following liberation of polar and apolar retinoids from the matrix using a single liquid extraction, the active metabolite all-*trans*-retinoic acid and other polar retinoids are separated from apolar retinoids and a major part of the matrix using an automated solid phase extraction. The two obtained fractions are separately analyzed with two HPLC-UV-systems. For the analysis of apolar retinoids a normalbore reversed-phase-system has been established. This system allows a fast separation of retinol, retinal, and all relevant retinyl esters. In order to increase sensitivity, a reversed-phase-separation using a microbore column (2 mm) was applied for the analysis of polar retinoids. The method was validated and found to be reliable for routine analysis. Using a sample amount of 200 mg tissue, the limit of detection for all-*trans*-retinoic acid is about 0.3 ng/g tissue. The method was successfully applied to the analysis of several biological samples of different species. Endogenous levels of polar and apolar retinoids have been determined in plasma, kidney, liver, brain, placenta, fetal tissues, embryos of rodents (mice and rats), and in human liver and plasma samples. Within the scope of this work, endogenous levels of polar retinoids were most often determined for the first time. This method led to the discovery of a so far unknown vitamin A metabolite that could be characterized as 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-retinoic acid. A feeding study with mice demonstrated that a higher retinyl palmitate intake resulted in elevated levels of this metabolite in serum, liver, and kidney. Most interestingly, the subchronic exposure to higher amounts of retinyl palmitate resulted in decreased all-*trans*-retinoic acid levels in serum, kidney, and brain.

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) shows a significant impact on the metabolism of apolar and –as shown here for the first time- polar retinoids in rats and mice. Levels of the newly discovered metabolite were drastically decreased in TCDD-treated rats and mice. Rats showed lower 9,13-di-*cis*-retinoic acid levels in serum and elevated all-*trans*-retinoic acid levels in kidney, liver, and serum. Investigations using various retinoid binding protein knock-out mice demonstrated that the cellular retinol binding protein CRBP-I is capable of protecting retinol from an excessive oxidation by means of TCDD-induced enzymes. A prenatal TCDD-exposure in pregnant rats resulted in slight, but significant changes of fetal and embryonic retinoid levels. With the results presented in this work and with the aid of

## Abstract

---

relevant literature, it was possible to postulate a hypothesis that explains the mechanism of the interference of TCDD with the metabolism of vitamin A. According to this, the induction of TCDD-dependent enzymes results in an elevated metabolism of retinol. Rising all-*trans*-retinoic acid levels may be partly balanced by auto-induction of its metabolism and/or by TCDD-induced enzymes. The net effect is an increased oxidation and excretion of retinoids with elevated (rat) or unchanged (mice) all-*trans*-retinoic acid steady-state levels. The severe disruption of all-*trans*-retinoic acid metabolism, as seen in TCDD-exposed rats in the present work, points out that the exposure with TCDD may vary the transcription of various retinoid-dependent genes as a result of changed all-*trans*-retinoic acid levels. The disturbance of the homeostasis of vitamin A by TCDD has thus the potential to significantly contribute to the toxicity of TCDD.

Key words: Retinoid; Analysis; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b> .....	<b>3</b>
2.1	Vitamin A und Retinoide .....	3
2.1.1	Retinoid-bindende Proteine .....	3
2.1.2	Aufnahme und Metabolismus .....	4
2.1.3	Biologische Wirkung .....	7
2.1.4	Retinoide in der Embryonalentwicklung .....	9
2.1.5	Symptome einer Hypervitaminose A bzw. Hypovitaminose A .....	10
2.2	TCDD und andere dioxinartige Verbindungen .....	11
2.2.1	Exposition .....	12
2.2.2	Toxikokinetik .....	13
2.2.3	Wirkmechanismus .....	14
2.2.4	Toxische Wirkungen bei Tieren und Menschen .....	16
2.3	Wechselwirkungen von Retinoiden und dioxinartigen Substanzen .....	18
2.3.1	Ähnlichkeiten in der Toxizität .....	18
2.3.2	Einfluß dioxinartiger Substanzen auf endogene Vitamin A-Gehalte und die Retinoid-Signalübertragung .....	18
2.4	Analytik von Retinoiden .....	19
2.4.1	Konzentrationen in biologischen Matrices .....	20
2.4.2	Probenvorbereitung .....	20
2.4.3	Trenntechniken .....	21
2.4.4	Detektion .....	21
	UV/vis-Detektion • Fluoreszenzdetektion • Elektrochemische Detektion • Massenspektrometrische Detektion • Kopplungen mit <sup>1</sup> H-Kernresonanzspektroskopie ( <sup>1</sup> H-NMR)	
2.4.5	Analytik unpolarer Retinoide .....	24
2.4.6	Analytik polarer Retinoide .....	25
<b>3</b>	<b>Methodenentwicklung zur Analytik von Retinoiden</b> .....	<b>26</b>
3.1	Anforderungen an die Methodik .....	26
3.2	Konzept zur Vorgehensweise .....	26
3.3	Standards .....	27
3.3.1	Gehaltsbestimmungen der Standardlösungen im UV-Bereich .....	27
3.4	Probenvorbereitung .....	29

3.4.1	Allgemeine Betrachtungen .....	29
	Stabilität der Analyten • Probenkontamination	
3.4.2	Flüssig-Extraktion .....	30
	Chloroform/Methanol-System • 2-Propanol/Chloroform-System	
3.4.3	Festphasenextraktion .....	32
	Traditionelle SPE-Säulen (Aminopropyl-Phase) • Automatisierung • Partikelbeladene Membranen (Disk-Technologie)	
3.4.4	Probenvorbereitung für die Injektion .....	37
	Konzentrierung • Wiederaufnahme	
3.4.5	Vergleich der neuentwickelten Probenvorbereitungssysteme.....	39
3.4.6	Stellenwert.....	40
3.5	Chromatographische Bestimmung der unpolaren Retinoide .....	42
3.6	Chromatographische Bestimmung der polaren Retinoide .....	47
3.6.1	Theoretische Grundlagen zur Optimierung der Säulenparameter .....	47
	Säulendimensionen • Teilchendurchmesser der Packung	
3.6.2	Methodenauswahl und Optimierungskonzept.....	48
3.6.3	Problematik einer Miniaturisierung in der Praxis .....	48
	Totvolumina und Detektorzelle • Pumpen • Ausgasungen in der Detektorzelle • Injektionsvolumen • „Scaling Down“	
3.6.4	Eignung der Miniaturisierung zur Steigerung der Empfindlichkeit bei der Analytik von polaren Retinoiden .....	51
	Injektionen mit großem Volumen	
3.7	Validierung.....	58
3.7.1	Interne Standards.....	59
3.7.2	Kalibrierung und Linearität.....	59
3.7.3	Präzision .....	62
3.7.4	Richtigkeit .....	63
3.7.5	Wiederfindung.....	65
3.7.6	Robustheit und Selektivität .....	67
3.7.7	Stabilität der Retinoide während der Analyse.....	72
3.7.8	Nachweisvermögen .....	74
3.8	Ergänzungsmethoden .....	75
3.8.1	Methode zur Bestimmung der Glukuronide.....	75
3.8.2	Methoden zur Trennung von 9,13-di- <i>cis</i> -Retinsäure und 13- <i>cis</i> -Retinsäure .....	76
3.9	Übertragung der Methodik auf ein LC-DAD/MS <sup>n</sup> -System.....	77
3.9.1	Theoretische Grundlagen .....	77
	Electrospray-Interface (ESI) • Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization-Interface (APCI)	

---

3.9.2 Anwendung zur Analytik von polaren Retinoiden.....	80
ESI-Interface • APCI-Interface	
<b>4 Charakterisierung eines unbekanntes Vitamin-A-Metaboliten .....</b>	<b>95</b>
4.1 Retentionszeiten und Untersuchungen der Isomerisierung.....	96
4.2 UV-Spektren.....	99
4.3 MS <sup>n</sup> -Fragmentspektren.....	102
4.4 <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie .....	105
4.5 Zusammenfassung.....	113
<b>5 Endogene Retinoid-Spiegel und ihre Beeinflussung durch TCDD .....</b>	<b>116</b>
5.1 Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A in Mäusen - eine subchronische Exposition mit Retinylpalmitat.....	116
Ergebnisse • Diskussion	
5.2 Untersuchungen des Retinoid-Metaboliten-Musters in humanen Lebern und humanem Plasma.....	125
5.3 Untersuchungen zum Einfluß von TCDD auf den Metabolismus von Vitamin A in der Ratte .....	128
Ergebnisse • Diskussion	
5.4 Retinoid-Bindeprotein-Knock-Out-Mäuse: Endogener Retinoid-Status und Auswirkung einer TCDD-Exposition in der Leber .....	140
Ergebnisse • Diskussion	
5.5 Effekt einer TCDD-Exposition auf die Vitamin-A-Homöostase in trächtigen Ratten.....	147
Ergebnisse • Diskussion	
5.6 Zusammenfassung.....	154
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>157</b>
<b>7 Experimentelles .....</b>	<b>160</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>194</b>
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	230
Veröffentlichte Teilergebnisse.....	233
Danksagung.....	234
Lebenslauf.....	235





## 1 Einleitung und Problemstellung

Vitamin A und seine Metaboliten (Retinoide) sind essentiell für die Aufrechterhaltung einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Wachstum und Differenzierung unterschiedlichster Zellen, Sehzyklus, Reproduktion, Immunfunktion und Embryonalentwicklung (1-5). Retinoide werden als Vitamine klassifiziert, da sie zur Aufrechterhaltung von Gesundheit und Leistungsfähigkeit des Organismus notwendig sind, aber nicht vom Organismus synthetisiert werden können. Stattdessen muß Vitamin A über die Nahrung zugeführt werden. Aktiver Metabolit ist in vielen Fällen all-*trans*-Retinsäure, die endogen in einem zweistufigen Oxidationsmechanismus aus dem Vitamin-A-Alkohol (all-*trans*-Retinol) synthetisiert wird. Die biologische Wirkung von all-*trans*-Retinsäure erfolgt durch Interaktionen mit mehreren Isoformen von nukleären Rezeptoren, die zur Steroid-Rezeptor-Superfamilie gehören und nach Bindung von Retinsäure die Transkription spezifischer Gene kontrollieren (6). Aufgrund der Vielzahl der physiologischen Funktionen ist die Homöostase wichtiger Vitamin-A-Formen im Organismus genau geregelt (7-9).

Dioxine (polychlorierte Dibenzodioxine, PCDDs) und dioxinartige Verbindungen, wie polychlorierte Biphenyle (PCBs) oder Dibenzofurane (PCDFs), sind toxische, weit verteilte, persistente Umweltchemikalien unterschiedlicher Herkunft. Der Eintritt in die humane Nahrungskette erfolgt auf den Wegen Luft-Pflanze-Tier und Wasser-Sediment-Fisch. Aufgrund der lipophilen Struktur und biologischen Stabilität dieser Stoffe kommt es im Menschen und anderen Spezies zu einer Bioakkumulation. Das „Seveso-Gift“ 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) ist der toxischste Vertreter dieser Klasse und wird als Modell-Substanz für dioxinartige Verbindungen besonders intensiv untersucht (10-14).

Die Tatsache, daß Dioxine die Homöostase von Vitamin A beeinflussen, ist schon seit einiger Zeit bekannt (15). Bisherige *in-vivo*-Studien im Tiermodell zeigten aber prinzipiell nur Änderungen der Gehalte von den physiologisch dominierenden unpolaren Retinoiden (Retinol und Retinylester). Die Änderung der Homöostase der endogen in wesentlich geringeren Konzentrationen auftretenden polaren Retinoide, insbesondere des aktiven Metaboliten all-*trans*-Retinsäure, wurde bisher nicht untersucht.

Die Bestimmung endogener Retinsäure-Spiegel in Plasma und Geweben ist naturgemäß schwierig und erfordert eine empfindliche Analytik. Einerseits sind die Konzentrationen der polaren Retinoide in biologischen Materialien in der Regel sehr niedrig (im Bereich weniger ng/g), andererseits stehen häufig nur sehr kleine Probenmengen für die Analysen zur

Verfügung. Die Labilität der Retinoide, ihre Vielfalt und die beträchtlichen Konzentrationsunterschiede zwischen unpolaren und polaren Retinoiden in biologischen Materialien erschweren die Bestimmung zusätzlich. Existierende Methoden zur Bestimmung polarer Retinoide weisen entweder nicht die erforderliche Empfindlichkeit auf oder sie sind nur für einzelne Matrices, wie beispielsweise Plasma, geeignet. Andere Methoden sind sehr aufwendig, schließen die Bestimmung der unpolaren Retinoide in derselben Probe aus oder erfordern eine große Probenmenge (16-18).

Ziel dieser Dissertation war es, eine empfindliche, routinefähige Analysenmethode zu entwickeln, die es ermöglicht, polare und unpolare Retinoide in einer einzigen mengenmäßig begrenzten Probe zu bestimmen. Die zu entwickelnde Methode sollte zudem auf ein großes Spektrum biologischer Proben anwendbar sein. Im Anschluß sollten physiologische Retinoid-Spiegel in unterschiedlichen biologischen Proben bestimmt und der Einfluß einer TCDD-Exposition auf die Homöostase von polaren und unpolaren Retinoiden in Ratten und Mäusen untersucht werden. Neue Erkenntnisse über Art und Mechanismus einer Störung des Vitamin-A-Metabolismus und der Homöostase des aktiven Metaboliten *all-trans*-Retinsäure, sollten Anhaltspunkte liefern können, ob eine solche Störung möglicherweise signifikant zur Gesamtoxizität von TCDD beitragen kann.



bindenden Proteins (CRBP-I und CRBP-II) assoziiert. *All-trans*-Retinsäure wird intrazellulär an eines von zwei zellulären Retinsäure-bindenden Proteinen (CRABP-I und CRABP-II) gebunden. Immer mehr deutet darauf hin, daß Retinoid-bindende Proteine auch Transport, Metabolismus und Wirkung der einzelnen Retinoide dirigieren und regulieren (19).

### 2.1.2 Aufnahme und Metabolismus

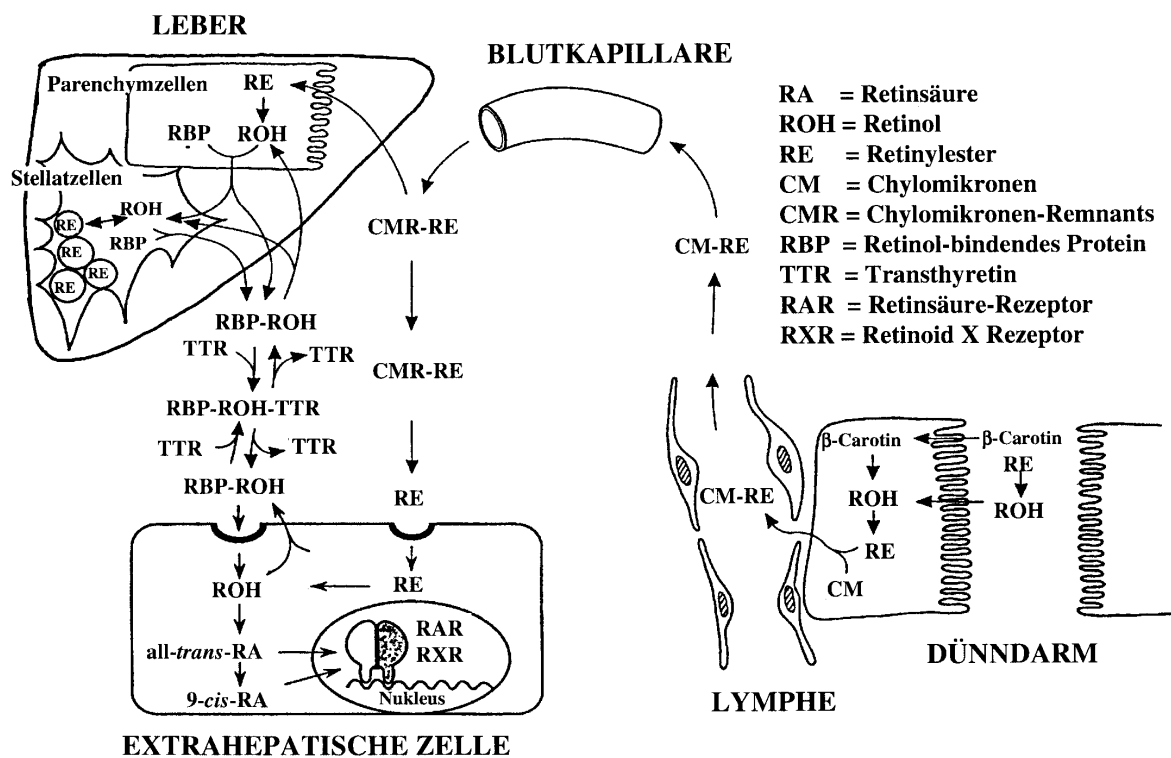
Allgemein muß zwischen der Aufnahme von Carotinoiden, insbesondere dem  $\beta$ -Carotin, aus pflanzlichen Quellen und der Aufnahme von Retinol (ROH) bzw. Retinylestern (RE) aus tierischen Produkten unterschieden werden (**Abb. 2-2.**).

$\beta$ -Carotin wird im Darm über das Enzym  $\beta$ -Carotinoid-15,15'-Dioxygenase (BCDO) an der zentralen Doppelbindung oxidativ gespalten. Es entstehen zwei Moleküle Retinal, die weiter zu Retinol oder Retinsäure metabolisiert werden (20).

Die lipophilen Retinylester werden im Zuge der Fettverdauung über eine Pankreaslipase und eine Cholesterolesterase hydrolysiert (20). Retinol wird in die Mucosazellen resorbiert und dort mit langkettigen Fettsäuren wieder reverestert. Dazu stehen prinzipiell zwei mikrosomale Enzyme zur Verfügung: eine Acyl-CoA:Retinol-Acyltransferase (ARAT) und eine Lecithin:Retinol-Acyltransferase (LRAT). Bei physiologischer Zufuhr wird Retinol zunächst an ein spezielles Protein (CRBP-II) gebunden und dann über LRAT verestert. Bei Resorption sehr großer Mengen Retinol ist auch eine direkte Veresterung über ARAT möglich. Durch Einbau in Chylomikronen (CM) erfolgt die Ausschleusung *via* Lymphbahnen in das Blut. Nach Umbau der Chylomikronen zu Remnants (REM) werden diese rezeptorvermittelt durch die Parenchymzellen der Leber aufgenommen. Nach Hydrolyse der Retinylester kann Retinol in den Parenchymzellen an CRBP-I gebunden und zu den perisinusoidalen Stellatzellen der Leber transportiert werden (21). Dort wird es wahrscheinlich durch LRAT wieder reverestert und bildet so den wichtigsten Vitamin-A-Pool (50-80 %) des Körpers (21,22). Bei Bedarf katalysiert eine neutrale Gallensalz-unabhängige Retinylester-Hydrolase die Mobilisierung der Retinylester (22). Die Ausschleusung von Vitamin A aus der Leber in das Blut erfolgt als Retinol, gebunden an RBP. Der RBP-Retinol-Komplex würde aufgrund seines geringen Molekulargewichts (21000) sehr schnell über die Niere verloren gehen. Daher erfolgt im Plasma eine reversible molare Komplexbildung (1:1) mit Transthyretin (TTR), die aufgrund des erhöhten Molekulargewichts (73000) eine glomeruläre Filtration verhindert (9).

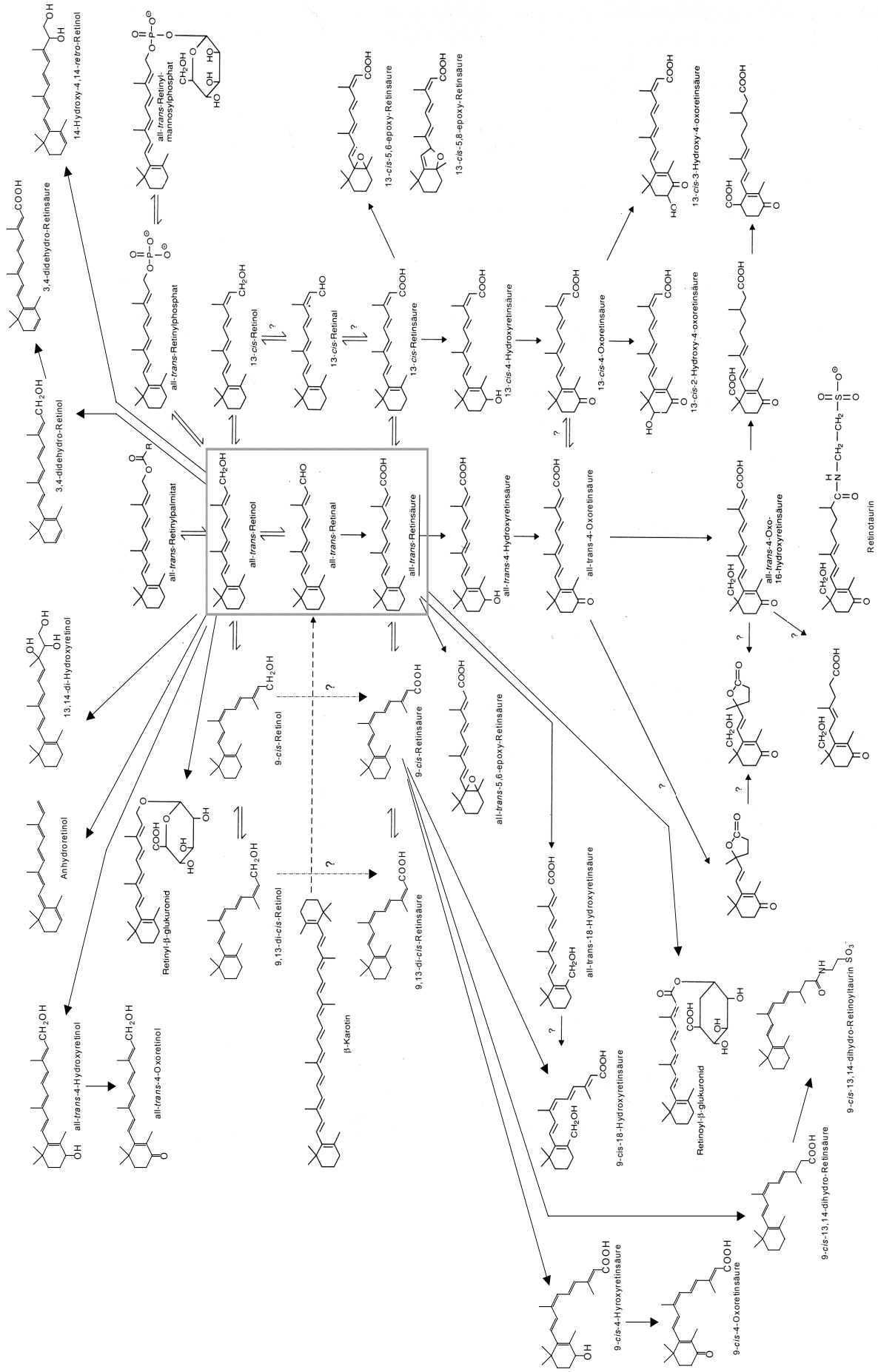
Die zelluläre Aufnahme von Retinoiden kann über mehrere Wege erfolgen. Einerseits wird RBP-gebundenes Retinol freigesetzt, wahrscheinlich nach Bindung an einen Rezeptor (9).

Nach der Resorption erfolgt intrazellulär eine Bindung an CRBP und eine Oxidation über Retinal zu Retinsäure (RA). Andererseits kann Retinol auch enzymatisch durch LRAT veresterert werden. Die entstehenden Retinylester stellen einen intrazellulären, durch Hydrolyse verfügbaren Speicher dar (9). Retinylester können auch direkt aus dem Fettstoffwechsel stammen: Beim Abbau der Chylomikronen zu Remnants werden durch eine Lipoproteinlipase (LPL) neben freien Fettsäuren auch Retinylester freigesetzt und in die Zelle aufgenommen. Hierdurch ist eine Versorgung der Zielzellen mit Vitamin A unabhängig von der gesteuerten Ausschleusung des RBP-TTR-Retinol-Komplexes aus der Leber möglich (23). Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Einschleusung oral aufgenommener Retinsäure. Diese wird im Blut an Albumin gebunden transportiert und kann die Zellmembranen passieren (9).



**Abb. 2-2.** Vereinfachtes Schema für Transport und Metabolismus von Retinol und Retinylestern im Verdauungstrakt, in der Zirkulation und in der Leber sowie innerhalb von Zielzellen (24).

Der gesamte Metabolismus der Retinoide umfaßt ein Vielzahl von Reaktionen und stellt sich überaus komplex dar. Dazu gehören Konjugationen mit Glukuronsäure, Decarboxylierungen, Oxidationen, Epoxidierungen, Isomerisierungen und Veresterungen. **Abb. 2-3.** gibt einen Überblick.



**Abb. 2-3.** Der Metabolismus von Retinoiden (modifiziert nach (25-27)). Die besonderen Stoffumwandlungen im Auge sind hier nicht dargestellt. Von den zahlreichen möglichen glukuronidierten Retinoiden sind beispielhaft nur die Glukuronide von all-trans-Retinol und all-trans-Retinsäure aufgeführt. 9,13-di-cis-Isomere können auch aus einer 13-cis-Struktur entstehen.

Der Abbau von Retinol und Retinsäure in der Leber bzw. in peripheren Geweben verläuft über konjugierte oder oxidierte Formen. Vitamin-A-Derivate mit intakter Seitenkette werden dabei vorwiegend über die Fäzes eliminiert, während seitenverkürzte Produkte mit dem Urin ausgeschieden werden können. Die Ausscheidung über Fäzes und Urin steht etwa im Verhältnis 2:1 (28,29).

Wegen der hohen biologischen Aktivität von *all-trans*-Retinsäure ist die metabolische Homöostase dieser Verbindung von besonderem Interesse. Der zelluläre Metabolismus von *all-trans*-Retinol beinhaltet die Umwandlung zu *all-trans*-Retinsäure in einer zweistufigen Reaktion, die in einem ersten geschwindigkeitsbestimmenden reversiblen Schritt mit der Oxidation zu *all-trans*-Retinal eingeleitet wird. Unter normalen Bedingungen sind mikrosomale (SDRs) und/oder zytosolische Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) für diesen Schritt verantwortlich. Die folgende Oxidation von *all-trans*-Retinal zu *all-trans*-Retinsäure ist eine irreversible schnelle Reaktion, die durch Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDHs) überwiegend im Zytosol stattfindet (30).

Mit der Umwandlung von Retinsäure in Hydroxy- und Oxo-Metaboliten werden zahlreiche Mitglieder der Cytochrom-P450-Familie mit einer breiten Substratspezifität in Zusammenhang gebracht. Ein kürzlich identifiziertes, durch *all-trans*-Retinsäure induzierbares Cytochrom P450, das CYP26 ist aufgrund seiner hohen Substratspezifität ungewöhnlich. CYP26 oxidiert *all-trans*-Retinsäure zu polareren Metaboliten, jedoch nicht *9-cis*- oder *13-cis*-Retinsäure. Retinsäuren und ihre oxidierten Formen können zur Bildung von wasserlöslichen Metaboliten glukuronidiert werden (20,31).

### 2.1.3 Biologische Wirkung

Die physiologischen Funktionen der Retinoide lassen sich in drei Wirkungsbereiche einteilen: 1. die Wirkung auf Wachstum, Entwicklung und Differenzierung von Epithelgeweben; 2. die Beteiligung an Reproduktionsvorgängen, die die Spermatogenese, das embryonale Wachstum und die Entwicklung der Plazenta betreffen und 3. die Beteiligung im Sehprozeß.

Bei den somatischen Funktionen Wachstum, Entwicklung und Differenzierung sind *all-trans*-Retinol und *all-trans*-Retinsäure wirksam. Die biologische Wirkung ist hier auf *all-trans*-Retinsäure zurückzuführen. *All-trans*-Retinol ist nur deshalb wirksam, weil es zu *all-trans*-Retinsäure oxidiert werden kann.

Im Bereich der Reproduktion ist *all-trans*-Retinol wirksam und kann nicht durch *all-trans*-Retinsäure ersetzt werden (32-34). Obwohl *all-trans*-Retinsäure wahrscheinlich der aktive Metabolit in der Spermatogenese ist (35), kann sie *all-trans*-Retinol nicht ersetzen, da sie die Blut-Hoden-Schranke nicht überwinden kann (7). Beim Sehvorgang ist *all-trans*-Retinol nötig. *All-trans*-Retinsäure ist hier unwirksam, weil sie nicht zu *all-trans*-Retinol reduziert werden kann.

Die vielfältigen biologischen Wirkungen von Retinsäuren werden in erster Linie durch zwei Subfamilien nukleärer Retinsäure-Rezeptoren (RAR und RXR) vermittelt, von denen heute mehr als 30 Varianten beschrieben sind. Von beiden Typen sind drei Subtypen bekannt ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), die wiederum in verschiedenen Isoformen vorkommen. *All-trans*-Retinsäure ist ein hochaffiner Ligand für RARs, aber nicht für RXRs. *9-cis*-Retinsäure bindet an beide Rezeptorfamilien (36-38). Weitere biologisch aktive RAR-Liganden sind *all-trans*-4-oxo-Retinsäure (39), 3,4-didehydro-Retinsäure (40,41), 3,4-didehydro-Retinol (42), *all-trans*-4-oxo-Retinol (43,44), *all-trans*-4-oxo-Retinal (45) und 9,13-di-*cis*-Retinsäure (46). Andere Liganden für RARs und RXRs sind *9-cis*-4-oxo-Retinsäure (47) und *9-cis*-3,4-didehydro-Retinsäure (41).

Sowohl der RAR als auch der RXR sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, die nach Aktivierung durch den Liganden im Zellkern die Expression bestimmter Gene einleiten. Dabei agieren beide Rezeptoren nicht einzeln, sondern binden bevorzugt als RAR-RXR-Heterodimere an die DNA. RXRs können auch Homodimere bilden. Der RXR spielt die Rolle eines „Master-Regulators“, da er außer für RAR auch als Heterodimerpartner für andere Rezeptoren der Steroid/Thyroid-Rezeptorsuperfamilie fungiert. Dabei kann es sich z. B. um den Thyroidhormon-Rezeptor (THR), den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) oder den Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) handeln. Je nach Heterodimerisierung können verschiedene Bindungen an die DNA und damit sehr unterschiedliche Genexpressionen erfolgen. Die Bindungsstellen auf der DNA werden als RAREs (*retinoic acid response elements*) bzw. RXREs (*retinoid X response elements*) bezeichnet. Nach Aktivierung der Rezeptoren und Bindung an die DNA wird die Expression einer Vielzahl von spezifischen Genen gestartet. Von diesen kodieren einige selbst wieder für Transkriptionsfaktoren, so daß, nach dem Schneeballprinzip, durch Retinoide eine regelrechte Genkaskade in Gang gesetzt werden kann (6). Retinoid-Rezeptoren interagieren mit Rezeptoren für verschiedene Wachstumshormone, Onkogene, Interleukine, Cytokine oder mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivierungsprotein 1, welches die Genexpression verschiedener Proteine steigert). AP-1 ist ein gutes Beispiel dafür, daß Retinoide die Transkription auch negativ regulieren können, da ligandengebundene RARs und RXRs die AP-1-Aktivität



herabsetzen können. Über ihre vielfältigen rezeptorvermittelten biologischen Wirkungen ist all-*trans*-Retinsäure damit ein wichtiger Regulator für Wachstum und Differenzierung von Zellen und Geweben in der Embryonalentwicklung und im ausgewachsenen Organismus (6,48,49).

Weiterhin gibt es aktive Retinoide, die nicht an die RARs oder RXRs binden, aber essentiell für die Proliferation von Lymphozyten sind: die *Retro*-Retinoide 14-Hydroxy-4,14-*retro*-Retinol (14-HRR) und Anhydroretinol (AR) (50,51) und das Retinoid 13,14-Dihydroxy-Retinol (DHR) (52,53).

#### 2.1.4 Retinoide in der Embryonalentwicklung

Von der ersten Zellteilung an dirigieren mehrere miteinander verbundene Prozesse die Gewebeorganisation, die zunächst zu einem Embryo und dann zu einem Fetus führt. Diese Ereignisse umfassen die Festlegung der axialen Polarität und der Zelldifferenzierung und werden über Signalsubstanzen gesteuert, deren Konzentrationen im Embryo regional unterschiedlich sind. Abhängig von ihrer Position ist eine Zelle vermutlich unterschiedlichen Konzentrationen von all-*trans*-Retinsäure ausgesetzt. All-*trans*-Retinsäure bindet an nukleäre Rezeptoren und verursacht ein spezifisches Muster der Genexpression, das letztlich den physiologischen Phänotypus prägt (54).

RARs und RXRs sind in die Morphogenese involviert. Transgene Mäuse, in denen bestimmte Isoformen oder ganze Gene für verschiedene RARs oder RXRs ausgeschaltet wurden (*Knock-Out*-Mäuse), zeigen entsprechend dem bzw. den unterdrückten Rezeptoren unterschiedliche Mißbildungen. Eine große Anzahl der beobachteten Veränderungen ist mit denen vergleichbar, die im Nachwuchs von Vitamin-A-defizienten Mäusen (Wildtyp) auftreten. Wenn die Mutation nur einen Rezeptor betrifft, überleben die Mäuse und die Mißbildungen sind begrenzt. Dies deutet auf eine Redundanz zwischen den verschiedenen Subtypen und Isoformen hin. Mäuse, denen entweder zwei RAR-Subtypen oder ein RAR und ein RXR $\alpha$  fehlen, zeigen hingegen schwerwiegende Defekte und sterben entweder im Uterus oder kurz nach der Geburt. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß überwiegend RAR-RXR $\alpha$  Heterodimere die Retinoid-vermittelte Signalübertragung während der Embryonalentwicklung bestimmen (54).

Sowohl all-*trans*-Retinsäure als auch die RAR- und RXR-Rezeptoren weisen im sich entwickelnden Embryo ein bestimmtes räumliches und zeitliches Verteilungsmuster auf. Dabei tritt die Expression von RAR $\alpha$  und RXR $\beta$  nahezu ubiquitär auf, wohingegen die

Expression von anderen Subtypen und Isoformen auf spezifische Gewebe und spezifische Stadien der Embryonalentwicklung begrenzt ist. Der räumlich und zeitlich unterschiedliche Bedarf an *all-trans*-Retinsäure in der Embryonalentwicklung verlangt nach einer präzisen Regulation. Der Mechanismus der Regulation ist noch weitgehend unbekannt. Eventuell wird die *all-trans*-Retinsäure-Konzentration über die Expression von Retinoid-Bindeproteinen (CRBP-I und CRABP-I) geregelt, die ebenfalls spezielle Expressionsmuster im sich entwickelnden Embryo aufweisen (54,55).

### **2.1.5 Symptome einer Hypervitaminose A bzw. Hypovitaminose A**

Sowohl der Mangel an Vitamin A als auch die Überversorgung mit Vitamin A oder Retinoiden hat einen großen Einfluß auf die Embryonalentwicklung. Das Muster der Defekte ist jeweils klar ausgebildet, obwohl sie sich auch teilweise überlappen. Typische Kennzeichen einer Vitamin-A-Defizienz sind Schäden des Auges, des Herzens und des Reproduktionssystems. Im Rahmen einer Vitamin-A-/Retinoid-Überversorgung treten kraniofaziale Schäden (Ohr), ZNS-Anomalien (Exenzephalie, Spina Bifida, verzögerte mentale Entwicklung), Thymusdefekte, Herz- und Gefäßanomalien auf. Bei Versuchstieren treten auch Extremitäten-Mißbildungen auf (56).

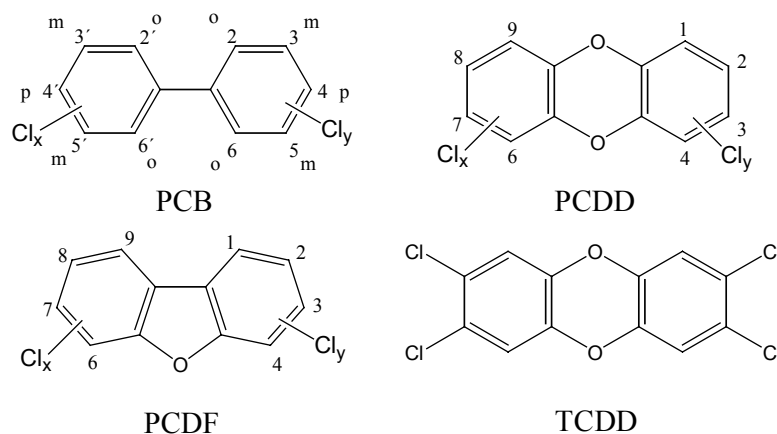
Hinsichtlich der Teratogenität gilt allgemein: (1) die beobachteten Mißbildungen sind abhängig von dem Zeitpunkt der Exposition, (2) der teratogene Effekt ist dabei dosisabhängig, (3) einige Retinoide sind potentere Teratogene als andere und (4) die teratogene Stärke eines Retinoids kann in verschiedenen Tiermodellen variieren (54).

Ein Vitamin-A-Mangel führt im ausgewachsenen Organismus je nach Ausmaß zu Nachtblindheit (Hemeralopie), Xerophthalmie, Keratosen an Haut und Schleimhäuten und zu einer erhöhten Infektanfälligkeit.

Die Symptomatik einer Hypervitaminose A beim Erwachsenen umfaßt Gelenk- und Knochenschmerzen, morphologische Veränderungen der Leber bis zu hepatotoxischen Symptomen sowie Hautschäden. Mildere Erscheinungsformen machen sich durch Kopfschmerzen, Erbrechen und Müdigkeit bemerkbar (25).

## 2.2 TCDD und andere dioxinartige Verbindungen

Dioxinartige Verbindungen wie die polychlorierten Biphenyle (PCBs), Dibenzo-p-dioxine (PCDDs) und Dibenzofurane (PCDFs) sind toxische, weit verteilte, persistente Umweltchemikalien. Alle PCB-, PCDD- und PCDF-Strukturen bestehen aus zwei halogenierten aromatischen Ringen (**Abb. 2-4.**). Je nach Halogenierungsgrad und Substitutionsmuster lassen sich 209 PCBs, 75 PCDDs und 135 PCDFs unterscheiden. Dabei ist die Toxizität dieser einzelnen „Kongeneren“ sehr unterschiedlich. Von besonderem Interesse sind 7 Dioxine und 10 Furane, die an den Positionen 2,3,7 und 8 chloresubstituiert sind und eine besonders hohe Toxizität aufweisen. Unter den PCBs werden vier non-ortho-substituierten und acht mono-ortho-substituierten Kongeneren dioxinartige Eigenschaften zugeschrieben (13,57). Das „Seveso-Gift“ 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) ist der toxischste Vertreter dieser Klasse und wurde als Modell-Substanz für dioxinartige Kongeneren besonders intensiv untersucht.



**Abb. 2-4.** Die chemischen Strukturen von polychlorierten Biphenylen (PCBs), Dibenzo-p-dioxinen (PCDDs), Dibenzofuranen (PCDFs) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD).

Da in Umwelt- und Gewebe-Proben meistens mehrere dioxinartige Verbindungen nebeneinander auftreten, faßt man ihre Wirksamkeit in einem Summenparameter, dem jeweiligen TCDD-Äquivalent (engl. *TCDD equivalent*, I-TEQ) zusammen (13).

PCBs wurden seit 1929 industriell produziert und kamen in den 50er Jahren verstärkt als Transformatorenöl, Hydraulikflüssigkeit, Wärmeüberträger, Dielektrikum von Kondensatoren, als Entflammungsverzögerer und als Weichmacher in Kunststoffen und Lacken in den Handel. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere die niedrigen Dampfdrücke, ihre hohe Viskosität, ihre thermische Stabilität und Chemikalienresistenz

machen sie einerseits für die oben genannten Anwendungen geeignet, führen andererseits auch zu ihrer Beständigkeit in der Umwelt. In der Bundesrepublik wurde die Verwendung von PCBs ab 1978 zunächst nur noch in geschlossenen Systemen (zum Beispiel Transformatoren) gestattet und seit 1989 sind die Herstellung und Verwendung völlig untersagt (10).

Polychlorierte Dibenzofurane und Dibenzodioxine sind dagegen nie absichtlich produziert worden, sondern entstehen vielmehr als unerwünschte Nebenprodukte bei chlorchemischen Prozessen, bei der Müllverbrennung oder der Metallverarbeitung. PCDDs können in sehr begrenzten Mengen bei Bränden und Vulkanausbrüchen auch natürlich entstehen und waren damit schon immer in der Umwelt des Menschen vorhanden (10).

### **2.2.1 Exposition**

Eine humane Exposition mit PCDDs, PCDFs und PCBs kann über Rückstände in der Umwelt, verstärkt bei Betriebsunfällen erfolgen. Es wird geschätzt, daß für die allgemeine Bevölkerung über 90 % der Aufnahme mit der Nahrung durch tierische Produkte erfolgt. Der Eintritt in die humane Nahrungskette erfolgt auf den Wegen Luft-Pflanze-Tier und Wasser-Sediment-Fisch. Aufgrund der lipophilen Natur und biologischen Stabilität dieser Stoffe kommt es in den betroffenen Organismen zu einer Bioakkumulation (11).

In den letzten Jahrzehnten ereigneten sich mehrere Vorfälle, die bei Teilen der Bevölkerung zu einer starken Exposition mit dioxinartigen Verbindungen führten (11). Gut bekannte Beispiele sind die Exposition der lokalen Bevölkerung in Seveso (Italien, 1976) mit TCDD nach einem Störfall bei der Produktion von Trichlorphenol und der Einsatz des Entlaubungsmittels „Agent Orange“<sup>1</sup> durch die Amerikaner in Süd-Vietnam in den Jahren 1962-1971. Eine hohe Exposition kann auch über kontaminierte Nahrungsmittel erfolgen. Bekannte Beispiele sind die Kontaminationen von Speiseöl in Yusho (Japan, 1968) und Yu-Cheng (Taiwan, China, 1979). In jüngster Zeit hat der Dioxinskandal in Belgien die Öffentlichkeit stark beschäftigt (1999). Durch das Strecken von Tier- und Pflanzenfett mit Altöl traten erhöhte Dioxingehalte in Futtermitteln und schließlich auch in Lebensmitteln wie Geflügel- und Schweinefleisch auf.

---

<sup>1</sup> „Agent Orange“ ist eine Mischung der n-Butylester von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure mit Spuren von TCDD

Bestimmte Bevölkerungsgruppen können aufgrund besonderer Verbrauchsgewohnheiten höheren Mengen von Dioxinen und PCBs ausgesetzt sein. Dazu gehören beispielsweise Personen, die viel Fisch aus kontaminierten Gewässern verzehren. Die hohe Exposition von Säuglingen mit dioxinartigen Substanzen über die Muttermilch hat weltweit Besorgnis hervorgerufen (11).

Vor allem als Folge verschärfter Grenzwerte und entsprechender technischer Maßnahmen zeigen die meisten in Umwelt-Proben, Lebensmitteln, Humangewebe und Muttermilch erhobenen Daten rückläufige Tendenzen hinsichtlich der PCDD-, PCDF- und PCB-Gehalte. Die Belastungen gingen dabei innerhalb der letzten Jahre auf die Hälfte zurück (11).

Zahlreiche Studien in Industrieländern belegen eine tägliche Aufnahme an PCDFs und PCDDs in der Größenordnung von 50-200 pg TCDD-Äquivalenten (I-TEQ) pro Person und Tag bzw. 1-3 pg I-TEQ/kg Körpergewicht. Diese Aufnahme führt zu einem durchschnittlichen Gewebe-Spiegel von 10-30 pg I-TEQ/g Fett bzw. zu einer Körperlast von ca. 2-6 ng I-TEQ/kg Körpergewicht. Bei Berücksichtigung der dioxinartigen PCBs (non-ortho- und mono-ortho-PCBs) kann die tägliche Aufnahme an I-TEQ um einen Faktor von 2-3 höher liegen (11,13).

In der Muttermilch kann man zur Zeit von einer durchschnittlichen PCDD/PCDF-Belastung in der Größenordnung von 10 pg I-TEQ/g Milchfett ausgehen. Unter Berücksichtigung der dioxinartigen PCBs erhöhen sich diese Werte etwa um den Faktor zwei. Bezogen auf das Körpergewicht liegt die durchschnittliche tägliche Belastung eines Säuglings damit im Vergleich zu einem Erwachsenen um 1-2 Größenordnungen höher (11).

### **2.2.2 Toxikokinetik**

Die Toxikokinetik von dioxinartigen Verbindungen hängt spezifisch von dem Kongener, der Dosis und der betroffenen Spezies ab und wird dabei im wesentlichen durch folgende Faktoren bestimmt (13):

- die Lipophilie der Substanz und der Anteil des Fettgewebes im Körper
- die Bindung an das Cytochrom P450 CYP1A2 in der Leber
- die Metabolismusrate und die Ausscheidung

Nach oraler Aufnahme werden dioxinartige Substanzen effektiv im Gastrointestinaltrakt absorbiert, wenn sie in Fett gelöst sind, und dann im Körper verteilt. Innerhalb mehrerer

Stunden gelangen sie dann ihrer Lipophilie entsprechend primär in die Leber und in das Fettgewebe (12). Infolge der Bindung an CYP1A2, das durch dioxinartige Verbindungen induziert wird, wird mit steigender Dosis ein immer höherer Anteil in der Leber festgelegt, während die Gehalte in den extrahepatischen Geweben prozentual zurückgehen.

Für die Entgiftung ist der Metabolismus der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dioxinartige Verbindungen werden gewöhnlich über Reaktionen der Hydroxylierung und Glukuronidierung zu polarerer ungiftigen Molekülen metabolisiert, die dann vollständig über Urin und Fäzes ausgeschieden werden. Die Metabolismusrate wird insbesondere durch das Chlor-Substitutionsmuster bestimmt. Nicht-2,3,7,8-substituierte Kongenere werden in größerem Umfang metabolisiert und schneller ausgeschieden (14).

Die Toxikokinetik ist bei verschiedenen Spezies unterschiedlich. Die Halbwertszeit von TCDD in Ratten liegt bei 12-13 Tagen, in Mäusen bei 7-9 Tagen, in Menschen beträgt sie zwischen 5 und 11 Jahre. Um die gleichen Körperlasten zu erreichen wie der Mensch, benötigen Nager aufgrund von toxikokinetischen Unterschieden erheblich höhere Dosen (100- bis 200fach). Aus toxikokinetischer Sicht sollten daher für den Dosisvergleich zwischen verschiedenen Spezies die Körperlast oder die Gewebekonzentration als Parameter herangezogen werden (13).

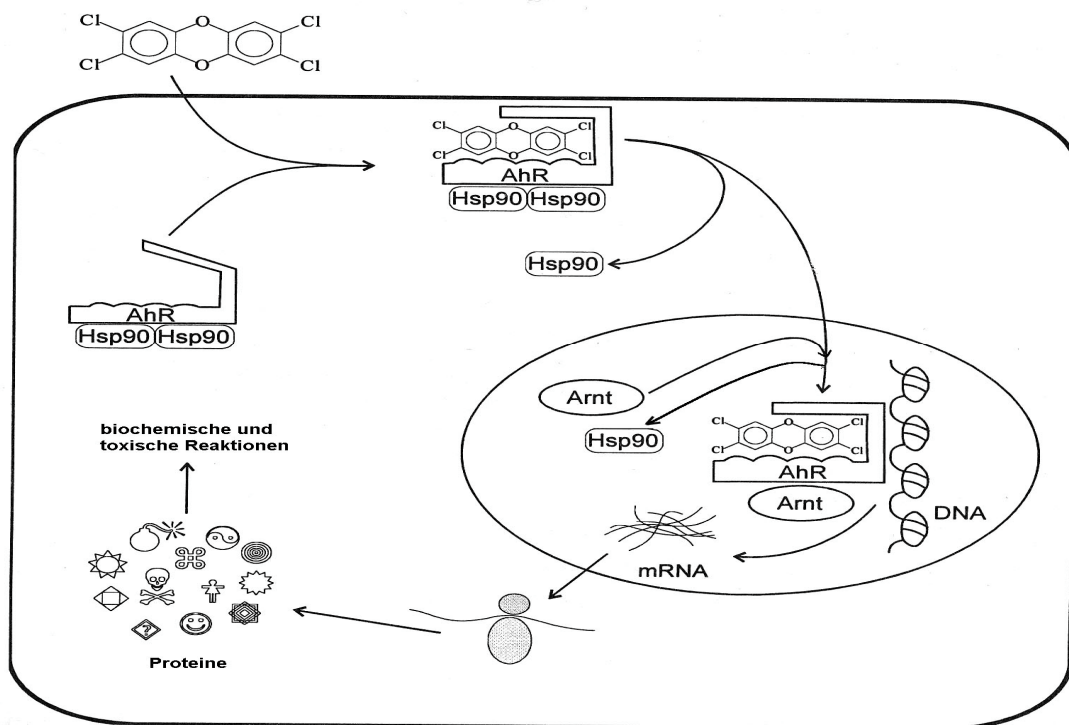
Die Halbwertszeit dioxinartiger Verbindungen steigt mit dem Alter an, vermutlich aufgrund eines höheren Fettgewebsanteils und einer niedrigeren Metabolismusrate im Alter. Bei Frauen ist die Halbwertszeit größer als bei Männern. Während der Schwangerschaft und dem Stillen sinkt die maternale Körperlast. Dementsprechend zeigen gestillte Kinder höhere Konzentrationen an dioxinartigen Substanzen im Fettgewebe und in der Leber als nicht-gestillte Kinder (14,58).

### **2.2.3 Wirkmechanismus**

Zur Zeit existiert keine Hypothese, die den Wirkmechanismus von dioxinartigen Verbindungen mit all ihren toxischen Effekten zufriedenstellend erklären kann. Eine Bindung des Fremdstoffes an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) scheint der erste Schritt in einer Folge von mehreren Reaktionen zu sein. Dieses Konzept wird durch Beobachtungen an Mäusen unterstützt, denen der AhR fehlt. Diese AhR-*Knock-Out*-Mäuse sind gegenüber zahlreichen toxischen Wirkungen, die gewöhnlich durch TCDD hervorgerufen werden, resistent (59). Die Bindung an den Ah-Rezeptor scheint für alle gut untersuchten, von

dioxinartigen Verbindungen ausgelösten Auswirkungen notwendig zu sein, reicht aber für die toxische Reaktion allein nicht aus (60,61).

Die Funktionsweise der AhR-Signalübertragung wurde weitestgehend aufgeklärt und beinhaltet eine ligandenabhängige Aktivierung des cytosolischen AhR (**Abb. 2-5.**)(59,62,63). Nach Freisetzung von zwei Hitzeschock-Proteinen (HSP90) des Rezeptor-Komplexes und Heterodimerisierung mit einem anderen Protein Arnt (*Ah receptor nuclear translocator*) bindet der Komplex im Zellkern an spezifische Nukleotid-Sequenzen in der Promotor-Region, die Dioxin-Response-Elemente (DRE). Diese Bindung führt schließlich zu einer erhöhten Expression von bestimmten Proteinen, wie CYP1A1/1A2 und 1B1, einer Glutathion-S-Transferase (GST) der Alpha-Klasse, einer Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH<sub>3</sub>) und einer UDP-Glukuronosyltransferase (UGT1A1). Gute Korrelationen wurden zwischen der AhR-vermittelten CYP1A1 Induktion und dem toxischen Potential von dioxinartigen Substanzen gefunden. Daher wird häufig die Bindungsaffinität an den AhR (zumeist gemessen als CYP1A1 Induktion) als Maß für die Toxizität des Kongeners gesehen .



**Abb. 2-5.** Wirkmechanismus von dioxinartigen Verbindungen; Bindung an den zellulären Ah-Rezeptor, Heterodimerisierung mit Arnt, Bindung an das Dioxin-Response-Element und darauffolgende Regulation der Genexpression (nach (60)). Abkürzungen: Hsp90 (Hitzeschockprotein), Arnt (Ah receptor nuclear translocator), AhR (Arylhydrocarbon-Rezeptor), DNA (Desoxyribonukleinsäure), mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure).

Die Enzyme der AhR-Genbatterie bevorzugen als Substrate Verbindungen, die entweder den strukturellen Voraussetzungen eines AhR-Agonisten entsprechen oder die –wie im Fall von Phase-II-Substraten- aus einer solchen Struktur abgeleitet werden. Daher geht man davon aus, daß die Enzyme der AhR-Genbatterie Teil eines Schutzmechanismus sind, der auf die Elimination des induzierenden Kongeners und seiner Metaboliten abzielt. Andererseits kann diese Enzyminduktion auch den Metabolismus von anderen Substanzen wie Arzneimitteln, Nahrungsmittelbestandteilen und endogenen Substraten beeinflussen und zu toxischen Reaktionen führen (62).

#### **2.2.4 Toxische Wirkungen bei Tieren und Menschen**

Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Studien zeigt, daß TCDD sowie PCDDs, PCDFs und dioxinartige PCBs bei Tieren und beim Menschen ein breites Wirkungsspektrum aufweisen. Als toxische Effekte wurden Karzinogenität, Teratogenität, Reproduktions-, Hepato-, Neuro-, Immun- und dermale Toxizität beobachtet (64-66).

Hinsichtlich der akuten Toxizität von TCDD bestehen in der Letaldosis ( $LD_{50}$ ) beträchtliche Speziesunterschiede. Sie liegt beispielsweise bei Meerschweinchen um mehr als drei Größenordnungen niedriger als bei Hamstern (10). Daneben existieren auch Stammunterschiede innerhalb der gleichen Spezies, wie z. B. zwischen HanWistar und Long Evans Rattenstämmen (1000facher Unterschied) (67). Speziesunterschiede wurden auch für andere Endpunkte gefunden. Diese konnten aber nicht mit der letalen Empfindlichkeit korreliert werden (68).

Teratogene Effekte von Dioxinen sind bei Säugern eher selten. In Mäusen traten nach TCDD-Exposition in einer kritischen Periode Gaumenspalten auf. Hydronephrose und eine Thymusatrophie konnten bei Mäusen, Ratten und Hamstern beobachtet werden. Bei Ratten führte eine perinatale TCDD-Exposition *in utero* bei männlichen Nachkommen zu einer verminderten Spermienzahl und zu einer Feminisierung des Sexualverhaltens. Bei weiblichen Ratten kam es zu Mißbildungen im Bereich der Vagina (69). Von besonderem Interesse ist auch das Thyroid-Hormon Thyroxin T<sub>4</sub>, das in der Entwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle spielt. In Ratten führte eine TCDD-Exposition zu verringerten T<sub>4</sub>-gehalten. Kinder und Tiere, die in der perinatalen Periode mit Dioxinen oder PCBs belastet werden, können aufgrund von geringeren T<sub>4</sub>-gehalten verschiedene neurologische Störungen aufweisen, die Lern- und Gedächtnisschwierigkeiten, Hyperaktivität und eine verminderte Reaktionsfähigkeit umfassen (69).



TCDD ist in Versuchstieren kanzerogen und einige epidemiologische Studien deuten darauf hin, daß es auch in Menschen kanzerogen sein könnte. Da zudem der humane Mechanismus der Karzinogenese demjenigen der Versuchstiere ähnelt, betrachtet die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) TCDD als ein humanes Karzinogen (70).

Eine große Zahl von intermediären Stoffwechselfvorgängen wird durch dioxinartige Verbindungen beeinflusst. Dazu gehören neben der schon beschriebenen Induktion der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme auch Änderungen der Konzentration und des Metabolismus von Thyroidhormonen, Sexualhormonen, Vitamin A, Vitamin K und Lipiden (66,71). Besonders wichtig sind diese Einflüsse in der Reproduktions- und Entwicklungsphase, da Organismen im embryonalen Stadium besonders anfällig auf Veränderungen reagieren und auftretende Schädigungen häufig irreversibel sind (69).

Bei Bevölkerungsgruppen, die infolge von Nahrungsmittelverunreinigungen, erhöhten Arbeitsplatzkonzentrationen oder Industrie-Unfällen einer um 2-3 Größenordnungen erhöhten TCDD-Exposition ausgesetzt waren, wurden zahlreiche toxische Wirkungen beobachtet. Auffällig war das häufige Auftreten von Reproduktions- und Entwicklungsstörungen, die denen ähnelten, die auch in Tierversuchen beobachtet wurden, wie z. B. ein verändertes Geschlechterverhältnis der Nachkommen von exponierten Eltern in der Gegend von Seveso, in dem die Mädchengeburt überwiegen (13,69,72-75).

Nach Betrachtung aller verfügbaren Daten aus Tierversuchen und epidemiologischen Studien von stark belasteten Populationen kam die EPA (*United States Environmental Protection Agency*) im Jahr 2000 zu dem Schluß, daß der Mensch hinsichtlich bestimmter toxischer Endpunkte ähnlich empfindlich auf dioxinartige Verbindungen reagiert wie viele andere Spezies (13,61). Die durchschnittliche Körperlast der Human-Bevölkerung beträgt mehr als ein Zehntel der Exposition, bei der ungünstige Effekte erwartet werden können. Es ist daher nicht auszuschließen, daß bei einzelnen Individuen durch die Hintergrundbelastung mit Dioxinen und verwandten Verbindungen schon jetzt Schadwirkungen vorkommen. Trotz dieser bestehenden potentiellen Risiken gibt es bisher keine sicheren Hinweise für das tatsächliche Auftreten dioxinbedingter Erkrankungen in der Normal-Bevölkerung (13,61).

Obwohl gestillte Säuglinge einer erhöhten Belastung mit Dioxinen ausgesetzt sind, konnten bisher -bei allerdings begrenzter Datenlage- auch bei Kindern keine spezifischen Schadwirkungen beobachtet werden. Der Exposition steht eine fraglos günstige Wirkung des Stillens für den Säugling gegenüber (13,61).

Die Toxizität von dioxinartigen Verbindungen und ihre Wirkung beim Menschen haben die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1998 veranlaßt, vergleichsweise niedrige Werte für die duldbare tägliche Aufnahme (TDI) dieser Substanzen festzulegen. Angesichts neuer experimenteller und epidemiologischer Daten setzte die WHO-Expertengruppe den TDI-Wert auf 1-4 pg I-TEQ pro kg Körpergewicht (KG) und Tag fest (13). Im Sinne eines vorsorgenden Verbraucherschutzes wird der niedrigere Wert von 1 pg I-TEQ/kg und Tag seither vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) und Umweltbundesamt (UBA) als Zielwert für gesundheitliche Risikobewertungen zugrunde gelegt (76).

## **2.3 Wechselwirkungen von Retinoiden und dioxinartigen Substanzen**

### **2.3.1 Ähnlichkeiten in der Toxizität**

Die ersten Vermutungen einer Beteiligung von Störungen des Retinoid-Metabolismus in der Toxizität von Dioxinen resultierten aus der Beobachtung, daß bei verschiedenen Versuchstieren die Symptome infolge einer Dioxin-Exposition zu einem gewissen Grad dem Erscheinungsbild einer Vitamin-A-Defizienz ähneln. In beiden Fällen treten eine Störung der Reproduktion und des Wachstums, eine Schwächung des Immunsystems, Gaumenspaltenbildung und Veränderungen des Epithelgewebes auf (77-81).

Die gleichzeitige Gabe von TCDD und all-*trans*-Retinsäure führt in trächtigen Mäusen abhängig vom Tag der Exposition additiv (Tag 10 der Trächtigkeit) oder synergistisch (Tag 12 der Trächtigkeit) zu einer Gaumenspaltenbildung (82).

### **2.3.2 Einfluß dioxinartiger Substanzen auf endogene Vitamin A-Gehalte und die Retinoid-Signalübertragung**

Studien an Versuchstieren zeigen den Einfluß von TCDD auf mehrere Retinoid-Parameter. Eine dosis- und zeitabhängige Reduktion hepatischer Vitamin-A-Gehalte wurde in allen untersuchten Spezies und Arten von Nagern nach einer Exposition mit dioxinartigen Substanzen beobachtet (68,83). Die Senkung hepatischer Vitamin-A-Spiegel ist einer der empfindlichsten Parameter einer Exposition mit dioxinartigen Substanzen überhaupt. Änderungen können in Ratten noch bei Dosen von 10 ng TCDD pro kg Körpergewicht und Tag beobachtet werden (84). Auch Neugeborene zeigen nach einer Exposition *in utero* und in der Stillzeit verringerte Vitamin-A-Gehalte in der Leber (85,86). In Ratten kommt es nach

einer Exposition mit TCDD im Gegensatz zu Hamstern, Mäusen oder Meerschweinchen zu erhöhten Retinol-Konzentrationen im Plasma und zu erhöhten renalen Vitamin-A-Gehalten (83). Erhöhte renale Vitamin-A-Gehalte werden in Ratten auch im Rahmen einer Vitamin-A-Defizienz beobachtet (87). Passend zu erhöhten renalen und reduzierten hepatischen Vitamin-A-Gehalten ist die LRAT-Aktivität in der Niere erhöht und in den Stellatzellen der Leber reduziert (88,89).

Eine PCB-Exposition führt in Ratten zu einer drastischen Senkung der Plasma-Retinol-Spiegel (90). Grund hierfür ist ein Hydroxy-Metabolit von PCB 77, der an Transthyretin bindet. Transthyretin steht daher nicht mehr zur Bildung des TTR-RBP-ROH-Komplexes zur Verfügung, wodurch letztlich die glomeruläre Filtration von RBP-ROH über die Niere beschleunigt wird (91).

Da *AhR-Knock-Out*-Mäuse stark erhöhte Gehalte von *all-trans*-Retinsäure, Retinol und Retinylpalmitat in der Leber aufweisen, scheint der Ah-Rezeptor zudem eine Rolle in der Homöostase von Retinoiden zu spielen (92).

Mit dioxinartigen Substanzen behandelte Versuchstiere zeigen einen gesteigerten oxidativen Abbau von Retinoiden, der sich in einer erhöhten Exkretion von verabreichtem isotope-markierten Vitamin A zeigt (93-95). In Leber-Mikrosomen von TCDD-behandelten Ratten zeigt sich eine erhöhte Oxidation und Glukuronidierung von *all-trans*-Retinsäure (96,97).

Einige *in-vitro*-Studien zeigen, daß TCDD die durch *all-trans*-Retinsäure ausgelöste Expression von Genen in verschiedenen Zellsystemen inhibieren kann (98-101). Der Effekt wird über den Ah-Rezeptor vermittelt. Die Art der Wechselwirkung ist bisher noch nicht aufgeklärt worden. *Lorick et al.* (99) vermuten, daß der Ah-Rezeptor oder sein AhR/Arnt-Komplex über eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit der Ligand-bindenden Domäne der RARs die Bindung der *all-trans*-Retinsäure verhindert.

## 2.4 Analytik von Retinoiden

In den letzten Jahren sind zahlreiche Übersichtsartikel über die Bestimmung von Retinoiden in biologischen Proben erschienen. Dutzende von Methoden wurden diskutiert und zitiert (16-18,102-104).

### 2.4.1 Konzentrationen in biologischen Matrices

Im Plasma und in Geweben dominieren Retinol und die Retinylester. Polare Retinoide wie die Retinsäuren treten endogen in wesentlich geringeren Konzentrationen auf. Beispielsweise liegen die Konzentrationen der Retinylester in der Leber häufig um einen Faktor von  $10^5$  höher als die der *all-trans*-Retinsäure. Die Retinol-Gehalte im Plasma und in der Niere sind bis zu 1000fach höher als die der Retinsäure. Typische Gehalte von *all-trans*-Retinsäure liegen in Geweben von ausgewachsenen Ratten und Mäusen bei ca. 1-5 ng/g, im Plasma bei ca. 0,3-0,6 ng/mL.

Die Analytik der erhöhten Gehalte von Retinsäure und ihren Metaboliten nach einfachen oder wiederholten Dosen von Retinsäure ist naturgemäß einfacher als die Analyse der sehr geringen Konzentrationen endogener Retinsäuren in Plasma oder anderen Geweben. Nach derartigen Dosierungen erreichen die Konzentrationen häufig Niveaus, die eine direkte Extraktion mit anschließender Injektion in das HPLC-System ohne Anreicherung in einem Verdampfungsschritt ermöglichen (17).

### 2.4.2 Probenvorbereitung

Viele der veröffentlichten Methoden unterscheiden sich im Detail, nicht aber in ihrem Grundkonzept. Retinoide, in homogenisiertem Gewebe oder Plasma, werden heutzutage über eine Flüssigextraktion isoliert. Diese Arbeitsvorschriften enthalten in der Regel die folgenden Teilschritte: 1. Denaturieren der Proteine, 2. Flüssigextraktion mit einem organischen Lösungsmittel und 3. Zentrifugation.

Die Unterschiede der in der Literatur beschriebenen Methoden bestehen vornehmlich im angewandten organischen Lösungsmittel, wobei die Methode der Wahl über die Polarität der jeweilig interessierenden Analyten bestimmt wird. Die Löslichkeiten der einzelnen Retinoide in organischen Lösungsmitteln werden hauptsächlich über die terminale Gruppe der Seitenkette bestimmt. Generell ist es schwierig, mit einem einzigen Lösungsmittelsystem sowohl polare als auch unpolare Retinoide effektiv zu extrahieren (17,18,105).

Hohe Konzentrationen von Retinol und Retinylestern (unpolare Retinoide) ermöglichen eine direkte Injektion eines Aliquots des Extraktes. Bei den niedrigeren Konzentrationen der Retinsäuren (polare Retinoide) ist zumeist noch ein Anreicherungsschritt nötig. Oft wird dazu das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen. Die Analyten können aber auch über eine Festphasenextraktion auf *Reversed-*

*Phase*-Sorbentien konzentriert und anschließend über eine Säulenschaltung *on-line* eluiert werden (16-18).

Bei der Analyse von physiologischen Konzentrationen in Geweben ist es günstig, aufgrund der beträchtlichen Konzentrationsunterschiede die polaren Retinoide getrennt von Retinol und Retinylestern zu untersuchen. Retinsäuren können selektiv über eine Festphasenextraktion auf der Basis eines Aminopropyl-Sorbens angereichert werden (106-108).

### **2.4.3 Trenntechniken**

Bei der Analytik von Retinoiden wird heute zumeist die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt. Eine große Anzahl von veröffentlichten Methoden demonstriert die exzellente Anwendbarkeit bei dieser Substanzklasse (16-18,102-105,109). Die Vorteile der HPLC sind zahlreich. Die Verfahren sind zerstörungsfrei, sehr empfindlich und ermöglichen eine ausreichende Trennung der meisten Retinoide (16,103,105).

Im Gegensatz zu anderen Bereichen der Lipid-Analytik, hat sich die Gaschromatographie im Bereich der Retinoid-Analytik aufgrund der Thermolabilität der Analyten viele Jahre als problematisch erwiesen. Auch wenn mittlerweile das Verwenden von deaktivierten Säulen und kalten *on-column*-Injektionen die Analyse von labilen Retinoiden prinzipiell ermöglicht, wird für eine hochempfindliche Messung eine ausgiebige Probenaufreinigung mit anschließender Derivatisierung und eine Kopplung mit der Massenspektrometrie benötigt (18).

Der Einsatz der Kapillarelektrophorese hat für Retinoide keine breite Anwendung gefunden. Neben der Kapillarzonenelektrophorese (110-112) wurden hier Techniken der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (113-117) mit UV- oder LIF-Detektion angewandt. Für biologische Proben erforderliche Nachweisgrenzen konnten unter der Verwendung einer LIF-Detektion nur für Retinol erreicht werden (111,112).

### **2.4.4 Detektion**

#### **UV/vis-Detektion**

Die in der Analytik von Retinoiden am häufigsten eingesetzte Detektionsart ist die UV/vis-Absorptionsmessung. Aufgrund ihrer konjugierten Doppelbindungen weisen Retinoide beträchtliche Absorptionen im Wellenlängenbereich von 310 bis 370 nm auf, einem Bereich, in dem nur wenige andere Verbindungen eine derartig hohe Lichtabsorption zeigen (17,18).

Die in der HPLC bevorzugt eingesetzten UV-Detektoren sind daher im entsprechenden Wellenlängenbereich für Retinoide relativ selektiv und führen zu niedrigen Nachweisgrenzen. Neben dem Einsatz von Mehrwellenlängen-Detektoren, die über die Berechnung des Flächenverhältnisses bei zwei Wellenlängen mögliche Verunreinigungen aufdecken können (118), haben Photodiodenarray-Detektoren (DADs) an Bedeutung gewonnen (18). Aufgrund verbesserter Baugruppen zeigen DADs heute nur noch unwesentlich höhere Nachweisgrenzen als variable Wellenlängendetektoren. Eine Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses kann -allerdings zu Lasten der spektralen Auflösung- über ein Aufsummieren der Signale mehrerer Dioden erreicht werden (119).

### **Fluoreszenzdetektion**

In einigen wenigen Fällen finden in der Retinoid-Analytik Fluoreszenz-Detektoren ihren Einsatz. Aufgrund der hohen nativen Fluoreszenz von Retinol und den Retinylestern (Anregung bei 325 nm und Emission bei 480 nm) erreichen Fluoreszenzdetektoren besonders niedrige Nachweisgrenzen (17,18,102,104). Retinsäuren können nur nach Derivatisieren über einen Fluoreszenzmarker über die Fluoreszenz detektiert werden, da durch Oxidation der Alkoholfunktion des Retinols die native Fluoreszenz praktisch vollständig zerstört wird (102).

### **Elektrochemische Detektion**

Unter den HPLC-Detektoren mit besonders niedrigen Nachweisgrenzen nehmen elektrochemische Detektoren einen festen Platz ein. Daher wurden auch für die Retinoid-Analytik HPLC-Methoden in Kombination mit einer elektrochemischen Detektion eingesetzt (18,120-123). Als primäre Elektrodenreaktion wird dabei die Oxidation der konjugierten Doppelbindungen der Retinoide angenommen (120,121). Verglichen mit einer HPLC-UV-Methode konnten *Sakhi et al.* (124) die Nachweisgrenze für all-*trans*-Retinsäure mittels coulometrischer Detektion auf ein Sechstel senken (123,124). Leider eignen sich sowohl amperometrische als auch coulometrische Detektoren aufgrund der Lösungsmittelabhängigkeit des Grundstroms nicht für die Gradientenelution (119), was die Zahl der in einem Analysengang bestimmbar Retinoide drastisch reduziert. Schwierigkeiten in der Routine ergeben sich mit diesen Detektoren zudem durch eine ungenügende Reinheit des Eluenten und schnelles Verschmutzen der Arbeitselektrode (125).

### **Massenspektrometrische Detektion**

Massenspektrometer werden zunehmend auch in der HPLC als Detektor eingesetzt. Ein massenspektrometrischer Detektor ist generell von großem Interesse für die Flüssigkeitschromatographie, da er eine weitergehende Identifizierung und eine hochselektive Bestimmung des Analyten erlaubt.

In den vergangenen Jahren wurden LC-Methoden zur Bestimmung von Retinoiden, insbesondere von Retinsäuren, häufig nach Derivatisieren mit Pentafluorobenzylestern über ein *Direkteinlaß-Interface* (DLI) (126,127), oder ein *Thermospray-Interface* (TSP) (128,129), oder ein *Fast-atom-bombardment-Interface* (FAB) (130) oder ein *Particle-Beam-Interface* (PBI) (131) mit dem Massenspektrometer gekoppelt.

Seit einigen Jahren sind Interfaces erhältlich, bei denen die Ionisation bei Atmosphärendruck stattfindet. Kommerzielle „*Benchtop*-Geräte“ bieten heute in der Regel die Möglichkeit, zwischen einem *Electrospray-Interface* (ESI) und einem *Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization-Interface* (APCI) auszuwählen, die schnell, ohne das Vakuum des Massenspektrometers zu brechen, gegeneinander ausgetauscht werden können. Sowohl das ESI-Interface (132,133) als auch das APCI-Interface (134-136) wurden kürzlich in Verbindung mit einem Single-Quadrupol-Massenanalysator auch in der Analytik von Retinoiden eingesetzt.

### **Kopplungen mit $^1\text{H}$ -Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR)**

Für die Strukturbestimmung von licht- und sauerstoffempfindlichen Verbindungen sind von einer direkten *on-line*-HPLC- $^1\text{H}$ -NMR-Kopplung wesentliche Vorteile zu erwarten. Insbesondere durch die Arbeiten von *Albert et al.* (137-141) werden in der Literatur häufig gerade Retinoide oder Carotinoide als Paradebeispiele für die Anwendung dieser Kopplungsart aufgeführt. Einerseits ist nämlich die Strukturbestimmung dieser Substanzen mit einer HPLC-MS-Kopplung nur unzureichend möglich, da sich die Fragmentierungsmuster der Massenspektren der einzelnen Isomere nicht unterscheiden. Andererseits können bei Anwendung des klassischen Arbeitsverfahrens der *off-line*-Trennung, Aufkonzentration und Überführung in das NMR-Meßröhrchen die isolierten Verbindungen sehr leicht isomerisieren.

Die benötigte Analytmenge in einer LC- $^1\text{H}$ -NMR-Kopplung hängt entscheidend von der Aufenthaltszeit im Probenkopf (*on-flow*- oder *stopped-flow*-Techniken) und der Feldstärke des äußeren Magnetfeldes ab. Für ein typisches Molekül mit einer Molekularmasse von  $\leq 400$  Da, das mit einem 500 MHz-Gerät bei Flußraten von 0,5-1,0 mL/min gemessen wird, ergeben 5-10  $\mu\text{g}$  ein brauchbares Spektrum. Eine höhere Empfindlichkeit kann durch verlängerte Scan-Zeiten während der *stopped-flow*-Datenaufnahme erhalten werden. In diesem Fall können in 3 Stunden für ein  $^1\text{H}$ -Spektrum ca. 200 ng Analyt detektiert werden (137,142).

Eine derartige Kopplung setzt eine hinreichend große Analyt-Menge voraus. Zur Analyse von endogenen Spiegeln polarer Retinoide mit absoluten Analyt-Mengen im pg-Bereich ist die

Kopplung nicht geeignet. Um endogen auftretende polare Retinoide *via*  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zu analysieren, sind von vornherein aufwendige Aufreinigungs- und Konzentrierungsmaßnahmen notwendig, so daß die Vorteile einer direkten Kopplung von LC und  $^1\text{H-NMR}$  nicht mehr gegeben sind. Ein erfolgreicher Einsatz einer LC- $^1\text{H-NMR}$ -Kopplung ist nur bei den endogen in höheren Konzentrationen auftretenden unpolaren Retinoiden oder in der pharmazeutischen Analytik (Reinheitskontrolle von Vitaminpräparaten) gegeben.

### 2.4.5 Analytik unpolarer Retinoide

Zur Analyse von Retinylestern wurde bisher überwiegend die HPLC eingesetzt (17,18,102-104,109,143). Die Retinylester werden an *Reversed-Phase*-Material entsprechend ihrer Kettenlänge getrennt. Eine C=C-Doppelbindung in der Fettsäurekette reduziert die Retention etwa genauso wie eine um zwei Kohlenstoffatome kürzere Fettsäurekette (17,103). Bei Verwendung von häufig eingesetzten Eluenten auf der Basis von Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser eluiert Retinyloleat (18:1) daher gewöhnlich zusammen mit Retinylpalmitat (16:0) (17,103).

Aufgrund des großen Polaritätsunterschieds von Retinol und Retinylestern sind diese Analyten nur schwer isokratisch zu trennen. Hier sind Gradienten-Systeme besser geeignet (17,103). Eine schnelle Gradienten-Methode, aber ohne die Trennung von Retinyloleat und Retinylpalmitat, wurde von *Collins et al.* (144) entwickelt. Nach einer Probenvorbereitung, die *on-line* an die HPLC gekoppelt wurde, konnten verschiedene Ester innerhalb von 8 Minuten an einer kurzen C18-Säule mit einem Gradienten aus wässrigem Ammoniumacetat/Wasser und Aceton/2-Propanol getrennt werden.

*De Ruyter* und *de Leenheer* beeinflussten die Trennung des kritischen Paares Retinylpalmitat und Retinyloleat durch einen Zusatz von Silbernitrat zur mobilen Phase (145). Der Zusatz von Silbersalz zu Methanol bewirkt eine Komplexierung der Doppelbindungen der Retinylester und führt bei solchen mit ungesättigten Fettsäuren zu einer Veränderung der Kapazitätsfaktoren ( $k'$ ), wohingegen Retinylester mit gesättigten Fettsäuren nicht beeinflusst werden (18,145). Die Trennung von Retinyloleat und Retinylpalmitat konnte auch über mobile Phasen mit Acetonitril erhalten werden, die chlorierte Kohlenwasserstoffe wie Dichlorethan, Dichlormethan oder Chloroform enthielten (17,103,146).

Methoden auf der Basis eines *Normal-Phase*-Mechanismus sind für die Trennung von Retinylestern nach ihrer Kettenlänge weniger geeignet, sind aber für die Trennung von geometrischen Isomeren der Retinoide gut anwendbar (17,18).



### 2.4.6 Analytik polarer Retinoide

Obwohl sich die *Normal-Phase*-HPLC zur Trennung der Retinsäuren und ihrer Metaboliten prinzipiell eignet, hat sie in diesem Bereich nur einen begrenzten Einsatz gefunden (17,18,147). Gründe hierfür mögen vielschichtig sein. Einerseits sind die benötigten Analysenzeiten wesentlich länger als in vergleichbaren *Reversed-Phase*-Methoden. Andererseits leiden *Normal-Phase*-Systeme häufig an einer mangelnden Reproduzierbarkeit, die im wesentlichen auf der besonderen Anfälligkeit gegenüber schwankenden Wassergehalten im Eluenten und anderen Kontaminationen beruht (16).

Zur Analyse von polaren Retinoiden wird heute daher überwiegend die *Reversed-Phase*-HPLC in Verbindung mit wässrigen gepufferten Eluenten auf Methanol- oder Acetonitril-Basis eingesetzt. Neben dem Einsatz von Gradienten wird in diesem Zusammenhang häufig die direkte Injektion von biologischen Flüssigkeiten in Verbindung mit Säulenschaltungen beschrieben. Die meisten Methoden zeigen dabei eine hohe Empfindlichkeit und eine ausreichende Auflösung von 9-*cis*-, 13-*cis*- und all-*trans*-Retinsäure (16-18,118,123,148-154). Kritisch ist aber die Trennung von 9,13-di-*cis*-Retinsäure je nach System von 13-*cis*- oder 9-*cis*-Retinsäure. Die zur Verfügung stehenden Methoden, die hier eine ausreichende Auflösung zeigen, weisen aber vergleichsweise höhere Nachweisgrenzen (155-161) und häufig längere Analysenzeiten auf (155-158).

Unter den vielen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Analyse von Retinoiden in biologischen Proben finden sich nur wenige, die die Bestimmung physiologischer Retinsäurespiegel beschreiben (17). Die am häufigsten untersuchten Matrices sind dabei Plasma und Embryos (118,123,147,149-152,154,158,162), bei denen heute schon fast routinemäßig über Säulenschaltungen eine Anreicherung *on-line* mit der HPLC gekoppelt wird. Die beschriebenen Methoden weisen für diese relativ einfachen Matrices exzellente Nachweisgrenzen auf und sind nach Gabe höherer Dosen von Retinoiden häufig noch zur Bestimmung polarer Retinoide in den komplexeren Matrices von Geweben geeignet (163). Die Messung physiologischer Konzentrationen in Geweben ist aufgrund der komplexeren Matrix und der nur begrenzt einsetzbaren Probenmenge problematisch. Die chromatographische Bestimmung physiologischer Retinsäure-Gehalte in derartigen Geweben bedarf daher einer aufwendigeren Probenvorbereitung (17,107,108).

### **3 Methodenentwicklung zur Analytik von Retinoiden**

#### **3.1 Anforderungen an die Methodik**

Die Anforderungen an die Methodik können wie folgt charakterisiert werden:

- Anwendbarkeit auf ein großes Spektrum biologischer Proben verschiedener Spezies: Plasma, Niere, Gehirn, Leber, Plazenta, Testis, Embryo
- Nachweisgrenzen im sub-ng/g-Bereich zur Messung der polaren Retinoide bei begrenzter Probenmenge (ca. 200-500 mg Gewebe und 200-500  $\mu$ L Serum)
- Multikomponentenfähigkeit zur Bestimmung der wichtigsten polaren und unpolaren Retinoide aus einer einzigen mengenmäßig begrenzten Probe
- Routinefähigkeit bei angemessenem Probendurchsatz
- Integrität der Analyten während der Analyse

#### **3.2 Konzept zur Vorgehensweise**

Biologische Matrizes bestehen aus verschiedensten Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Die Bestimmung von Retinoiden in diesen Matrizes ist aufgrund ihrer geringen Gehalte insbesondere für die Retinsäuren kompliziert. Während Embryos und Plasma aufgrund ihres vergleichsweise geringen Lipid-Anteils für die Retinoid-Analytik noch unproblematisch sind, ist die Bestimmung der Retinsäuren in Lipid-reichen Matrizes wie dem Gehirn, der Niere und der Leber deutlich schwieriger. In der Leber ist zudem der große Konzentrationsunterschied (Faktor  $10^5$ ) zwischen polaren und unpolaren Retinoiden ungünstig.

Aufgrund der beschriebenen Problematik und der geforderten Anwendungsbreite der Methode erscheint es daher sinnvoll, die polaren Retinoide im Rahmen der Probenvorbereitung sowohl von einem Großteil der Lipide der Matrix als auch von den unpolaren Retinoiden abzutrennen. Die Probenvorbereitung sollte dabei wegen der angestrebten Empfindlichkeit der Methode möglichst quantitativ sein und die Untersuchung einer großen Zahl von Proben ermöglichen. Während der Probenvorbereitung muß zudem die Integrität der Analyten sichergestellt sein.

Die chromatographische Bestimmung der unpolaren Retinoide ist aufgrund der ausreichenden Gehalte in den Proben unproblematisch. Zum Erreichen der geforderten Nachweisgrenzen bei der Bestimmung von polaren Retinoiden erscheint wegen der höheren Empfindlichkeit die Verwendung von miniaturisierten HPLC-Systemen vielversprechend. Aufgrund ihrer Robustheit, Empfindlichkeit und guten Selektivität ist die UV-Detektion eine geeignete

Detektionsart. Eine Miniaturisierung im Bereich der HPLC ermöglicht auch eine einfachere Kopplung mit Detektoren der Massenspektrometrie.

### 3.3 Standards

Von den in dieser Arbeit verwendeten Retinoiden sind nur *all-trans*-, *13-cis*- und *9-cis*-Retinsäure sowie *all-trans*-Retinol, *all-trans*-Retinal, *all-trans*-Retinylpalmitat und *all-trans*-Retinylacetat kommerziell erhältlich. Der Großteil der Retinoide, die in den hier vorgestellten Untersuchungen als Referenzsubstanzen dienten, war ein Geschenk von Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz). *All-trans*-4-oxo-Retinol war ein Geschenk von *Dr. F. Derguini* und *Dr. J. Buck* (New York, NY, USA), *all-trans*-18-OH-Retinsäure wurde von *Dr. P. van der Saag* (Utrecht, Holland) zur Verfügung gestellt. Das Glukuronid der *all-trans*-Retinsäure, sowie alle kommerziell nicht erhältlichen Retinylester wurden bereits in der Vergangenheit in der Arbeitsgruppe von *Prof. H. Nau* synthetisiert (24,164). *9-cis*-4-OH-Retinsäure wurde im Rahmen dieser Arbeit entsprechend einer Vorschrift nach *Evans et al.* (165) neu synthetisiert (Abschnitt E-1).

#### 3.3.1 Gehaltsbestimmungen der Standardlösungen im UV-Bereich

Zunächst wird mittels HPLC überprüft, ob der Standard störende Substanzen enthält. In Fällen von Verunreinigungen werden die Standards gemäß Abschnitt E-12 und E-14 mit der HPLC aufgereinigt. Dazu werden die entsprechenden Eluate der HPLC nach der Detektion aufgefangen, der Eluent mittels Vakuumkonzentration (Abschnitt E-9) entfernt und der Rückstand anschließend in Ethanol aufgenommen.

Mittels UV-Spektroskopie wird nach ihrer Verdünnung die Extinktion der Stammlösungen in Ethanol im Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max}$ ) bestimmt (Abschnitt E-2). Bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten kann die exakte Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet werden:

$$c_{\text{Stammlösung}} [\text{mg} / \text{mL}] = \frac{E \cdot V \cdot M [\text{g} / \text{mol}]}{\varepsilon [1000 \text{ cm}^2 / \text{mol}] \cdot d [\text{cm}]}$$

mit:  $E$  ermittelte Extinktion

$V$  Verdünnungsfaktor

$M$  Molmasse

$\varepsilon$  molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

$d$  Schichtdicke der Küvette

Die Konzentration der Stammlösung wird dabei jeweils über drei unabhängige Verdünnungen bestimmt und anschließend gemittelt. Die Variation war dabei stets kleiner 5 %. Molare dekadische Extinktionskoeffizienten verschiedener Retinoide (**Tab. 3-1.**) sind in der Literatur beschrieben (17,152,166). Für *all-trans*-18-OH-Retinsäure, *9-cis*-4-OH-Retinsäure, *13-cis*-3-OH-Retinsäure und *all-trans*-3-OH-Retinsäure, für die sich in der Literatur keine Angaben fanden, wurde ein molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von 40000 angenommen. *All-trans*-Retinol und die verschiedenen Retinylester weisen fast identische molare dekadische Extinktionskoeffizienten auf, da in ihnen die entscheidende Polyen-Struktur nicht gestört ist. Aus diesem Grunde kann für alle Retinylester, für die keine Literaturangabe existiert, der Extinktionskoeffizient von Retinylpalmitat verwendet werden (17).

**Tab. 3-1.** Absorptionsmaxima  $\lambda_{\max}$  und molare dekadische Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (in Ethanol) der verwendeten Retinoide.

<b>Retinoid</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> [nm]</b>	<b><math>\epsilon</math> [1000 cm<sup>2</sup>/mol]</b>
<i>all-trans</i> -Retinol	325	52770
<i>all-trans</i> -Retinal	383	42880
<i>all-trans</i> -Retinylacetat	325	51180
<i>all-trans</i> -Retinylpalmitat	325	49260
<i>all-trans</i> -Acitretin (RO 101670)	361	41400
<i>all-trans</i> -Retinsäure	350	45300
<i>13-cis</i> -Retinsäure	354	39750
<i>9-cis</i> -Retinsäure	345	36900
<i>9,13-di-cis</i> -Retinsäure	346	34500
<i>all-trans</i> -4-oxo-Retinsäure	360	58220
<i>all-trans</i> -4-OH-Retinsäure <sup>1</sup>	347	19500
<i>13-cis</i> -4-oxo-Retinsäure	361	39000
<i>13-cis</i> -4-OH-Retinsäure <sup>1</sup>	344	45000
<i>all-trans</i> -Retinoyl- $\beta$ -D-Glukuronid	360	50700
<i>all-trans</i> -3,4-didehydro-RA	370	41570
<i>all-trans</i> -5,6-epoxy-Retinsäure	298	39470
<i>all-trans</i> -4-oxo-Retinol	350	34000

<sup>1</sup> Mitteilung von Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

## 3.4 Probenvorbereitung

### 3.4.1 Allgemeine Betrachtungen

#### Stabilität der Analyten

Natürlich vorkommende Retinoide sind ungesättigte Verbindungen mit fünf oder mehr konjugierten Doppelbindungen, die in biologischen Matrices, wie in Plasma oder in Geweben, gewöhnlich durch Proteine und Antioxidantien geschützt werden. Plasma-Proben oder Gewebe können daher in einer inerten Atmosphäre bei  $-80\text{ °C}$  ohne Probleme für 1,5 bis 8 Jahre gelagert werden (17,105,158,166). Nach ihrer Freisetzung aus der biologischen Matrix sind sie anfällig gegenüber Isomerisierungen und Oxidationen (16-18,102,104,105, 109,143,166). Tageslicht, starke Säuren, Metalle (insbesondere Eisen und Kupfer) und Hitze führen unabhängig oder synergistisch zu Isomerisierungen. Starke Säuren bewirken auch eine Hydrolyse von glukuronidierten Retinoiden und eine Umlagerung von 5,6-Epoxiden in 5,8-Epoxide. Der Kontakt mit Basen kann in einer Verseifung von Retinylestern resultieren. Wegen der generell geringen Stabilität können Artefakte während der Lagerung, der Extraktion und der Analyse gebildet werden. Analytische Ergebnisse sind dann nur noch schwer interpretierbar oder sogar bedeutungslos. Aus diesen Gegebenheiten leiten sich folgende allgemeine Vorsichtsmaßnahmen ab, die während der Analytik von Retinoiden eingehalten werden müssen (Abschnitt E-3):

- Beleuchtung der abgedunkelten Laboratorien nur mit gedämpften Gelblicht
- Verwendung von möglichst braunen und undurchsichtigen Glasgeräten und Probengefäßen
- Längere Lagerung von Standards und Proben immer in einer inerten Atmosphäre (Stickstoff oder besser Argon) in der Kälte und im Dunkeln
- Vermeidung von übermäßiger Wärme, Säuren, Basen und von Lösungsmitteln, die Peroxide enthalten

Trotzdem können Isomerisierungen während der Aufarbeitung nicht vollständig vermieden werden. Da derartige Isomerisierungen auch physiologisch auftreten, müssen alle Befunde immer vor dem Hintergrund einer möglichen Isomerisierung während der Analyse diskutiert werden.

#### Probenkontamination

In der organischen Spurenanalytik besteht immer und überall die Gefahr einer Probenkontamination während der Analyse. Neben verunreinigten Glasgeräten und ungeeigneten

Lösungsmitteln können Kontaminationen auch über Stopfen und Dichtungen von Probengefäßen und über ungeeignete Säulen in der Festphasenextraktion (SPE) entstehen (167).

Eine wichtige Voraussetzung sind saubere, blindwertfreie Glasgeräte. Alle mehrfach zu verwendenden Glasgeräte werden daher nach der maschinellen Reinigung bei 93 °C noch einmal mit Wasser und Methanol gespült. Als letzte Reinigungsstufe werden die Glasgeräte bei ca. 450 °C in einem Backofen mit Pyrolysefunktion ausgeheizt (Abschnitt E-4). Bei dieser Temperatur wird die Glasoberfläche katalytisch schon so aktiv, daß organische Verbindungen zersetzt werden. Gleichzeitig werden auch die durch den Gebrauch an der Glasoberfläche durch Hydrolyse gebildeten Silanolgruppen unter Wasserverlust wieder vernetzt. Die Oberflächenaktivität reduziert sich und entspricht wieder derjenigen von neuen Glasgeräten (167). Dieser Schritt stellte sich als wesentlich heraus, da Vorversuche zeigten, daß Retinoide leicht von Glasoberflächen adsorbiert werden. Durch das Ausheizen im Ofen kann auf eine häufig angewandte chemische Silanisierung der Glasgeräte verzichtet werden, die ihrerseits wieder ein gewisses Kontaminationspotential aufweist. Im Rahmen der Festphasenextraktion werden preisgünstige Einweg-Probengläschen verwendet.

Saubere Lösungsmittel und geeignete SPE-Säulen sind eine Grundvoraussetzung für eine empfindliche Analyse. Aus diesem Grund wurden mehrere Lösungsmittel und SPE-Säulen verschiedener Hersteller im Rahmen des Anwendungsbereiches der entwickelten Methodik überprüft. Die Untersuchungen zeigten zum Teil erhebliche Qualitätsunterschiede. Die als optimal erkannten Lösungsmittel und SPE-Säulen sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben. Auch die Verwendung von Flaschenaufsatzdispensern (zumindest von dem hier getesteten: EM dispenser, Hirschmann) zur genauen Dosierung von Chloroform ist in diesem Anwendungsbereich problematisch, da das Lösungsmittel nach und nach über den Ansaugschlauch kontaminiert wird. 2-Propanol dagegen kann ohne Probleme über Flaschenaufsatzdispenser dosiert werden.

### **3.4.2 Flüssig-Extraktion**

Zur Freisetzung der Retinoide aus ihrer Matrix dient die Flüssig-Extraktion. Um eine effiziente Extraktion zu erreichen, müssen die retinoidbindenden Proteine denaturiert werden und die interessierenden Retinoide gut in dem verwendeten Lösungsmittel löslich sein. Die Flüssig-Extraktion sollte zudem mit der anschließend verwendeten Festphasenextraktion kombinierbar sein.

Um sowohl die polaren Retinsäuren als auch die unpolaren Retinoide in einem Arbeitsgang bestimmen zu können, muß ein Lösungsmittel verwendet werden, das möglichst alle

Retinoide effizient aus der biologischen Matrix befreit. Da biologische Flüssigkeiten und Gewebe einen hohen Prozentsatz an Wasser enthalten, extrahieren mit Wasser nicht-mischbare Lösungsmittel die Retinoide nicht effizient (17).

### **Chloroform/Methanol-System**

Mischungen von Chloroform und Methanol finden im Bereich von Lipid-Extraktionen eine breite Anwendung. *Bligh und Dyer* (168) etablierten ein einphasiges Chloroform/Methanol/Wasser-System zur effizienten Lipid-Extraktion aus Geweben. Durch die anschließende Verdünnung mit Wasser und Chloroform, wird ein zweiphasiges System erhalten, dessen untere Phase praktisch aus 100 % Chloroform besteht und die Lipide enthält. Die erforderlichen Volumenverhältnisse von Chloroform, Methanol und Wasser vor und nach der Verdünnung müssen dabei entsprechend 1:2:0,8 und 2:2:1,8 sein. Auf diese Weise können mit einer einfachen Extraktion ca. 94 % der extrahierbaren Lipide isoliert werden. Aufgrund der guten Löslichkeit der interessierenden Retinoide in Chloroform und der ausgezeichneten Kompatibilität mit der anschließenden Festphasenextraktion erscheint dieses Verfahren für die Extraktion von Retinoiden als geeignet (Abschnitt E-5).

### **2-Propanol/Chloroform-System**

Als zweite Möglichkeit wurde eine direkte Extraktion mit 2-Propanol untersucht (Abschnitt E-6). Ein ähnliches Verfahren wurde von *Collins et al.* (144,169) für die Extraktion von polaren und unpolaren Retinoiden aus Plasma angewandt. Es wurde gezeigt, daß alle interessierenden Retinoide auf diese Weise effizient extrahiert werden können (144,169). Problematisch ist in diesem Zusammenhang allerdings die Kombination mit der im nächsten Aufreinigungsschritt zu verwendenden Festphasenextraktion, der ein *Normal-Phase-Mechanismus* zugrunde liegt und die daher nicht mit wässrigen 2-Propanol-Lösungen vereinbar ist. Durch die Verdünnung mit Chloroform kann auch hier in einem zweiten Schritt eine Phasentrennung herbeigeführt werden. Das Gemisch trennt sich in eine obere Wasser-Phase und eine untere, die Retinoide enthaltende, Chloroform/2-Propanol-Phase (2:1). Im Verdünnungsschritt auftretende Emulsionen können leicht über einen Zentrifugationsschritt gebrochen werden.

Es wurde gezeigt, daß zu einer effektiven Fällung des Plasma-Proteins von mehr als 95 % eine Methanol oder Ethanol-Menge in einem dreifachen Überschuß nötig ist. Dabei ist die Effektivität von organischen Lösungsmitteln in der Ausfällung von Proteinen umgekehrt proportional mit ihrer Polarität verknüpft (170). Es ist daher davon auszugehen, daß die beiden hier vorgestellten Vorgehensweisen zu einer effizienten Proteinfällung führen. Beide

Systeme können zudem ohne Verdampfungsschritt direkt mit der Festphasenextraktion gekoppelt werden.

### 3.4.3 Festphasenextraktion

Durch die Festphasenextraktion (SPE) sollen die aufgrund der geringeren Konzentrationen schwerer zu bestimmenden polaren Retinoide von den wesentlich höher konzentrierten unpolaren Retinoiden und einem beträchtlichen Teil der Matrix abgetrennt werden.

#### Traditionelle SPE-Säulen (Aminopropyl-Phase)

Die hier angewandte Vorgehensweise geht auf ein Verfahren von *Kaluzny et al.* (171) zurück. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit der Trennung von verschiedenen Lipid-Klassen mittels Aminopropylphasen in einer großen Ausbeute und mit einem hohen Reinheitsgrad. Dazu wird ein Chloroform-Extrakt auf eine mit Hexan vorkonditionierte Aminopropyl-SPE-Säule gegeben. Die  $\gamma$ -Aminogruppe wirkt dabei als ungeladenes, polares, schwach basisches Adsorptionszentrum. Verschiedene Lipid-Klassen werden auf der Säule zurückgehalten. Im ersten Elutionsschritt können mit einer Mischung aus Chloroform und 2-Propanol (2:1) neutrale Lipide (Cholesterol, Cholesterylester, Mono-, Di- und Triglyceride) eluiert werden, die dann über weitere Schritte weiter aufgetrennt werden können. In einem zweiten Elutionsschritt mit 2 % Eisessig in Diethylether können die Fettsäuren selektiv eluiert werden. Phospholipide verbleiben auf der Säule und können im Anschluß mit Methanol eluiert werden. In diesem *Normal-Phase*-Mechanismus beruht die Trennung prinzipiell auf der unterschiedlichen Polarität der einzelnen Lipid-Klassen. Polare Lipide wie Fettsäuren oder Phospholipide zeigen über Wasserstoffbrückenbindungen eine stärkere Wechselwirkung mit der Aminogruppe als unpolare Lipide.

*Tang und Russell* (108) paßten diese Methode erstmalig für die Klasse der Retinsäuren an und demonstrierten ihre große Leistungsfähigkeit in diesem Bereich. Trotzdem fand die vorgestellte Methode in den Folgejahren nur eine begrenzte Verwendung (106,107,172,173). Dies mag auf die mangelnde Kompatibilität der Methodik sowohl mit der Flüssig-Extraktion als auch mit einer *Reversed-Phase*-HPLC zurückzuführen sein. Die von *Tang und Russell* (108) beschriebene Vorgehensweise sieht Verdampfungsschritte mit Stickstoff sowohl vor als auch nach der Festphasenextraktion vor und ist damit sehr arbeitsintensiv. Die Wiederaufnahme erfolgt in einem größeren Volumen Methanol, von dem im Anschluß nur ein Aliquot in das HPLC-System injiziert werden kann (vgl. Abschnitt 3.6.3). Die beschriebene Vorgehensweise wurde bisher nur zur Analyse von Retinsäuren eingesetzt, Metabolite der Retinsäure, Retinol und Retinylester wurden nicht berücksichtigt



(107,108,172,173) oder über eine separate Vorgehensweise bestimmt (106). Zudem mußte jeweils aufgrund der geringen Empfindlichkeit des HPLC-Systems eine relativ große Probenmenge aufgearbeitet werden, was die Methode schließlich für Studien mit begrenzter Probenmenge unzweckmäßig machte.

Die im Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Methoden der Flüssig-Extraktion können ohne Verdampfungsschritt mit der Festphasenextraktion gekoppelt werden.

Bei der Verwendung des Chloroform/Methanol-Systems kann die Chloroformphase der Methode von *Kaluzny et al.* (171) entsprechend direkt auf die SPE-Säulen gegeben werden. Während die Retinsäuren in diesem Schritt quantitativ auf der Säule zurückgehalten werden, ist die Retention der unpolaren Retinoide (insbesondere der Retinylester) begrenzt. Das Eluat der Probenaufgabe wird daher mit dem Eluat des ersten Elutionsschrittes (Chloroform/2-Propanol) vereinigt.

Bei der Verwendung des Chloroform/2-Propanol-Systems wird das erhaltene Extrakt auf die SPE-Säulen gegeben. Während auch hier die polaren Retinoide zurückgehalten werden, durchlaufen die unpolaren Retinoide die Säulen ungehindert. Der anschließende Waschschrift mit einem kleinen Volumen an Chloroform/2-Propanol dient der Elution letzter Reste unpolarer Retinoide.

Vorteilhaft ist, daß die Glukuronide der Retinoide bei beiden Vorgehensweisen nicht hydrolysiert werden. Nachteilig ist aber, daß sie sich im Rahmen der Festphasenextraktion der weiteren Analyse entziehen. Sie sind nach der Flüssig-Extraktion in der organischen Phase enthalten und werden mit den anderen Retinoiden auf die SPE-Säule aufgebracht. Dort werden sie von dem Sorbens sehr effektiv zurückgehalten. Weder die zur Elution der Retinsäuren verwendete Lösung noch polarere Elutionsmittel wie reines oder essigsäures Methanol können eine Elution herbeiführen.

Als problematisch erweist sich der Elutionsschritt mit essigsäurem Diethylether zur Elution der Retinsäuren, insbesondere hinsichtlich einer Kopplung mit einem *Reversed-Phase*-System in der anschließenden Chromatographie. Für diese Kopplung ist es günstig, die Probe nach dem Verdampfungsschritt in einem Methanol-Wasser-Gemisch zu lösen, das aufgrund seiner geringen Elutionskraft am Kopf der HPLC-Säule fokussiert werden kann und damit die Injektion größerer Volumina ermöglicht (vgl. Abschnitt 3.6.4). Bei Wiederaufnahme des trockenen Rückstandes in reinem Methanol (150 µL) kann beispielsweise nur etwa ¼ der Probenlösung (40 µL) in ein *Reversed-Phase*-HPLC-System injiziert werden (108,172). Ein

größeres Injektionsvolumen mit reinem Methanol würde zu einer Peakverbreiterung führen, ein geringeres Volumen bei der Wiederaufnahme würde die Probe nur unvollständig lösen.

Diethylether neigt zur Peroxidbildung und ist daher gewöhnlich mit ca. 0.01 % Butylhydroxytoluol (BHT) stabilisiert. BHT besitzt aber nur eine begrenzte Löslichkeit in Methanol/Wasser-Mischungen. Im Handel erhältlich ist auch Diethylether, der statt mit BHT mit ca. 2 % Ethanol versetzt ist. Ethanol trägt aber nur wenig zu einer Verminderung von Peroxiden bei (174). Retinoide sind aber, insbesondere wenn sie in einem dünnen Film an einer Glasoberfläche adsorbiert werden, gegenüber Peroxiden sehr empfindlich. Zudem zeigten alle in diesem Anwendungsbereich getesteten Diethylether (**Tab. 3-2.**) nach einer Aufkonzentrierung störende Peaks im Chromatogramm der polaren Retinoide. Aufgrund der beschriebenen Problematik in der Verwendung von Diethylether werden die polaren Retinoide mit einer Mischung aus essigsäurem Chloroform und 2-Propanol eluiert.

**Tab. 3-2.** Getestete Diethylether verschiedener Hersteller, die sich in dem Anwendungsbereich als ungeeignet erwiesen haben.

Hersteller	Diethylether	Art.-Nr.	Stabilisierung
Fluka	für die UV-Spektroskopie	31670	BHT
Fluka	für die HPLC	31675	BHT
Merck	Uvasol, für die Spektroskopie	100930	Ethanol
J.T.Baker	für die HPLC	9237	Ethanol

**Tab. 3-3.** Im Anwendungsbereich getestete Essigsäuren verschiedener Hersteller.

Hersteller	Essigsäure	Art.-Nr.	geeignet
Fluka	puriss. p.a. ACS, > 99.8 %	45731	-
Merck	Suprapur, 100 %	100066	-
J.T. Baker	für die Spurenanalyse, 99-100 %	9524	+
J.T.Baker	für die HPLC, 99-100 %	6152	-

**Tab. 3-4.:** Im Anwendungsbereich getestete SPE-Säulen verschiedener Hersteller.

Hersteller	SPE-Säule	Art.-Nr.	geeignet
Merck	LiChrolut, NH <sub>2</sub> , 3 mL, 500 mg	1.19697.0001	-
Varian	Bond Elut, NH <sub>2</sub> , 3 mL, 500 mg	12102041	-
Baker	Bakerbond, NH <sub>2</sub> , 3 mL, 500 mg	7088-03	+
Macherey-Nagel	Chromabond, NH <sub>2</sub> , 3 mL, 500 mg	730033	+

Problematisch ist auch die Verwendung bestimmter Essigsäure-Lösungen und ungeeigneter SPE-Säulen, die aufgrund von Verunreinigungen zu Überlagerungen der Analyten-Peaks im Chromatogramm führen (**Tab. 3-3. und Tab. 3-4.**).

### **Automatisierung**

Bei der manuellen Arbeitsweise werden die SPE-Säulen auf einer Vakuum-Vorrichtung plaziert und die verschiedenen Lösungsmittel oder Eluenten dann auf die Säulen pipettiert. Die Flußraten der Flüssigkeiten durch die SPE-Säulen werden über das Vakuum kontrolliert. Praktisch ist es schwierig, das Vakuum genau und reproduzierbar einzustellen; kleinere Volumina sind dabei besonders schwer zu handhaben. Manuelle Festphasenextraktionen sind deshalb arbeitsaufwendig.

Im Gegensatz zu Flüssig-Extraktionen können Festphasenextraktionen relativ einfach automatisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Automatisierung unter Verwendung des ASPEC (Firma Gilson) durchgeführt (Abschnitt E-7). Der ASPEC basiert auf einem Autosampler. Spezielle Gestelle enthalten Proben, Sammelgläschen, Lösungsmittel und SPE-Säulen. Die SPE-Säulen sind beweglich gelagert und können sowohl über Sammelgläschen als auch über einem Abfallreservoir positioniert werden. Mittels einer Einheit aus einer Spritzenpumpe und einer in alle Raumrichtungen beweglichen Nadel können die SPE-Säulen konditioniert, die Probe aufgegeben, und die Analyten in die Sammelgläschen eluiert werden. Im Gegensatz zu der manuellen Vakuumtechnik erfolgt die Proben- und Lösungsmittelaufgabe auf die SPE-Säulen im ASPEC über Druck. Dazu wird die SPE-Säule mit einer Dichtkappe versehen. Mit Hilfe der präzisen Spritzenpumpe können die Volumina der gewünschten Flüssigkeiten über die Nadel genau dosiert werden. Auch eine genaue Steuerung der Flußrate ist auf diese Weise möglich. Ein derartig automatisiertes SPE-System ermöglicht einen höheren Probandurchsatz (12 Proben in Folge) und arbeitet im Vergleich zu manuellen Methoden präziser. Aufgrund der Automatisierung kann die Festphasenextraktion bei der Bestimmung der Retinoide günstigerweise in völliger Dunkelheit abgewickelt werden.

### **Partikelbeladene Membranen (Disk-Technologie)**

Eine der neueren Entwicklungen auf dem Gebiet der Festphasenextraktion ist die Verwendung sogenannter partikelbeladener Membranen (PLM) anstelle von traditionellen SPE-Säulen. Diese Entwicklung findet in der Literatur häufig als Disk-Technologie Erwähnung (175-177). PLMs bestehen aus Mikropartikeln (ca. 8-10  $\mu\text{m}$ ), die in einen inerten porösen festen Träger (zumeist PTFE oder Glasfaser) eingebettet sind. Die im Vergleich zu traditionellen SPE-Säulen (ca. 40-50  $\mu\text{m}$ ) reduzierte Partikelgröße, die einheitlichere Partikelverteilung und die hohe Packungsdichte führt bei PLMs zu einem effizienteren Massen-

transfer. Aufgrund der großen Partikeloberfläche und damit hohen Kapazität kann auch ein dünnes Mikropartikelbett eine große Analytmenge adsorbieren. Die genannten Leistungsmerkmale ermöglichen generell eine Verringerung der für die Elution benötigten Lösungsmittelvolumina, was letztlich zu verringerten Analysenzeiten und einer höheren Endkonzentration des Analyten im Eluat führt. Beim Übergang von einer traditionellen SPE-Säule (3 mL, 500 mg) auf eine PLM (3 mL, 15 mg) können die Elutionsvolumina häufig von ca. 3-5 mL auf ein Volumen von 100-500  $\mu$ L reduziert werden.

Die Anwendung von PLMs in der Festphasenextraktion von Retinoiden läßt eine Reihe von Vorteilen erwarten. Eine Verringerung der benötigten Lösungsmittelmengen führt einerseits zu einer zeitlichen Verkürzung der Festphasenextraktion an sich, andererseits zu einem erheblich kürzeren folgenden Verdampfungsschritt. Beide Schritte sind vor dem Hintergrund der Analyten-Labilität von Vorteil.

Leider waren zum Zeitpunkt der Entwicklung der hier vorgestellten Routinemethode PLMs mit Aminopropyl-Sorbens noch nicht kommerziell erhältlich. Derartige Produkte werden mittlerweile von der Firma ANSYS Diagnostics (SPEC<sup>®</sup>) vertrieben. Daher wurde erst zum Ende dieser Arbeit hin mit Standardlösungen (100 ng/mL) untersucht, ob PLMs prinzipiell geeignet sind, die entwickelte Festphasenextraktion mit traditionellen SPE-Säulen zu ersetzen. Die Elutionsvolumina der traditionellen SPE-Säulen wurden den Empfehlungen der Packungsbeilage entsprechend dem PLM-Format angepaßt (Abschnitt E-8). Das verwendete Aminopropyl-PLM-Sorbens (ANSYS, 15 mg, 3 mL) führt in Verbindung mit beiden Flüssig-Extraktionen zu einer effizienten Anreicherung der Retinsäuren auf dem Sorbens. Das benötigte Volumen zu ihrer Elution kann im Vergleich zu den traditionellen Säulen von 3 mL auf 500  $\mu$ L verringert werden. Die beschriebenen Untersuchungen wurden manuell durchgeführt. PLMs können aufgrund ihrer Eigenschaften ohne Vakuum- oder Druckvorrichtung betrieben werden. Allein die Schwerkraft sorgt schon für eine ausreichende Flußrate der Lösungsmittel über die Säule. Damit ist eine manuelle Arbeitsweise erheblich vereinfacht. Die Säulen können für jeden Schritt in geeignete Probengläschen gehängt werden. Die Proben und Lösungsmittel werden auf die Säule pipettiert und die Schwerkraft sorgt für eine angemessene Flußrate. Die gleichen Eigenschaften, die die manuelle Vorgehensweise vereinfachen, erschweren jedoch eine Automatisierung. Bei Dosierung der einzelnen Lösungsmittel mit dem ASPEC wird das Sorbensbett nicht mehr vollständig mit Lösungsmittel benetzt, da sich durch das Zusammenspiel von angewandtem Druck (ASPEC) und hoher Durchlässigkeit (PLM) oberhalb des Sorbensbettes keine Flüssigkeitssäule bildet. Um eine vollständige Benetzung des Sorbens im automatischen Betrieb zu gewährleisten,

muß für einen angemessenen Gegendruck gesorgt werden. Eventuell kann dieser durch den Einsatz spezieller Filter ermöglicht werden.

### 3.4.4 Probenvorbereitung für die Injektion

#### Konzentrierung

Der Analyt muß hinreichend konzentriert werden, damit das injizierte Volumen eine detektierbare Menge Analyten enthält.

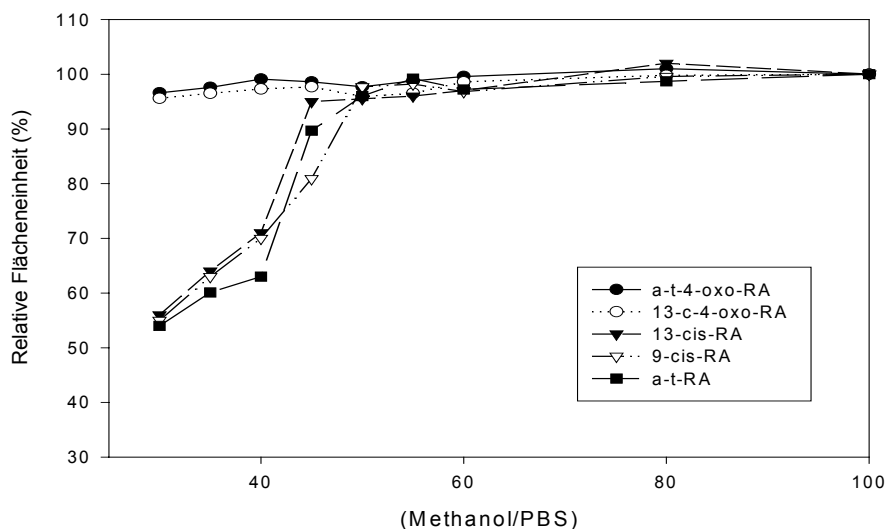
Kleine Extraktionsvolumina können gewöhnlich über einen Stickstoff-Konzentrator verdampft werden. Dazu werden die Probengläschen in einem Aluminiumblock leicht erwärmt. Mit Hilfe von Stickstoff, der über höhenjustierbare Kapillaren in die Probengläschen geleitet wird, wird die Verdampfungsrate des Lösungsmittels erhöht (178). Die Anwendung eines Stickstoff-Evaporators (Sample Concentrator, Techne) war zur Verdampfung der Lösungsmittel aus den Probengläschen der Festphasenextraktion nicht geeignet. Einerseits sind die zu verdampfenden Lösungsmittelvolumina so groß, daß zur Verdampfung beträchtliche Mengen Stickstoff benötigt werden. Zum anderen bleiben bei dieser Vorgehensweise beträchtliche Mengen der Analyten in den oberen Regionen des Probengläschens hängen, die der Wiederaufnahme in einem kleinen Volumen (200 µL) nur über einen Zwischenschritt mit einem größeren Volumen und anschließendem erneuten Verdampfen zugänglich sind.

Ein Rotations-Vakuum-Konzentrator liefert hier bessere Ergebnisse (Abschnitt E-9). Derartige Konzentratoren bestehen aus einer evakuierbaren heizbaren Zentrifuge mit Rotor und einer Vakuumpumpe, die mit einer Kühlfalle ausgestattet ist. Auf das zu verdampfende Lösungsmittel wirken ständig Zentrifugalkräfte, wodurch die Analyten nach und nach auf dem Boden des Probengläschens konzentriert werden und damit eine anschließende Wiederaufnahme in einem geringen Volumen deutlich erleichtert wird (178). Der Verdampfungsschritt erfolgt wegen der Labilität der Retinoide bei einer Temperatur von nur 30 °C (17). Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird das Vakuum durch Belüftung mit Stickstoff gelöst. Die Probengläschen werden noch in der Stickstoff-Atmosphäre mit Lamellengriffstopfen versehen, um eine Oxidation der Analyten durch Sauerstoff zu vermeiden. Da die noch im Eluat enthaltenen Matrixkomponenten zu einer Siedepunktserhöhung führen, ist der Zeitbedarf zur Verdampfung des Lösungsmittels aus dem Extrakt stark von der untersuchten Matrix abhängig. In der Reihe Standard > Embryo > Serum > Leber > Niere > Gehirn steigt der Zeitbedarf von 35 auf 75 Minuten.

### Wiederaufnahme

Die Proben müssen nach Abziehen des Elutionsmittels wieder in einem Lösungsmittel gelöst werden, das einerseits die Probe zu lösen vermag und andererseits mit den folgenden chromatographischen Bedingungen kombinierbar ist. Um die Probe im anschließenden Injektionsschritt möglichst am Säulenkopf zu fokussieren und damit große Injektionsvolumina zu ermöglichen, sollte die Probe idealerweise in einem Lösungsmittel gelöst werden, das eine geringere Elutionskraft aufweist als die mobile Phase der Chromatographie (vgl. Abschnitt 3.6.4).

Um die Löslichkeit der polaren Retinoide zu untersuchen, wurden Standards (5 ng/mL) in unterschiedlichen Methanol/PBS-Mischungen (PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung) angesetzt. Die hergestellten Standardlösungen wurden dann ca. 2 Tage im Autosampler bei 10 °C gelagert und anschließend injiziert (5  $\mu$ L). **Abb. 3-1.** zeigt, daß bei einem Anteil von 50 % Methanol, die relativen Peakflächen aller Komponenten größer als 95 % sind. Für die Routine in dieser Arbeit wurde daher zur Lösung der Retinoide eine Mischung von Methanol und PBS im Verhältnis 1:1 verwendet. Die Wahl der Lösungsmittel für die Wiederaufnahme der unpolaren Retinoide ist weniger kritisch, da das zur Messung dieser Analyten verwendete HPLC-System rein organische Eluenten verwendet. Deshalb kann die Wiederaufnahme in einer Mischung von Chloroform und Acetonitril im Verhältnis 1:9 erfolgen.



**Abb. 3-1.** Der Effekt des Methanol-Anteils in Methanol/PBS-Mischungen auf die Löslichkeit der polaren Retinoide. Alle Standards wurden mit der HPLC-Methode, die unter Abschnitt E-14 beschrieben ist, gemessen. Die Injektionsvolumina betrug allerdings 5  $\mu$ L. Die relativen Flächeneinheiten wurden durch den Vergleich der jeweiligen Peakflächen mit denen des Standards in 100 % Methanol berechnet (angeben sind die Mittelwerte aus  $n = 3$ ).

Die Vorgehensweise bei der Wiederaufnahme ist problematisch, da die Retinoide eine hohe Affinität zu den Glaswandungen der Probengläschen zeigen. Für polare Retinoide können, im Gegensatz zur direkten Verwendung einer Methanol/PBS-Mischung, generell bessere Wiederfindungsraten erhalten werden, wenn die Probe zunächst unter Ultraschallanwendung in Methanol gelöst wird und dann mit PBS verdünnt wird. Bei der Wiederaufnahme der polaren Retinoide in realen Proben kommt es wegen der Matrixkomponenten bei einem Verdünnungsschritt mit reinem Wasser häufiger zu stärkeren Trübungen der Probenlösung. Diese können jedoch weitestgehend durch die Verwendung der PBS-Lösung vermieden werden. Die Wiederaufnahme der unpolaren Retinoide erfolgt ebenfalls zweistufig. Nach Lösen der Probe in Chloroform folgt eine Verdünnung mit Acetonitril.

Zwischenzeitliches Vortexen erleichtert die Wiederaufnahme. Die Probengläschen werden nach jedem Pipettierschritt wieder mit dem Lamellengriffstopfen verschlossen, um das Verdunsten der Lösungsmittel zu verhindern. Nach der Wiederaufnahme werden die Proben in braune Probengläser mit Mikroglassensätzen pipettiert und in die Autosampler der beiden HPLC-Systeme gestellt.

### 3.4.5 Vergleich der neuentwickelten Probenvorbereitungssysteme

Untersuchungen der Teilprozesse mit Standards und Leber-Proben haben gezeigt, daß sowohl die Festphasenextraktion als auch der Wiederaufnahmeschritt beider Varianten der Probenvorbereitung quantitativ ist.

Unterschiede ergeben sich hinsichtlich der Effizienz der Flüssig-Extraktion. Zum Vergleich wurde ein Leberhomogenat je dreimal mit beiden Systemen aufgearbeitet und anschließend mit den unter Abschnitt E-14 beschriebenen HPLC-Verfahren gemessen (**Tab. 3-5.**). Beide Extraktionssysteme zeigen für den internen Standard der polaren Retinoide (RO101670) in einem ersten Extraktionsschritt etwa die gleiche Effizienz von 90 %. Die erhaltenen Peakflächen für die endogene *all-trans*-Retinsäure sind ebenfalls vergleichbar. Retinylnonanoat (interner Standard für die unpolaren Retinoide) wird über das 2-Propanol/CHCl<sub>3</sub>-System in einem ersten Extraktionsschritt effizienter extrahiert (95 %) als über das CHCl<sub>3</sub>/Methanol-System (81 %). Dieser Unterschied ist über die Peakflächen auch für die endogenen Retinylester und für Retinol ableitbar. Durch einen zweiten Extraktionsschritt kann im 2-Propanol/CHCl<sub>3</sub>-System die Wiederfindung um ca. 8 %, im CHCl<sub>3</sub>/Methanol-System um ca. 11 % gesteigert werden.

Aufgrund der effizienteren Extraktion im Bereich der unpolaren Retinoide wurde für die Routine in dieser Arbeit das 2-Propanol/CHCl<sub>3</sub>-System eingesetzt. Aufgrund der guten

Effizienz des ersten Schrittes konnte auf einen zweiten Extraktionsschritt verzichtet werden. Dieser könnte aufgrund der entstehenden größeren Extraktionsvolumina ohnehin nicht mehr direkt mit der Festphasenextraktion kombiniert werden. Die automatisierte Festphasenextraktion begrenzt nämlich die einsetzbaren Volumina auf etwa 5 mL.

**Tab. 3-5.** Vergleich der beiden Extraktionssysteme zur Probenvorbereitung von Retinoiden bei der Aufarbeitung einer Leber-Probe (Abschnitt E-29, 10 µg/kg-Gruppe an Tag 3).<sup>§</sup>

Analyt	2-Propanol/CHCl <sub>3</sub>			CHCl <sub>3</sub> /Methanol		
	Extraktionsschritt			Extraktionsschritt		
	1.	2.	Σ	1.	2.	Σ
	<b>Wiederfindung des zugesetzten internen Standards*</b>					
	[%]	[%]		[%]	[%]	
<b>RO101670</b>	87,9 ± 3,2	7,6 ± 1,1	95.5 %	89,2 ± 0,7	11,6 ± 1,0	100.8 %
<b>Retinylnonanoat</b>	94,7 ± 3,3	8,8 ± 0,7	103.5 %	81,4 ± 3,1	11,0 ± 0,8	92.4 %
	<b>Verteilung extrahierter endogener Retinoide auf die Extraktionsschritte**</b>					
	[%]	[%]		[%]	[%]	
<b>all-trans-RA</b>	92,2 ± 0,6	7,8 ± 1,1	100 %	88,3 ± 4,2	11,7 ± 1,4	100 %
<b>Retinol</b>	91,1 ± 2,3	8,9 ± 1,0	100 %	89,9 ± 2,0	10,1 ± 1,1	100 %
<b>Retinyloleat</b>	94,2 ± 4,3	5,8 ± 0,5	100 %	90,7 ± 3,4	9,3 ± 0,7	100 %
<b>Retinylpalmitat</b>	91,5 ± 2,6	8,5 ± 0,8	100 %	89,1 ± 2,1	10,9 ± 0,5	100 %
<b>Retinylstearat</b>	90,6 ± 4,3	9,4 ± 1,6	100 %	89,3 ± 1,9	10,7 ± 1,0	100 %

<sup>§</sup> die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung ( $n = 3$ )

\* relative Wiederfindung des zugesetzten internen Standards

\*\* prozentuale Verteilung der Retinoide auf die zwei Extraktionsschritte unter der theoretischen Annahme einer quantitativen Extraktion (100 %)

Beide Varianten der Flüssig-Extraktion kommen ohne eine Pufferkomponente vor der Extraktion aus. Eine Pufferung der Proben vor der Flüssig-Extraktion mit Ammoniumacetat-Puffer (60 mM, pH 5.5) bewirkt keinerlei Verbesserung. Chromatogramme der polaren und der unpolaren Retinoid-Fraktion zeigen unabhängig von der jeweiligen Extraktion keine größeren Unterschiede.

### 3.4.6 Stellenwert

Die entwickelte Probenvorbereitung stellt ein relativ einfaches Verfahren zur selektiven Abtrennung und Anreicherung von polaren und unpolaren Retinoiden aus Plasma und Geweben dar. Gegenüber ähnlichen veröffentlichten Verfahren weist sie wichtige Vorteile auf. Aus einer einzigen mengenmäßig begrenzten Probe können innerhalb desselben Arbeitsgangs neben den Retinsäuren und ihren Metaboliten auch unpolare Retinoide isoliert werden. Durch die Verwendung einer einfachen, effizienten Flüssig-Extraktion und deren



direkter Kopplung mit der automatisierten Festphasenextraktion ist ein höherer Proben-durchsatz bei einer reduzierten Zahl an manuellen Tätigkeiten möglich (**Tab. 3-6.**). Zudem ist die Kompatibilität der Festphasenextraktion mit *Reversed-Phase*-HPLC-Systemen sicher-gestellt.

**Tab. 3-6.:** Vergleich der manuellen Tätigkeiten in der Probenvorbereitung

<b>neue Methodik</b>	<b>Methodik nach <i>Hèbuterne et al.</i> (106)</b>
<b>Flüssig-Extraktion</b>	
Gewebe vorbereiten	Gewebe vorbereiten
Wasser zugeben	CHCl <sub>3</sub> -Methanol (2:1) zugeben
Homogenisieren	Homogenisieren
Homogenat in 2-Propanol pipettieren	Potter spülen
Schütteln	Spüllösung mit Homogenat vereinen
Zentrifugieren	Zugabe von NaCl-Lösung
Organische Phase abnehmen	Zugabe des internen Standards
Chloroform zugeben	Schütteln
Schütteln	Zentrifugieren
Zentrifugieren	Organische Phase abnehmen
	CHCl <sub>3</sub> -Methanol (2:1) zugeben
	Schütteln
	Organische Phase abnehmen und vereinen
	Eindampfen bis zur Trockene
	Wiederaufnahme in Chloroform
	Vortexen
<b>Festphasenextraktion</b>	
Probengläschen in ASPEC stellen	Konditionieren
	Probenaufgabe
	Auffanggefäß wechseln
	1. Elution
	Auffanggefäß wechseln
	2. Elution
<b>Probenvorbereitung für die Injektion</b>	
Probengläschen in Konzentrator stellen	Eindampfen bis zur Trockene (N <sub>2</sub> )
Wiederaufnahme in Methanol	Wiederaufnahme in Methanol
Vortexen	Vortexen
Mischen mit PBS	Überführen in Probenglas
Vortexen	Überführen in Autosampler (HPLC)
Überführen in Probenglas	
Überführen in Autosampler (HPLC)	

Die aufgezeigte prinzipielle Möglichkeit des Einsatzes partikelbeladener Membranen anstelle der traditionellen SPE-Säulen birgt Potential für weitere Vereinfachungen und eine Steigerung des Probendurchsatzes. Hierzu bedarf es in der Zukunft allerdings noch weiterer Entwicklungsarbeit (insbesondere hinsichtlich einer Automatisierung).

### 3.5 Chromatographische Bestimmung der unpolaren Retinoide

Die zu verwendende HPLC-Methode sollte eine Trennung der für biologische Proben relevanten unpolaren Retinoide gewährleisten. In biologischen Proben treten aus diesem Bereich überwiegend Retinol, Retinylpalmitat, Retinyloleat und Retinylstearat auf. Daneben finden sich geringere Mengen an kurzkettigen und ungesättigten Retinylestern (17,103,146). Eigentlich sind niedrige Nachweisgrenzen in diesem Bereich aufgrund der teilweise beachtlichen Konzentrationen in Geweben und Plasma von untergeordnetem Interesse (17,103,146). Das Verfahren sollte aber im Rahmen der Anwendungsbreite auch für Embryos bzw. embryonale Gewebe mit deutlich geringeren Gehalten geeignet sein. Daher erschien es vorteilhaft, ein möglichst großes Probenvolumen injizieren zu können, um nicht zu viel Empfindlichkeit über ein zu kleines Injektionsvolumen einzubüßen.

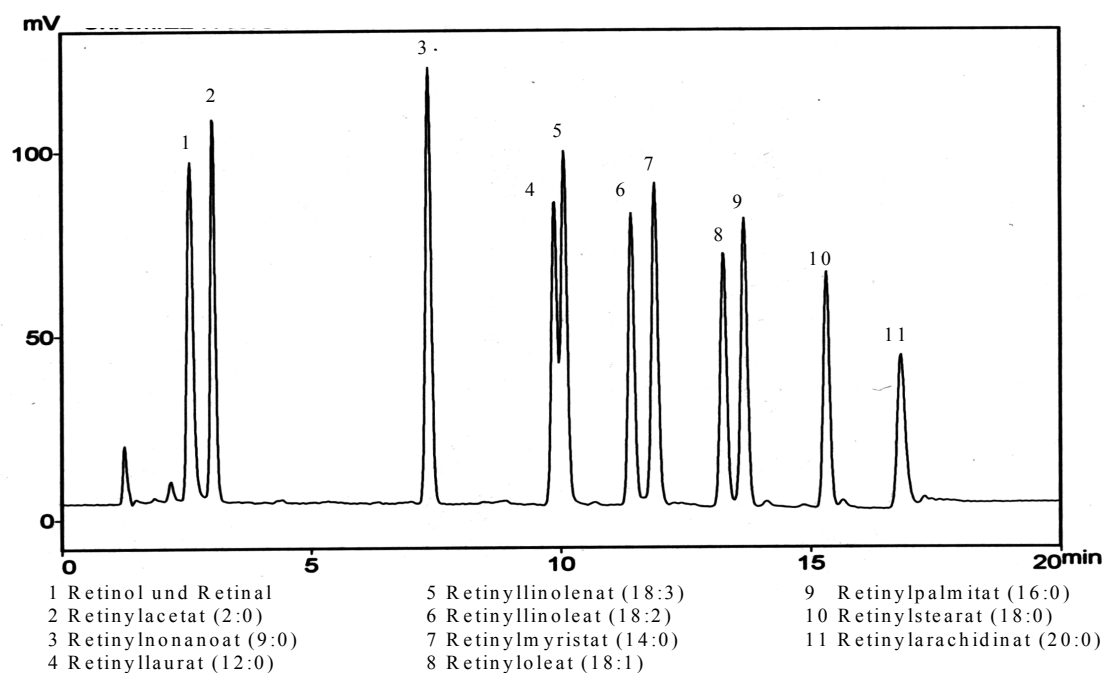
Retinol und die Retinylester sind in mit Wasser verdünnten organischen Lösungsmitteln sehr schlecht löslich. Stabile Lösungen erhält man nur bei Verwendung rein organischer Lösungsmittel. Vor dem Hintergrund eines großen Injektionsvolumens, das gut am Säulenkopf fokussiert werden soll, sind deshalb HPLC-Methoden mit wässrigen Eluenten ungünstig (vgl. Abschnitt 3.6.4).

*Normal-Phase*-Methoden erscheinen zwar vor diesem Hintergrund wegen des rein organischen Eluenten zweckmäßig, haben sich aber in der Praxis in diesem Bereich als wenig selektiv erwiesen (17,18,103).

Als günstig erweist sich hier eine *Reversed-Phase*-Trennung mit einem nicht-wässrigen Eluenten. *Furr et al.* (17,103,146) demonstrierten effiziente Trennungen der Retinylester über mobile Phasen mit Acetonitril, die chlorierte Kohlenwasserstoffe wie Dichlorethan, Dichlormethan oder Chloroform enthielten. Auch die ansonsten kritische Trennung von Retinyloleat und Retinylpalmitat war auf diese Weise möglich. Nachteilig in diesen Systemen ist die geringe Retention von Retinol, da seine Auswertung häufig infolge von Störungen durch den Injektionspeak verhindert wird (146). Um Trennungen mit geeigneten Retentionsfaktoren ( $k'$ ) zu erhalten, ist aufgrund der großen Polaritätsunterschiede zwischen Retinol und Retinylestern ein Lösungsmittelgradient erfolgversprechend. Trotzdem erscheint

es schwierig, bei der Verwendung von rein organischen Eluenten in Verbindung mit einer C18-Phase eine ausreichende Retention von Retinol zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei HPLC-Methoden auf *Reversed-Phase*-Basis mit nicht-wässrigen Eluenten und Gradientenelution entwickelt. Als Detektor wurde ein Zweiwellenlängen-UV-Detektor (325 nm und 340 nm) eingesetzt. In der ersten Variante wird ein binärer Eluent aus Acetonitril und Chloroform verwendet (Abschnitt E-11, **Abb. 3-2**).



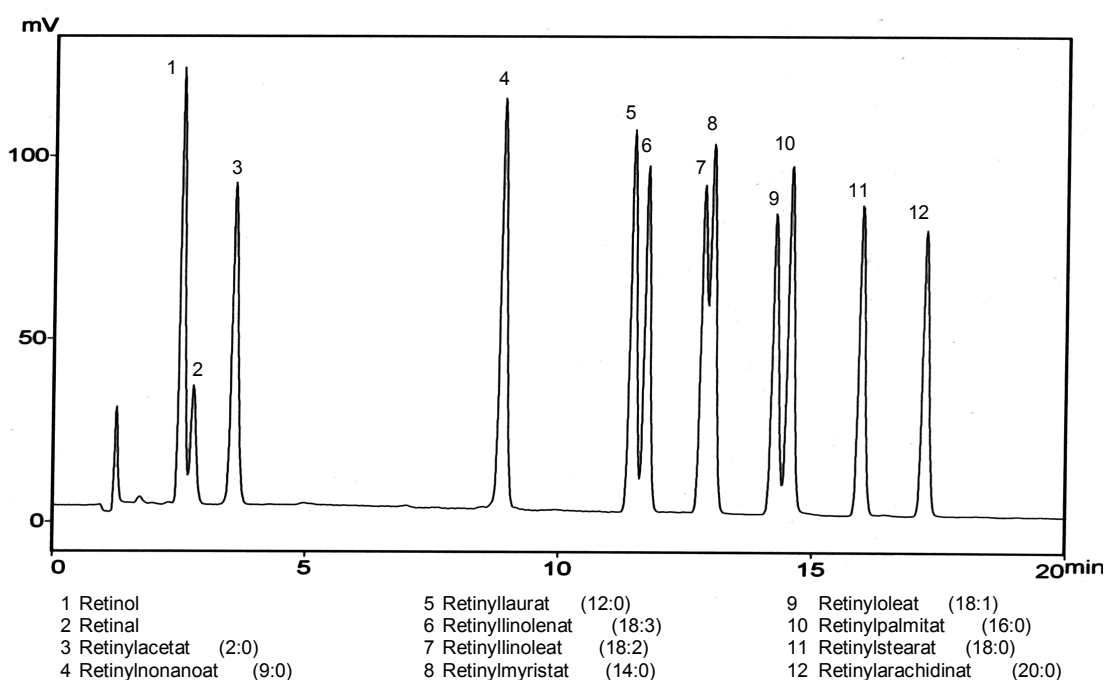
**Abb. 3-2.** Standard-Chromatogramm von Retinol (500 ng/mL) und verschiedener Retinylester (1000 ng/mL) nach der HPLC-Methode auf Basis eines nicht-wässrigen Gradienten mit Acetonitril und Chloroform und einer 4mm-C18-Säule und Detektion bei 325 nm (Abschnitt E-11).

Dieses Acetonitril/Chloroform-System ermöglicht eine schnelle Trennung aller wichtigen Retinylester, insbesondere des kritischen Paares Retinyloleat und Retinylpalmitat. Es vermag aber nicht Retinol und Retinal zu trennen. Eine Trennung von Retinol und Retinal wird in der zweiten Variante durch einen ternären Eluenten erreicht, der neben Acetonitril und Chloroform zur Änderung der Selektivität noch Methanol enthält (Abschnitt E-12, **Abb. 3-3**).

**Tab. 3-7.** Vergleich der Auflösung kritischer Analyten-Paare.

Analyt-Paar	Auflösung <sup>1</sup> <i>R</i>	
	binärer Eluent (Abschnitt E-11)	ternärer Eluent (Abschnitt E-12)
Retinol/Retinal	0,00	1,18
Retinylaurat/Retinylilinolenat	0,95	1,19
Retinylilinoleat/Retinylmyristat	1,42	0,85
Retinyloleat/Retinylpalmitat	1,39	1,19

**Tab. 3-7.** zeigt die sich ergebenden Veränderungen in der Auflösung<sup>1</sup> *R* kritischer Analysenpaare (179). Während durch den Methanol-Zusatz das Paar Retinol/Retinal eine hinreichende Auflösung zeigt, verändert sich gleichzeitig die Auflösung im Bereich der Retinylester. Während das Linoleat/Myristat- und das Oleat/Palmitat-Paar schlechter aufgelöst sind, verbessert sich die Auflösung für das Laurat/Linolenat-Paar.



**Abb. 3-3.** Standard-Chromatogramm von Retinol und Retinal (500 ng/mL) und verschiedener Retinylester (1000 ng/mL) nach der HPLC-Methode auf Basis eines nicht-wässrigen Gradienten mit Methanol, Acetonitril und Chloroform und einer 4mm-C18-Säule und Detektion bei 325 nm (Abschnitt E-12).

<sup>1</sup> Berechnung gemäß

$$R = \frac{1,177 (t_{r2} - t_{r1})}{b_{0,5(1)} + b_{0,5(2)}} \text{ mit } t_r: \text{ Retentionszeit und } b_{0,5}: \text{ Peakbreite in halber Höhe}$$

Im Vergleich zu bisherigen Methoden (z. B. Kapazitätsfaktor<sup>1</sup>  $k' = 0,6$ ) zeigt Retinol in beiden Varianten eine ausreichende Retention ( $k' = 1,1$ ) (146). Dies ist im wesentlichen auf zwei Dinge zurückzuführen. Einerseits zeichnet sich die hier verwendete Säule (J'sphere ODS-H80, YMC) aufgrund des hohen Kohlenstoffgehalts von 22 % durch eine hohe Hydrophobizität aus, die die Retention von Retinol verbessert. Andererseits führt die niedrige Trenntemperatur von nur 5 °C über eine Zunahme der Viskosität zu einer langsameren Diffusion. Das Ergebnis ist eine langsamere Kinetik und eine bessere Retention des Retinols.

Generell stellt die Temperatur in beiden Systemen ein effektives Mittel dar, um die Selektivität zu beeinflussen. Bei höheren Temperaturen verschlechtert sich jeweils die Auflösung des Linoleat/Myristat- und des Oleat/Palmitat-Paares, wohingegen das Laurat/Linolenat-Paar besser aufgelöst wird (vgl. Abschnitt 3.7.6).

Für die Routine wurde das HPLC-System mit ternärem Eluentengemisch eingesetzt. Obwohl Retinal gewöhnlich endogen nicht in signifikanten Mengen auftritt (17), erscheint die Möglichkeit seiner Bestimmung vor dem Hintergrund der hier zu behandelnden Fragestellung bedeutsam. Schließlich führt eine Exposition mit dioxinartigen Substanzen im jeweiligen Organismus zu einem verstärktem (oxidativen) Abbau von Vitamin A (vgl. Abschnitt 2.3.2). Trotz der vergleichsweise etwas schlechteren Auflösung des Oleat/Palmitat-Paares ermöglicht dieses System eine schnelle Trennung aller endogen dominierenden Retinylester.

Zur Bestimmung der unpolaren Retinoide wird eine *Normalbore*-HPLC-Säule (4.6 mm x 150 mm, 4 µm Partikel) verwendet. Aufgrund der ausreichend hohen Gehalte an unpolaren Retinoiden in biologischen Matrices ist die Messung hinsichtlich der Empfindlichkeit unproblematisch. Auf die Verwendung von *Microbore*-Säulen zur Steigerung der Empfindlichkeit ist daher hier verzichtet worden. Eine *Normalbore*-Säule erscheint zudem bei der hohen Matrixbelastung der Probe geeigneter, da sie eine höhere Probenkapazität aufweist. Der Schwerpunkt der Probenvorbereitung liegt in der Trennung der polaren Retinoide von einem Großteil der Lipid-Matrix. Der Hauptanteil der Matrix-Lipide findet sich nach der Probenvorbereitung in der Fraktion der unpolaren Retinoide und wird mit der Probe auf die Säule injiziert. Dies kann aufgrund von Lipid-Niederschlägen auf der Säule zu Problemen führen (146). Um derartige Störungen zu vermeiden, wird die Säule im Anschluß an die Trennung

---

<sup>1</sup> Berechnung gemäß

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_r} \quad \text{mit } t_r: \text{ Retentionszeit und } t_0: \text{ Totzeit}$$

jeweils mehrere Minuten mit einem hohen Anteil Chloroform gespült. Zudem wird die Säule über ein Vorsäulenfilter geschützt, der bei Bedarf leicht ausgetauscht werden kann.

Das System vermag nicht, zwischen den verschiedenen Stereo-Isomeren von Retinol und Retinylestern zu unterscheiden. Die verschiedenen Analyten werden als Summenparameter ihrer möglichen Stereo-Isomere bestimmt. Die Kalibrierung der Bestimmung erfolgt über die all-*trans*-Isomere der betreffenden Retinoide. Der bei der anschließenden Bestimmung aller Isomere als Summenparameter gemachte systematische Fehler kann als klein eingestuft werden, da Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der *cis*-Isomere denen der all-*trans*-Form ähneln (17). Zudem kann in biologischen Proben von etwa 90 % all-*trans*-Anteil ausgegangen werden (24).

Seit Ross aufzeigte, daß alle Retinylester den gleichen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten aufweisen (180), ist es in der HPLC mit UV-Detektion gängige Praxis, bei einer Auswertung über die Peakflächen, Retinylpalmitat als quantitativen Standard für die anderen Retinylester zu verwenden (144,146,181). Da sich diese Vorgehensweise bei Verwendung von aufgereinigten Standardlösungen auch in dem hier präsentierten Gradientensystem als korrekt herausstellte (vgl. **Abb. 3-3.**), erfolgte die quantitative Auswertung anderer Retinylester in guter Näherung über die Kalibrierung von all-*trans*-Retinylpalmitat (vgl. Abschnitt 3.7.2). Überdies wiesen die zur Verfügung stehenden Referenzlösungen der übrigen Ester erhebliche Verunreinigungen auf und ihre Verwendung hätte eine aufwendige Aufreinigung erfordert. Die über die Kalibrierung von Retinylpalmitat ermittelten Konzentrationen in ng/mL müssen jeweils im Anschluß noch unter der Berücksichtigung der Molmassen auf die Konzentration des jeweiligen Esters umgerechnet werden. **Tab. 3-8.** gibt einen Überblick über die zu verwendenden Korrekturfaktoren.

**Tab. 3-8.** Korrekturfaktoren für die quantitative Auswertung der Retinylester über die Kalibrierung von Retinylpalmitat.

Retinylester	Molmasse	Korrekturfaktor ( $M_{\text{Ester}}/M_{\text{Palmitat}}$ )
Laurat (12:0)	468	0,893129771
Linolenat (18:3)	546	1,041984733
Linoleat (18:2)	548	1,045801527
Myristat (14:0)	496	0,946564885
Oleat (18:1)	550	1,049618321
Palmitat (16:0)	524	1
Stearat (18:0)	552	1,053435115
Arachidinat (20:0)	580	1,106870229

## 3.6 Chromatographische Bestimmung der polaren Retinoide

Zur Bestimmung der polaren Retinoide bedarf es aufgrund der geringen endogenen Gehalte einer besonders empfindlichen Methode. Eine Verbesserung der Empfindlichkeit kann in der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie insbesondere über die Detektion und eine Optimierung der Säulenparameter erfolgen. Mögliche Ansatzpunkte, die zu einer Steigerung der Empfindlichkeit führen, lassen sich aus der Theorie ableiten.

### 3.6.1 Theoretische Grundlagen zur Optimierung der Säulenparameter

#### Säulendimensionen

Die Verdünnung  $D$  des Analyten auf der Trennsäule wird über die folgende Gleichung beschrieben (182-184):

$$D = \frac{c_0}{c_{\max}} = \frac{\varepsilon_t \pi r^2 (1+k') \sqrt{2\pi L H}}{V_{inj}}$$

mit:  $c_0$  ursprüngliche Konzentration des Analyten  
 $c_{\max}$  Konzentration des Analyten im Peakmaximum  
 $r$  Säulenradius  
 $k'$  Kapazitätsfaktor  
 $L$  Säulenlänge  
 $H$  Trennstufenhöhe  
 $\varepsilon_t$  Porosität der chromatographischen Trennsäule  
 $V_{inj}$  injiziertes Probenvolumen

Gemäß dieser Gleichung nimmt die Verdünnung  $D$  des Analyten auf der Trennsäule proportional dem Quadrat des Säulenradius  $r$ , der Wurzel der Säulenlänge  $L$  und der Trennstufenhöhe  $H$  ab. Bei einem Wechsel von einem Innendurchmesser  $d = 4,6$  mm auf  $d = 1$  mm ergibt sich ein Konzentrationsanstieg von  $c_{\max}$  gemäß  $(4,6)^2/(1)^2 = 21,16$ . Bei konzentrationsabhängigen Detektoren, wie dem UV-Detektor, führt der Konzentrationsanstieg über einen Anstieg der Peakhöhe entsprechend zu einer verbesserten Nachweisgrenze.

#### Teilchendurchmesser der Packung

Die Verwendung kleinerer Partikel führt zu kürzeren Diffusionswegen und kleineren Volumina zwischen den Partikeln. Dies ermöglicht einen schnelleren Massentransfer und führt entsprechend der *Van-Deemter*-Gleichung zu kleineren Trennstufenhöhen  $H$ , die wiederum den Einsatz kürzerer Säulen ( $L$ ) ermöglichen (125,179,185-187). Eine Verringerung des Teilchendurchmessers führt also gemäß der obigen Gleichung über die Parameter  $H$  und  $L$  zu einer verringerten Verdünnung.

### 3.6.2 Methodenauswahl und Optimierungskonzept

Vor dem Hintergrund der Theorie in Abschnitt 3.6.1 wurde als Ausgangspunkt in der Methodenentwicklung aus der Literatur eine Methodik ausgewählt, die eine konventionelle Säule mit einer mittleren Partikelgröße von 3  $\mu\text{m}$  verwendet (24,118). Kleinere Partikelgrößen als 3  $\mu\text{m}$  sind zwar in der Literatur erwähnt, kommerziell aber bisher nicht als Standard-Säulen erhältlich (186,188). Das beschriebene HPLC-System ermöglicht die Bestimmung aller wesentlichen polaren Retinoide mit einer hohen Empfindlichkeit und Selektivität. Zur weiteren Steigerung der Empfindlichkeit wurde im folgenden versucht, die Methode auf *Microbore*-Säulen zu übertragen. Eine Miniaturisierung stellt aber immer gewisse Anforderungen an die Apparatur.

### 3.6.3 Problematik einer Miniaturisierung in der Praxis

#### Totvolumina und Detektorzelle

Wenngleich der Hauptbeitrag zur Dispersion (Verteilungsbreite der Substanz) im Regelfall durch die Trennsäule zustande kommt, so hat gerade ein Übergang zu *Microbore*-Säulen die Bedeutung der früher völlig unbeachteten Beiträge außerhalb der Trennsäule entscheidend aufgewertet. Ursache für eine Dispersion außerhalb der Säule ist der Transport der Analyten durch das Totvolumen, also die Bereiche, in denen kein Trennprozeß stattfindet. Dazu gehören Kapillaren, Verbindungsstücke, Injektionsventile, Vorsäulen und Detektorzellen. Aufgrund der niedrigen Diffusionskoeffizienten der Analyten in der flüssigen mobilen Phase werden die Strömungsprofile bei der Passage dieser Bereiche nicht ausgeglichen (185,189,190). Effekte dieser Art wirken umso störender, je größer das Totvolumen im Vergleich zum Retentionsvolumen der Proben wird. Folglich müssen bei der Verwendung von *Microbore*-Säulen die Beiträge, die eine Dispersion außerhalb der Säule verursachen, entsprechend verringert werden.

Probleme mit Totvolumina vor der Trennsäule können über eine Fokussierung des Analyten am Säulenkopf bei der Injektion verhältnismäßig leicht umgangen werden (siehe unten). Besonders wichtig sind daher die Kapillar-Verbindung zwischen Säule und Detektor, sowie das Detektorzellvolumen selbst. Die theoretische Behandlung zeigt, daß -bei gleichem Volumenstrom- kleinere Kapillarradien eine geringere Dispersion zur Folge haben (184). Daher wurde die Verbindung zwischen Säule und Detektor so kurz wie möglich gehalten und eine Kapillare mit geringem Innendurchmesser (0,1 mm ID, LC Packings) verwendet.

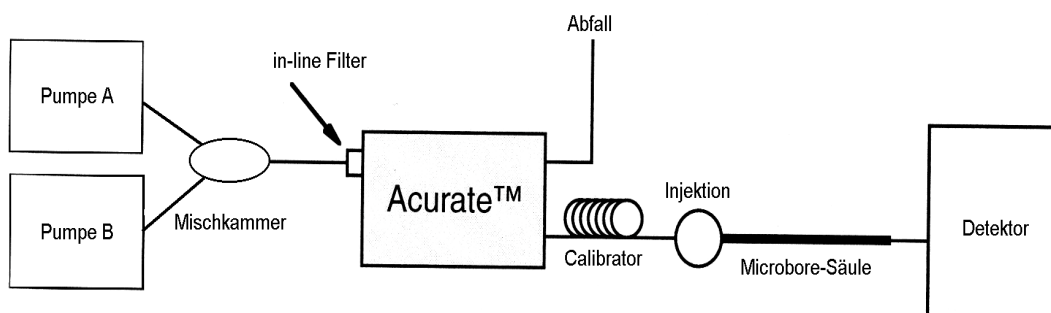


Jede Detektorzelle besitzt ein endliches Volumen. Infolgedessen ergibt sich eine bestimmte Konzentrationsverteilung im Zellraum. Anstelle der wahren Eingangskonzentration kann daher nur eine mittlere Konzentration registriert werden. Damit wirkt das Zellvolumen des Detektors als dynamisches Totvolumen und sollte bei kleineren Peakvolumina so verringert werden, daß zwei rasch aufeinander folgende Peaks noch unterschieden werden können. Optimal wäre ein Zellvolumen von weniger als 1/10 des Elutionsvolumens des schmalsten Peaks (125,184,187). Hier sind häufig aus gerätetechnischen Gründen Kompromisse zu schließen, da für eine optimale Anzeige eine bestimmte Schichtdicke benötigt wird (125,182,185).

Die Detektion erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit einem klassischen UV-Detektor für den drei Zellen zur Verfügung standen, die in Abhängigkeit von der gewählten Säule ein Optimum an Auflösung gewährleisteten (vgl. **Tab. 3-9**).

### Pumpen

Neben der Verringerung von Dispersionsbeiträgen außerhalb der Trennsäule muß auch die Flußrate durch die Säule verkleinert werden (184). Die Pumpe muß daher im *Microbore*-Bereich geringste Flußraten von 10-500  $\mu\text{L}/\text{min}$  präzise und pulsationsfrei fördern können (125,191). Die Pumpen des zur Verfügung stehenden HPLC-Systems von Shimadzu zeigen bei Flußraten bis auf ca. 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  herunter eine zufriedenstellende Leistung, auch bei der Verwendung von Lösungsmittel-Gradienten. Das System erfüllt damit gerade noch die Voraussetzung zur Arbeit mit *2-mm-Microbore*-Säulen. *1-mm-Microbore*-Säulen erfordern dagegen Pumpen einer neuen Gerätegeneration, die speziell für den *Microbore*-Bereich entwickelt wurden. Eine günstige Alternative sind *Flow-Splitter*, die vor dem Probenaufgabesystem eingebaut werden und auch mit konventionellen Pumpen niedrige Flußraten ermöglichen. Zur Arbeit mit *1-mm-Microbore*-Säulen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Flow-Splitter*-Kit der Firma LC Packings verwendet (**Abb. 3-4**).



**Abb. 3-4.** Schematischer Aufbau des HPLC-Systems mit Flow-Splitter (Acurate™, LC Packings).

### **Ausgasungen in der Detektorzelle**

Auch gut entgaste Eluenten können Reste gelösten Gases enthalten. Der Druckabfall nach der Säule bedingt infolge ungünstiger Konstruktion der Detektorzelle und/oder der geringen Flußraten eine Bildung von kleinen Gasblasen in der Detektorzelle, wodurch das Detektorsignal gestört wird (184,192). Um den Eluenten effektiv zu entgasen, wurden daher in dieser Arbeit nacheinander gleich mehrere Methoden angewandt: Heliumpurgung, Ultraschallbehandlung und *on-line*-Vakuumentgasung (184,192,193). Ein Gegendruckregulator bot zusätzlich die bequeme Möglichkeit, einen konstanten Gegendruck auf die Detektorzelle zu geben, wodurch ein Entgasen verhindert werden konnte (192).

### **Injektionsvolumen**

Das Injektionsvolumen sollte kleiner sein als die Dispersion (gemessen als Peakvolumen), die in der Säule auftritt (187). Wird die mobile Phase als Lösungsmittel der Probe verwendet, sollte das Injektionsvolumen nicht mehr als 15 % des Peakvolumens betragen (190,194). Aufgrund der Reduzierung des Peakvolumens bei der Verwendung von *Microbore*-Säulen müssen die Injektionsvolumina entsprechend verringert werden. Für 1-mm-Säulen beträgt das optimale Injektionsvolumen nicht mehr als 1 µL (182).

### **„Scaling Down“**

Im allgemeinen sollten Methoden, die für konventionelle Säulen entwickelt wurden, direkt auf *Microbore*-Säulen übertragen werden können. Besonders einfach ist dies bei der Verwendung von Säulen gleicher Länge und mit identischem Sorbensmaterial. In solchen Fällen muß man, um gleiche lineare Wanderungsgeschwindigkeiten entlang der Säule und gleiche Retentionszeiten zu erhalten, nur die Flußrate umgekehrt proportional zum Quadrat des Radiusverhältnisses der Säulen verringern (182,195-197). Für einen Übergang von einer 4-mm-Säule auf eine 2-mm-Säule muß die Flußrate beispielsweise mit  $(4/2)^2 = 4$  auf ein Viertel reduziert werden.

Häufig kommt es in der Praxis dennoch zu unterschiedlichen Chromatogrammen, da das Verweilvolumen der jeweiligen Anlage einen größeren Einfluß hat (182). Als Verweilvolumen wird das Volumen vom Ort der Mischung der zwei Eluenten bis zur Säule bezeichnet (inklusive Probenschleife). Das Verweilvolumen in einer Gradientenanlage bewirkt, daß die gewünschte Eluentenzusammensetzung die Säule erst nach einer bestimmten Zeit erreicht, da es zu Beginn des Gradienten ein isokratisches Eluentensegment einfügt. Bei *Microbore*-Trennsäulen und gleichem Verweilvolumen bewirkt die langsame Flußrate zu Beginn des Gradienten eine längere quasi-isokratische Elution. Je nach Flußrate herrscht daher nach einer bestimmten Zeit nach der Injektion eine andere Eluentenzusammensetzung

in der Säule. Das Ergebnis sind unterschiedliche Chromatogramme (182,195-198). Um diese Effekte möglichst klein zu halten, sollte daher versucht werden, das Verweilvolumen so weit wie möglich zu verringern.

### 3.6.4 Eignung der Miniaturisierung zur Steigerung der Empfindlichkeit bei der Analytik von polaren Retinoiden

In einem ersten Schritt wurde daher untersucht, inwieweit die theoretisch berechenbaren Empfindlichkeitssteigerungen in der Praxis umsetzbar sind.

Die Apparatur und die Methode wurden dabei entsprechend den jeweiligen Säulendimensionen (1 mm, 2.1 mm, 3 mm und 4 mm) angepaßt (Abschnitt E-13) (195). Unter Verwendung eines manuellen Injektionsventils mit 1- $\mu$ L-Schleife wurde dann jeweils derselbe Standard in die verschiedenen Systeme injiziert. **Abb. 3-5.** zeigt das Ergebnis.

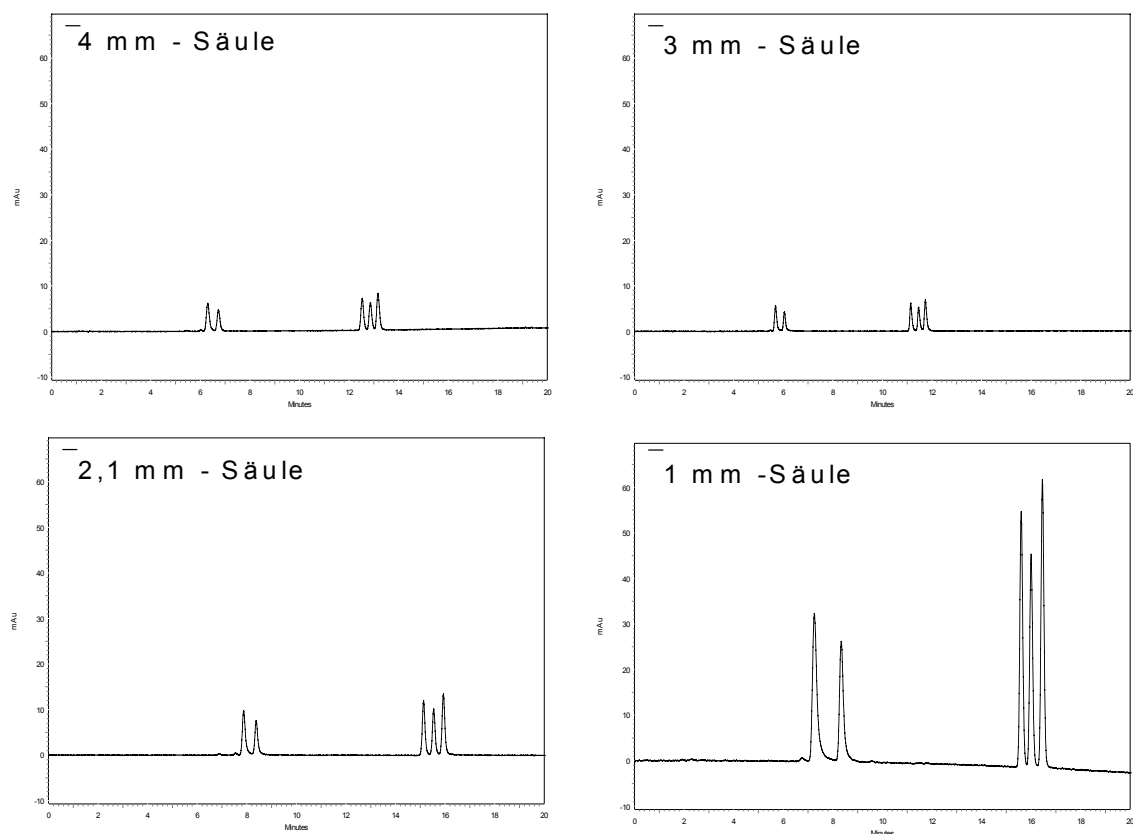
**Tab. 3-9.** zeigt die jeweilige in der Praxis durch Miniaturisierung realisierbare Empfindlichkeitssteigerung am Beispiel von all-*trans*-Retinsäure. Wie zu erwarten, zeigt die 1-mm-Säule die deutlichste Empfindlichkeitssteigerung. Der theoretisch berechenbare Gewinn kann aber nur zur Hälfte realisiert werden. Ein Verlust von 20 % ergibt sich aus der Konstruktion der Detektorzelle mit einer kleineren Schichtdicke. Die restlichen 30 % werden durch die Dispersion außerhalb der Säule verursacht.

**Tab. 3-9.** Apparative Parameter und resultierende Empfindlichkeitssteigerungen für all-*trans*-Retinsäure bei der Bestimmung mit konventionellen und *Microbore*-Säulen (Abschnitt E-13).

Säule (ID)	HPLC- Apparatur	Detektorzelle	Flußrate [ $\mu$ L/min]	Empfindlichkeitssteigerung für all- <i>trans</i> -Retinsäure		
				theoretisch berechnet	korrigiert (Schichtdicke)	praktisch realisiert
4 mm	normal	8 $\mu$ L, 10 mm	700			
3 mm	normal	2,5 $\mu$ L, 5 mm	390	1,8	0,9	0,9
2,1 mm	normal	2,5 $\mu$ L, 5 mm	200	3,6	1,8	1,8
1 mm	Flow-Splitter	140 nL, 8 mm	45	16	12,8	8,0

Bei der 3-mm- und der 2,1-mm-Säule treten erhebliche Einbußen der Empfindlichkeit aufgrund der ungünstigen Konstruktion der Detektorzelle auf. Diese speziell für *Microbore*-Säulen konzipierte Zelle der Firma Shimadzu weist nämlich nur noch die Hälfte der Schichtdicke auf. Rechnet man diesen Verlust heraus, so stimmt die dann korrigierte theoretisch

berechnete Empfindlichkeitssteigerung mit der in der Praxis gefundenen überein, d.h. die Dispersions-Beiträge außerhalb der Säule sind ausreichend klein.



**Abb. 3-5.** Chromatogramme eines Retinsäure-Mischstandards ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) nach Trennung auf konventionellen und *Microbore*-Säulen (Elutionsreihenfolge: all-*trans*-4-oxo-Retinsäure, 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure, all-*trans*-Retinsäure). Das Injektionsvolumen beträgt jeweils  $1 \mu\text{L}$  (Abschnitt E-13). Abzissen- und Ordinatenabschnitte sind in allen Chromatogrammen identisch.

Die Verwendung der Standard-Detektorzelle mit 10 mm Schichtdicke in Verbindung mit der 2,1-mm-Säule führt zu einer Peakverbreiterung auf halber Höhe von ca. 15-20 %. Die damit einhergehende Verschlechterung der Auflösung ist insbesondere bei realen Proben problematisch. Die Peakverbreiterung der 3-mm-Säule in Verbindung mit der Standard-Zelle ( $8 \mu\text{L}$ , 10 mm) ist akzeptabel (ca. 7 %) und die in dieser Kombination erreichte Empfindlichkeit entspricht damit der der 2.1-mm-Säule.

Das System mit der 1-mm-Säule stellte sich als für die Routine nicht praktikabel heraus. Dies ist im wesentlichen auf die Funktionsweise des Flow-Splitters zurückzuführen (**Abb. 3-5**). Ein Teil des Eluenten läuft dabei durch die analytische *Microbore*-Säule, der andere Teil über

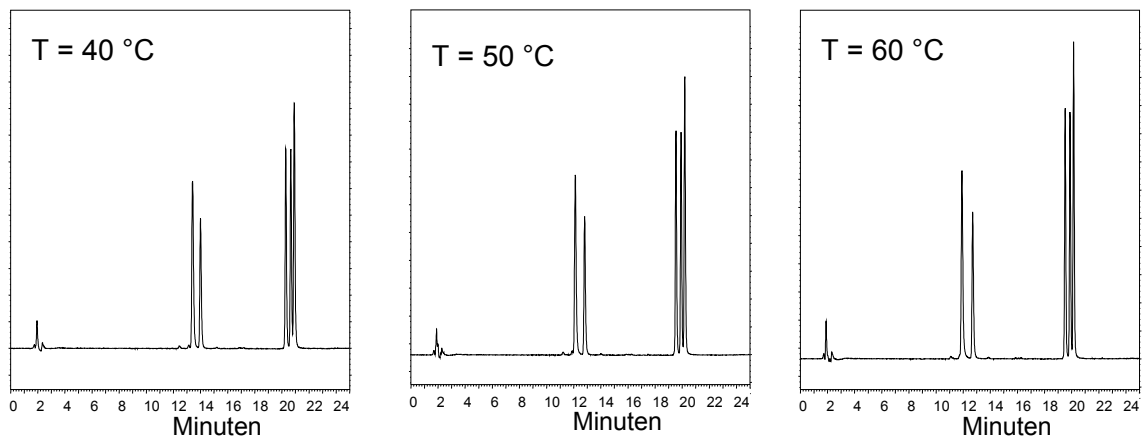
eine *Dummy*-Säule. Die *Dummy*-Säule weist einen geringeren Fluß-Widerstand auf als die analytische Säule. Da es sich um ein System mit konstantem Druck und Fluß handelt, müssen die relativen Durchlässigkeiten der beiden Säulen während eines Laufs konstant bleiben. Wenn die Durchlässigkeiten nicht konstant bleiben, ändert sich das Split-Verhältnis durch beide Säulen und verursacht wechselnde Retentionszeiten auf der analytischen Säule (186). Insbesondere matrixbelastete Proben sind daher in der Routine problematisch.

Für die Routine wurde die 2.1-mm-Säule ausgewählt. Im Vergleich zu der 3-mm-Säule (kombiniert mit der Standard-Zelle) zeigt sie bei vergleichbarer Empfindlichkeit eine etwas bessere Auflösung und einen geringeren Lösungsmittelverbrauch. Zudem eignen sich derartige Säulen auch besser zur Kopplung mit Detektoren der Massenspektrometrie, in denen größere Mengen von Lösungsmittel Probleme verursachen (195).

Die chromatographischen Parameter (Eluent, Gradientenverlauf etc.) der ursprünglichen Methodik wurden hinsichtlich der Selektivität gegenüber Matrixkomponenten angepaßt (Abschnitt E-14).

Im Rahmen dieser Anpassung stellte sich die Temperatur als effektiver Parameter zur Beeinflussung der erreichbaren Empfindlichkeit heraus. Verteilungsgleichgewichte, auf denen die Chromatographie beruht, sind temperaturabhängig und stoffspezifisch. Bei der Erhöhung der Temperatur des Eluenten nimmt seine Viskosität ab, was neben einer Druckabnahme zu einer schnelleren Diffusion führt. Das Ergebnis ist ein schnellerer Stoffaustausch, höhere Bodenzahlen, schärfere Peaks und eine niedrigere Nachweisgrenze (199,200). Zudem kann über eine Änderung der Temperatur häufig die Selektivität kontrolliert werden (vgl. Abschnitt 3.5). **Abb. 3-6.** zeigt den Einfluß der Temperatur auf die Trennung der Retinsäuren.

Eine Temperaturerhöhung um 40 °C auf 60 °C bewirkt sowohl eine leichte Verkürzung der Analysenzeit als auch einen Gewinn von 29 % in der Signalthöhe (bezogen auf all-*trans*-Retinsäure). Im betrachteten hohen Temperaturbereich ändern sich die Abstände der Peaks sehr wenig, d.h. die Temperatur hat in dem betrachteten Bereich keinen Einfluß auf die Selektivität. Höhere Temperaturen wurden nicht getestet, da dann durch Auflösungserscheinungen des Kieselgels die Lebensdauer der Säule drastisch sinkt (201).



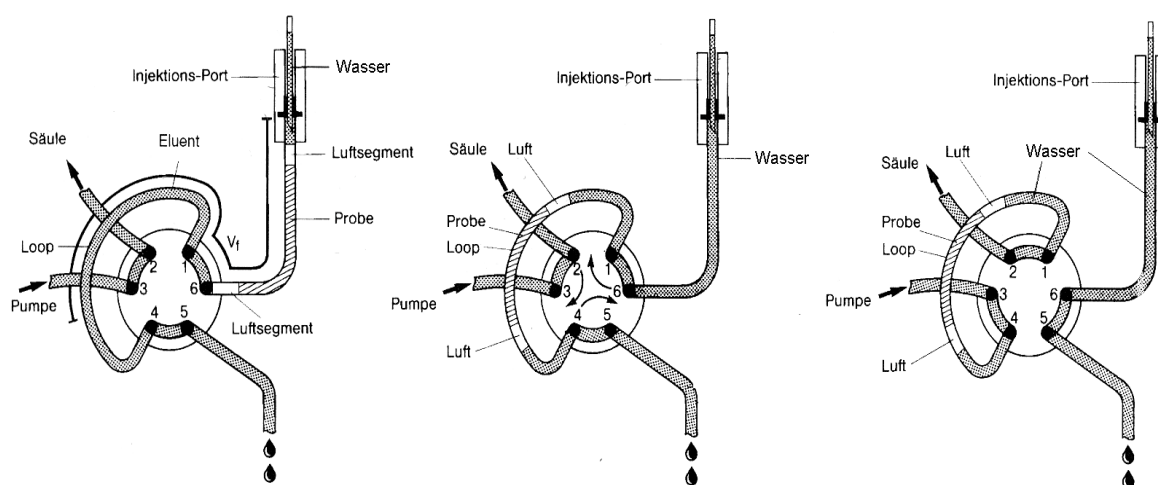
**Abb. 3-6.** Der Effekt der Temperatur auf die HPLC-Trennung von polaren Retinoiden (Abschnitt E-14, aber Fluß: 0,2 mL/min). (Elutionsreihenfolge: all-*trans*-4-oxo-Retinsäure, 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure, all-*trans*-Retinsäure).

### Injektionen mit großem Volumen

Der angestrebte Empfindlichkeitsgewinn durch Miniaturisierung kann aber vollständig nur genutzt werden, wenn die gleiche Probenmenge auf die Säule injiziert werden kann wie bei konventionellen Säulen (182). Erfreulicherweise kann das Injektionsvolumen erheblich gesteigert werden, sofern die Probe in einem Lösungsmittel löslich ist, dessen Elutionsstärke wesentlich unter der des Eluenten liegt. Nach Ankunft des Injektionspfropfens am Säulenkopf werden die Analyten dort in einem schmalen Band fokussiert. Diese sogenannte „*on-column*-Fokussierung“ erlaubt unter günstigen Bedingungen 100fache Steigerungsraten des Injektionsvolumens (182,184,191,194,202). Die Probenlösung sollte in *Reversed-Phase*-Trennungen ca. 20-30 % weniger organische Komponente enthalten, um eine gute Fokussierung am Säulenkopf zu erhalten (182). Für Gradiententrennungen ist dabei die Eluentenzusammensetzung zum Zeitpunkt der Injektion entscheidend. Die Probenlösung enthält in dem hier betrachteten System auf Methanol/Wasser-Basis nur 10 % weniger organische Komponente als der Eluent zum Zeitpunkt der Injektion (Abschnitt 3.4.4 und Abschnitt E-14). Zu einer effektiven Fokussierung am Säulenkopf bedarf es daher weiterer Techniken.

Die Fokussierung am Säulenkopf kann durch die Einführung eines kleinen Volumens von nicht-eluierendem Lösungsmittel vor dem Probenpfropfen weiter verbessert werden (191). Der verwendete Autosampler (AS-4000, Merck) bietet die Möglichkeit der Injektion eines kleinen Wasserpfpfens vor der eigentlichen Probe.

Dazu wurde die Waschlösung des Autosamplers gegen Wasser ausgetauscht. Aufgrund der Funktionsweise des Autosamplers wird dann automatisch ein kleines Volumen Wasser vor der Probe auf die Säule gespült (**Abb. 3-7**). Auf diese Weise konnte die Peakverbreiterung auf halber Höhe bei einer Injektion von 120  $\mu\text{L}$  im Vergleich zu einer Methanol/Wasser-Waschlösung (1:1, v/v) im Bereich der früh eluierenden Analyten zwischen 30 und 40 % verringert werden. Die Verwendung von Wasser als Spüllösung birgt die Gefahr einer Verschleppung in sich. Zum Herausspülen von Probenresten aus dem Injektionsventil wird im letzten Teil des Gradientenzyklus daher noch eine Injektion mit einem größeren Volumen Methanol durchgeführt (Abschnitt E-14).



**Abb. 3-7.** Funktionsweise des Autosamplers AS-4000 (modifiziert nach (203)). Nach dem Ansaugen der Probe (links) wird die Probe in Luftsegmente eingebettet mit Hilfe von Wasser in die Probenschleife (Loop) gespült (Mitte). Das Ventil wird umgeschaltet und ein Wasserpfropfen wird vor dem Probensegment auf die Säule gespült (rechts).

Aufgrund des sauren Charakters der Retinsäuren ( $pK_s$  6-8) kann ihre Retention über den pH-Wert verändert werden (204). Bei einem niedrigeren pH-Wert liegen die Retinsäuren undissoziiert vor und zeigen einen hydrophoberen Charakter. Optimal wäre ein pH von vier oder niedriger, da die Retinsäuren dann undissoziiert vorliegen. Eine Senkung des pH-Wertes muß auch immer vor dem Hintergrund einer damit einhergehenden Änderung der Selektivität betrachtet werden (199). Unter der Berücksichtigung beider Punkte wurde der pH-Wert des Eluenten auf 5,7 optimiert. Zur Erhöhung der Robustheit der Methode wird ein Ammoniumacetat-Puffer eingesetzt. Bei der Präparation des Eluenten wird der pH-Wert dabei vor der Zugabe des Methanol-Anteils in der wässrigen Lösung (Ammoniumacetat) auf pH 5,7 eingestellt. Es ist davon auszugehen, daß der pH-Wert nach der Mischung mit Methanol ein wenig ins Alkalische driftet (205). Der pH-Wert des Eluenten liegt damit im Bereich der

pk<sub>s</sub>-Werte der Retinsäuren, so daß, um stabile Bedingungen zu erhalten, der Eluent gepuffert sein muß. Der eingesetzte Ammoniumacetat-Puffer maskiert zudem noch Restsilanolgruppen der stationären Phase und führt so zu schärferen Peaks (151). Verglichen mit neutralen Bedingungen kann die Peakverbreiterung durch die Senkung des pH-Wertes auf 5,7 im Bereich der früh eluierenden Analyten um ca. 20 % verringert werden.

Die beschriebenen Techniken ermöglichen ein Injektionsvolumen von bis zu 150 µL, ohne daß eine Peakverbreiterung beobachtet werden kann. Verglichen mit sonst üblichen Injektionsvolumina von 5 µL entspricht dies einer Steigerung um den Faktor 30.

Vor allem bei matrixbelasteten Proben muß berücksichtigt werden, daß eine Säule nicht beliebig viel Probe trennen kann. Man erkennt die Stoffüberladung an einer Veränderung der Peakform und verkürzten Retentionszeiten (187,194,206). Da die Kapazität einer Säule der Menge des Packungsmaterials proportional ist, ist die Gefahr einer Stoffüberladung bei der Verwendung von *Microbore*-Säulen größer als bei konventionellen Säulen. Obwohl sich auch bei biologischen Proben die Injektion von 150 µL ohne Einfluß auf die Peakform als möglich erwiesen hat, führt eine Reihe von Injektionen nach und nach zu deutlich höheren Gegenständen, die den Routinebetrieb beeinträchtigen. Für die Routine wurde daher ein Injektionsvolumen von 120 µL ausgewählt, mit dem erfahrungsgemäß 48 Proben in Folge ohne Probleme injiziert werden können. Von den 200 µL Probenlösung, die aus der Probenvorbereitung resultieren (Abschnitt 3.4.4 und E-10), werden nur 60 % injiziert. Die hiermit erreichte Empfindlichkeit war für die untersuchten Proben ausreichend. Die Methode erlaubt es aber prinzipiell in Fällen, in denen niedrigere Nachweisgrenzen erforderlich sind, die Probe nach der Probenvorbereitung statt in 200 µL in 150 µL aufzunehmen und anschließend die gesamten 150 µL zu injizieren. Im Routine-Bereich wird durch das nur teilweise Injizieren der Probe eine Nachmessung ermöglicht, was sich angesichts der sehr begrenzten Mengen der biologischen Proben bei eventuellen apparativen Problemen als zweckmäßig erweist.

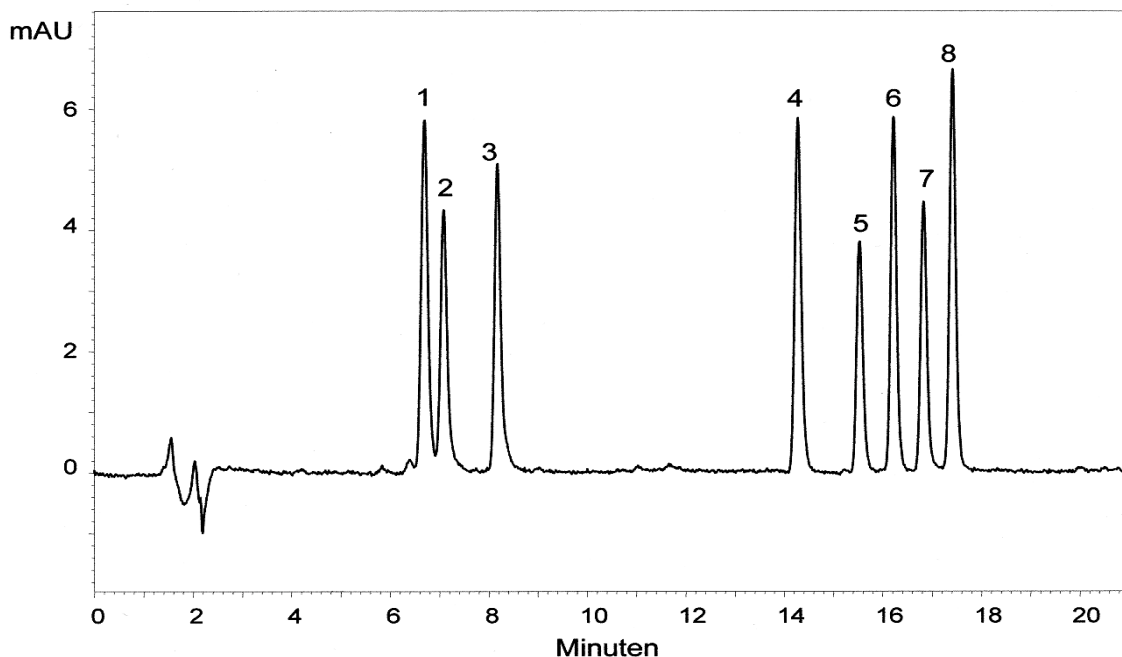
**Abb. 3-8.** zeigt ein Standard-Chromatogramm der polaren Retinoide, wie es mit der Routine-Methode erhalten wird (Abschnitt E-14).

Aufgrund der Vielzahl der möglichen Retinsäure-Isomere und ihrer Metabolite (vgl. **Abb. 2-3.**) ist es nicht weiter verwunderlich, daß sich bei dem hier entwickelten chromatographischen System Peaks bestimmter Retinoide überlagern. Wichtige Beispiele hierfür sind die Koelution von *all-trans*-4-OH-Retinsäure mit 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure und von 9,13-*di-cis*-Retinsäure mit 13-*cis*-Retinsäure. Im ersten Fall kann über die Berechnung des Flächenverhältnisses bei zwei Wellenlängen (340 nm und 356 nm) (vgl. Abschnitt 3.7.6)



aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsspektren zumindest ein Anhaltspunkt hinsichtlich der Art des in einer Probe vorliegenden Retinoids erhalten werden. Da die Absorptionsspektren von 9,13-di-*cis*-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure ähnlich sind, ist diese Vorgehensweise in diesem Fall wirkungslos. Hier bedarf es zur Differenzierung einer Ergänzungsmethode (vgl. Abschnitt 3.8.2). Glukuronide der Retinoide können mit der hier vorgestellten Methode nicht erfaßt werden, da sie sich im Rahmen der Festphasenextraktion der weiteren Analyse entziehen (vgl. Abschnitt 3.4.3). Zur Bestimmung von Glukuroniden der Retinoide bedarf es daher ebenfalls einer Ergänzungsmethode (vgl. Abschnitt 3.8.1). Es ist wichtig, herauszustellen, daß die Glukuronide im Rahmen der angewandten Proben-  
vorbereitung nicht hydrolysiert werden und somit nicht über ihr Aglykon (z. B. all-*trans*-Retinsäure) zu einer Artefakt-Bildung beitragen.

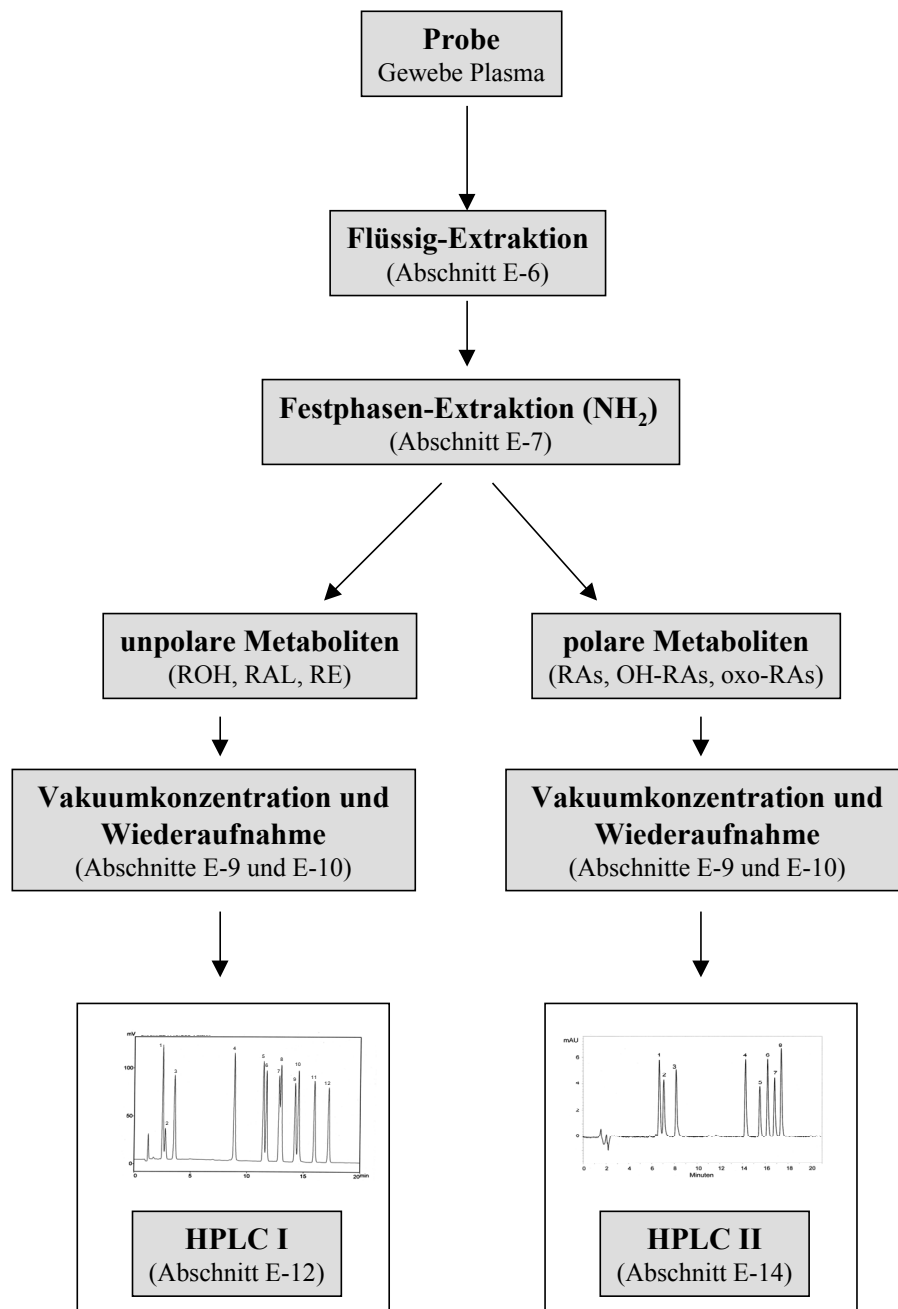
Trotz der beschriebenen Einschränkungen weist die entwickelte Methode bei hoher Empfindlichkeit eine hinreichende Selektivität für die physiologisch dominierenden polaren Retinoide auf.



**Abb. 3-8.** Standard-Chromatogramm der polaren Retinoide (10 ng/mL) nach der Routine-Methode auf der Basis eines gepufferten Wasser/Methanol-Gradienten (pH = 5,7), einer 2,1-mm-Säule und Detektion bei 340 nm (Abschnitt E-14). (all-*trans*-4-oxo-Retinsäure (1), 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (2), 13-*cis*-4-OH-Retinsäure (3), RO101670 (4), 3,4-dd-Retinsäure (5), 13-*cis*-Retinsäure (6), 9-*cis*-Retinsäure (7), all-*trans*-Retinsäure (8)).

### 3.7 Validierung

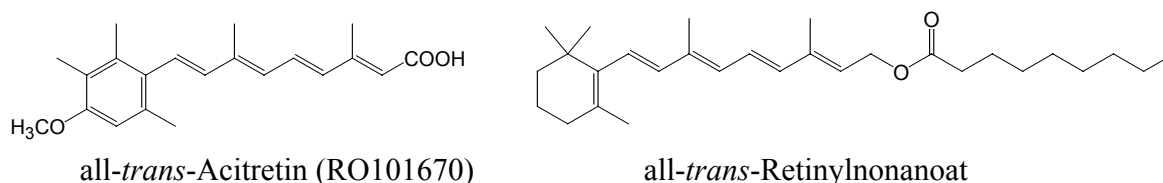
Durch eine Validierung soll der Nachweis erbracht werden, daß die entwickelte Verfahrensweise genau und zuverlässig den vorgesehenen Einsatzzweck erfüllt (Eignungsnachweis). Wichtige Validierungselemente sind: Präzision, Richtigkeit, Robustheit, Selektivität, Linearität, Wiederfindung und Nachweisvermögen (207-209). **Abb. 3-9.** gibt einen Überblick über die zu validierende Routine-Methode.



**Abb. 3-9.** Übersichtsschema zum Ablauf der entwickelten Routine-Methodik zur Analytik von polaren und unpolaren Retinoiden.

### 3.7.1 Interne Standards

Die Quantifizierung wird mittels interner Standards durchgeführt. Die internen Standards werden mit dem Extraktionsmittel am Anfang der Probenvorbereitung zugesetzt. Etwaige Fehler während der Extraktion, der Festphasenextraktion und der darauffolgenden Konzentrierung und Wiederaufnahme wirken sich anschließend gleich auf den internen Standard und die Analyten aus. Die Beeinflussung des Signals der internen Standards durch die Probenmatrix oder durch Unregelmäßigkeiten in der Probenvorbereitung wird auf die zu bestimmenden Analyten übertragen, indem stets mit dem Quotienten *Signal Analyt/Signal interner Standard* gearbeitet wird. Über die Quotientenbildung werden auf diese Weise auftretende Unregelmäßigkeiten bei jeder einzelnen Analyse kompensiert (119). Verbindungen, die als interne Standards verwendet werden können, sollten in den zu analysierenden Proben nicht vorhanden sein, ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften wie die Analyten aufweisen und frei von Interferenzen in der Chromatographie sein (119). Das synthetische Retinoid *all-trans*-Acitretin ist ein idealer interner Standard im Bereich der polaren Retinoide, da es bei struktureller Ähnlichkeit chromatographisch zwischen den Retinsäuren und ihren oxidierten Metaboliten eluiert. Für die Untersuchungen der unpolaren Retinoide wurde mit *all-trans*-Retinylnonanoat ein Retinylester als interner Standard ausgewählt, der endogen nicht vorkommt und chromatographisch zwischen Retinol, Retinal und den endogen auftretenden Retinylestern eluiert.



**Abb. 3-10.** Strukturformeln der verwendeten internen Standards.

### 3.7.2 Kalibrierung und Linearität

Anhand von Standardlösungen wurde der Zusammenhang zwischen Meßwerten (Signal) und verschiedenen Konzentrationen (Menge, Substanzgehalt) ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte für beide HPLC-Methoden jeweils auf 5 Konzentrationsniveaus bei 3 Messungen pro Konzentration. Alle Kalibrierlösungen wurden jeweils unabhängig voneinander hergestellt. Der ausgewählte Konzentrationsbereich deckt die für reale Proben zu erwartenden Konzentrationen ab: 10, 100, 1000, 2500 und 5000 ng/mL für die unpolaren Retinoide und 0,5, 1, 2,5, 5 und 7,5 ng/mL für die polaren Retinoide. Die Konzentration des internen

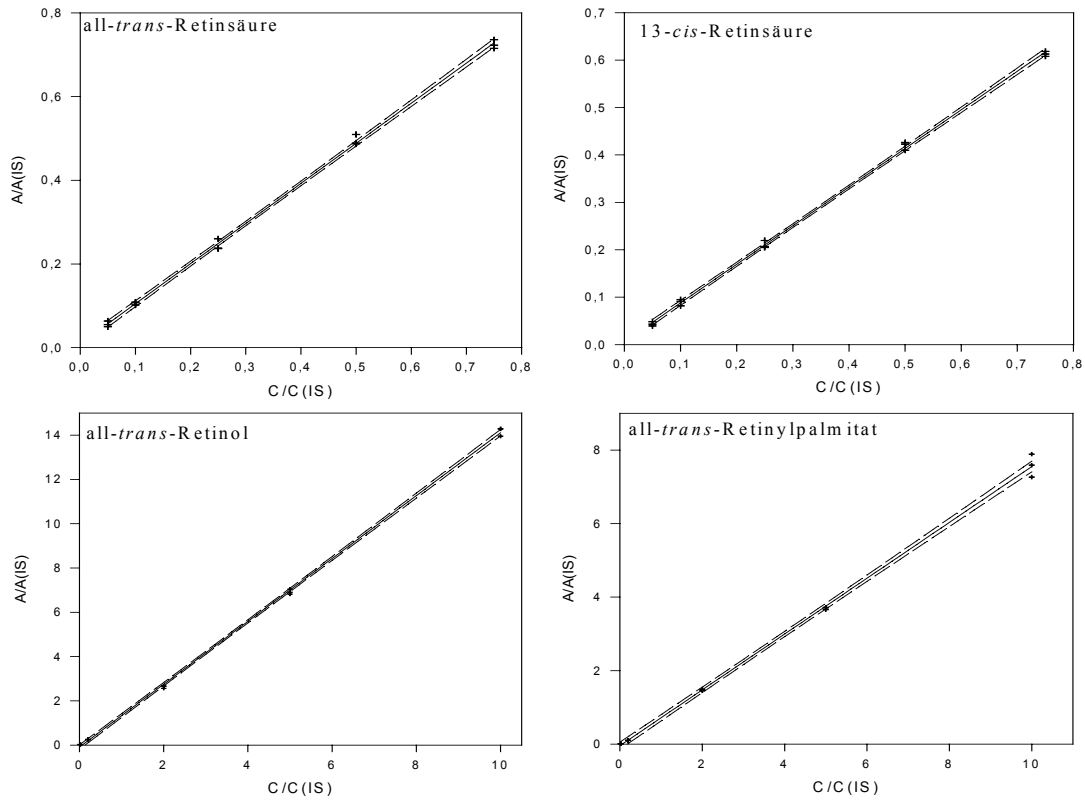
Standards all-*trans*-Acitretin betrug in allen Kalibrierlösungen (polare Retinoide) 10 ng/mL, die Konzentration von all-*trans*-Retinylnonanoat jeweils 500 ng/mL (unpolare Retinoide). Als mathematisches Modell zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Signal und Konzentration wurde die lineare Regression ausgewählt. Die entsprechende Kalibrierfunktion  $y = mx + b$  wurde für jedes Retinoid bestimmt (**Abb. 3-11.**) und die entsprechenden Regressionsparameter sind in **Tab. 3-10.** wiedergegeben. Alle statistischen Berechnungen erfolgten in diesem Zusammenhang über SigmaStat Statistical Software (Jandel Scientific, Erkrath).

**Tab. 3-10.** Regressionsparameter (Detektion für die polaren Retinoide bei 340 nm, für die unpolaren Retinoide bei 325 nm).

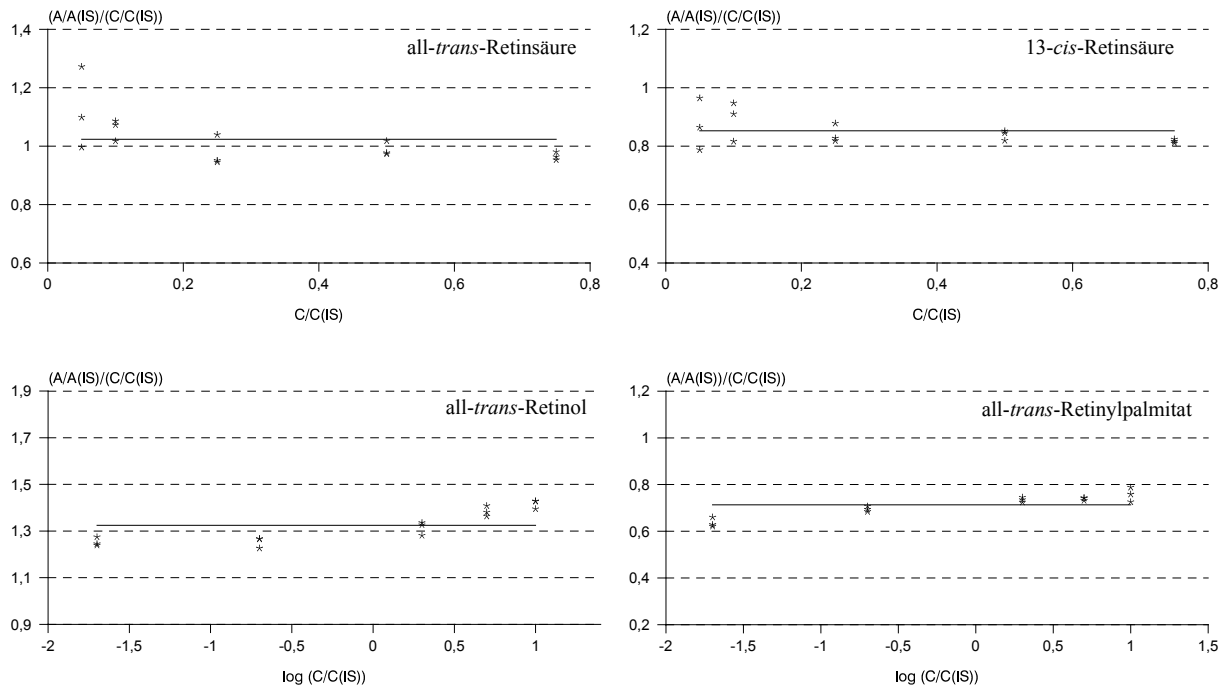
Retinoid	m	b	S <sub>y</sub>	r	t <sub>b</sub>	S <sub>X0</sub>
all- <i>trans</i> -4-oxo-RA	0,961752	-0,00456924	0,013	0,99944	0,863	0,01351700
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	0,641745	0,00323063	0,011	0,99965	0,697	0,01714076
13- <i>cis</i> -4-OH-RA	0,633677	0,01044640	0,010	0,99970	2,463	0,01578091
3,4-dd-RA	0,524884	0,00124891	0,009	0,99970	0,347	0,01714665
13- <i>cis</i> -RA	0,814175	0,00653353	0,007	0,99990	2,199	0,00859766
9- <i>cis</i> -RA	0,679866	0,00517072	0,011	0,99970	1,148	0,01617966
all- <i>trans</i> -RA	0,958608	0,00893991	0,010	0,99985	2,224	0,01043179
all- <i>trans</i> -Retinol	1,419860	-0,08902860	0,129	0,99970	1,961	0,09085403
all- <i>trans</i> -Retinal	0,512551	0,03056930	0,109	0,99860	0,797	0,21266176
all- <i>trans</i> -Retinylpalmitat	0,757792	-0,02923270	0,129	0,99910	0,645	0,17023141

m (Steigung der Geraden), b (Ordinatenabschnitt), S<sub>y</sub> (Reststandardabweichung), r (Korrelationskoeffizient), t<sub>b</sub> (berechnete Testgröße zur Signifikanz-Prüfung einer Abweichung von b hinsichtlich des Nulldurchgangs gemäß *t-Test*), S<sub>X0</sub> (Verfahrensstandardabweichung)

Dabei beschreibt die Reststandardabweichung (S<sub>y</sub>) die Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade (208,209). Die Verfahrensstandardabweichung (S<sub>X0</sub>) erhält man durch Division der Reststandardabweichung mit der Steigung, was einer Normierung auf die Mitte des Arbeitsbereichs entspricht (Streuung im Konzentrationsmaß). Eine Methode ist umso leistungsfähiger, je größer die Steigung und je kleiner die Reststandardabweichung ist (208,209). Die Verfahrensstandardabweichung ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit und kann zur statistischen Abschätzung des Nachweisvermögens der Methode herangezogen werden (vgl. Abschnitt 3.7.8). Mit der Prüfgröße t<sub>b</sub> kann über den *t-Test* geprüft werden, ob sich der gegebene Ordinatenabschnitt b signifikant von null unterscheidet (Nullhypothese). Da die berechneten Testgrößen t<sub>b</sub> durchweg kleiner sind als die Signifikanzgrenze von  $t_{(99\%, 13)} = 3,016$ , kann statistisch zwischen dem ermittelten Ordinatenabschnitt b und null kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.



**Abb. 3-11.** Regressionsgeraden wichtiger Retinoide mit 95 %-Vertrauensintervall (3 Messungen pro Konzentration).



**Abb. 3-12.** Prüfung auf Linearität durch die Auftragung des Quotienten aus Signal und Konzentration (Response) gegen die Konzentration (drei Messungen pro Konzentration).

Damit kann die Nullhypothese angenommen werden. Die linearen Korrelationskoeffizienten  $r$  sind für alle Retinoide mit Ausnahme von *all-trans*-Retinal (0,9986) besser als 0,999. Zur weiteren Überprüfung, ob der gewählte lineare Regressionsansatz akzeptabel ist, wurde jeweils noch ein visueller Linearitätstest durchgeführt (207,208). Dazu werden die Quotienten aus Signal und Konzentration (Response) gegen die Konzentration aufgetragen (**Abb. 3-12.**). Es zeigen sich auch hier keine groben Abweichungen von einem linearen Zusammenhang.

Die Auswertung der Chromatogramme realer Proben erfolgt jeweils mit den Daten dieser Grundkalibrierung. Diese Vorgehensweise erscheint akzeptabel, da bei der Ermittlung der Wiederfindungsrate gezeigt wurde (vgl. Abschnitt 3.7.5), daß die Wiederfindung der Retinoide in aufgestockten Proben in dem betrachteten Bereich unabhängig von Konzentration und Matrix gut mit dem jeweiligen internen Standard korreliert. Es ist daher davon auszugehen, daß Verluste in der Probenvorbereitung und Matrixeinflüsse in jeder einzelnen Probe gut über den internen Standard kompensiert werden.

### 3.7.3 Präzision

In der instrumentellen Analytik gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Gründe für eine Streuung von Ergebnissen, nämlich das Analysengerät selbst (Meßpräzision) und die Methode (Methodenpräzision) (208). Zur Ermittlung der Meßpräzision der HPLC für die polaren Retinoide wurde ein 7,5 ng/mL Standard fünffach injiziert und der Variationskoeffizient  $V_K$  über die Peakfläche bestimmt. Zur Ermittlung der Meßpräzision der HPLC der unpolaren Retinoide wurde ein 1000 ng/mL Standard verwendet, der vierfach injiziert wurde. Die Schwankungen durch das Analysengerät liegen unter 2 % (**Tab. 3-11.**).

**Tab. 3-11.** Meßpräzision der HPLC-Systeme.

Retinoid	$V_K$	Zahl der Messungen $n$	Standard
<i>all-trans</i> -4-oxo-Retinsäure	1,50 %	5	7,5 ng/mL
13- <i>cis</i> -4-oxo-Retinsäure	1,00 %	5	7,5 ng/mL
13- <i>cis</i> -4-OH-Retinsäure	1,20 %	5	7,5 ng/mL
RO101670 (IS)	1,10 %	5	10 ng/mL
3,4-dd-Retinsäure	1,40 %	5	7,5 ng/mL
13- <i>cis</i> -Retinsäure	1,30 %	5	7,5 ng/mL
9- <i>cis</i> -Retinsäure	0,70 %	5	7,5 ng/mL
<i>all-trans</i> -Retinsäure	1,50 %	5	7,5 ng/mL
<i>all-trans</i> -Retinol	1,80 %	4	1 µg/mL
<i>all-trans</i> -Retinal	1,90 %	4	1 µg/mL
<i>all-trans</i> -Retinylnonanoat (IS)	1,40 %	4	0,5 µg/mL
<i>all-trans</i> -Retinylpalmitat	0,20 %	4	1 µg/mL

Die Methodenpräzision ist eine Maß für die Schwankungen der Ergebnisse, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden, d.h. inklusive der Probenvorbereitung, der Messung und der Auswertung. Zur Ermittlung der Methodenpräzision wurden Mischstandards verschiedener Konzentrationen in BSA (5 %ige Rinderserumalbumin-Lösung in Phosphat-gepufferter Salzlösung, vgl. Abschnitt 3.7.5) dargestellt. Der Variationskoeffizient wurde für jede Konzentration über drei unabhängige Meßwerte desselben Standards bestimmt (**Tab. 3-13**). Rinderserumalbumin wird dabei näherungsweise als eine analytfreie Probe mit Matrix akzeptiert (158,210), wengleich der aufgestockte Analyt insbesondere im Vergleich mit Gewebe-Proben nicht unbedingt denselben Bindungszustand wie in einer realen Probe aufweist.

Um die Präzision an einer realen Probe zu überprüfen, wurde ein und dasselbe Leberhomogenat (Maus) sechsmal unabhängig voneinander an demselben Tag gemessen und der Variationskoeffizient der ermittelten Gehalte bestimmt (**Tab. 3-12**).

**Tab. 3-12.** Wiederholpräzision eines Leberhomogenats ( $n = 6$ ).

Substanz	Variationskoeffizient
unbekannter Metabolit*	1,7 %
all- <i>trans</i> -Retinsäure	2,5 %
Retinol	1,7 %
Retinyleat	1,4 %
Retinylpalmitat	2,4 %
Retinylstearat	2,2 %

\* vgl. Abschnitt 4

Die Wiederholpräzision von Tag zu Tag („*inter-day*“-Präzision) wurde bei den polaren Retinoiden mit einem 2,5 ng/mL, bei den unpolaren Retinoiden mit einem 500 ng/mL Standard in BSA bestimmt. Dazu wurden die beiden Standards jeweils an fünf aufeinanderfolgenden Tagen vermessen (**Tab. 3-13**).

Die Ergebnisse sind für den betrachteten Konzentrationsbereich akzeptabel (207). Die Methodenpräzision ist an der Bestimmungsgrenze generell besser als 17 %, bei den übrigen Konzentrationen besser als 10 %.

### 3.7.4 Richtigkeit

Die Überprüfung der Richtigkeit -als Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert mit einem als richtig akzeptierten Wert- erfolgte in einem Arbeitsgang mit der Bestimmung der Methodenpräzision.

Tab. 3-13. Validierungsergebnisse: Methodenpräzision und Richtigkeit (BSA-Lösungen).

Retinoid	Konzentration		Richtigkeit		Methodenpräzision		Wiederholpräzision von Tag zu Tag gefunden			
	zugesetzt [ng/mL]	gefunden [ng/mL]	$d_{rel}$ [%]	$n$	$s$	$V_K$	$n$	[ng/mL]	$s$	$V_K$
<b>all-trans-4-oxo-RA</b>	1,0	1,0	0,8	3	0,07	7,2	5	2,4	0,20	8,5
	2,5	2,5	-1,0	3	0,04	1,4				
	5,0	5,1	1,7	3	0,05	1,0				
	7,5	7,6	1,5	3	0,14	1,8				
<b>13-cis-4-oxo-RA</b>	1,0	1,1	7,8	3	0,11	10,0	5	3,0	0,18	6,1
	2,5	2,7	8,1	3	0,19	7,1				
	5,0	5,2	3,5	3	0,07	1,3				
	7,5	7,8	4,5	3	0,09	1,1				
<b>13-cis-4-OH-RA</b>	1,0	1,0	-0,9	3	0,05	4,8	5	2,4	0,18	7,7
	2,5	2,6	2,6	3	0,25	9,7				
	5,0	4,9	-2,2	3	0,19	3,9				
	7,5	7,2	-4,2	3	0,23	3,2				
<b>3,4-dd-RA</b>	1,0	0,9	-10,7	3	0,07	7,4	5	2,1	0,13	6,4
	2,5	2,3	-6,7	3	0,29	12,3				
	5,0	4,7	-6,3	3	0,25	5,4				
	7,5	7,2	-4,4	3	0,48	6,6				
<b>13-cis-RA</b>	1,0	1,1	6,9	3	0,13	12,1	5	2,3	0,18	7,8
	2,5	2,6	5,4	3	0,13	5,1				
	5,0	5,1	1,7	3	0,08	1,5				
	7,5	7,5	-0,5	3	0,27	3,6				
<b>9-cis-RA</b>	1,0	0,8	-17,6	3	0,05	6,6	5	2,4	0,16	6,8
	2,5	2,6	5,1	3	0,20	7,7				
	5,0	4,9	-2,1	3	0,04	0,9				
	7,5	7,1	-5,1	3	0,33	4,6				
<b>all-trans-RA</b>	1,0	1,1	12,7	3	0,05	4,6	5	2,8	0,18	6,2
	2,5	2,7	8,6	3	0,13	4,8				
	5,0	5,1	2,6	3	0,03	0,5				
	7,5	7,7	2,4	3	0,10	1,3				
<b>all-trans-Retinol</b>	10	10,5	5,0	3	1,7	16,3	5	534,7	25,75	4,8
	100	99,1	-0,9	3	3,2	3,2				
	500	508	1,6	3	10,0	2,0				
	1000	1024	2,3	3	24,4	2,4				
<b>all-trans-Retinal</b>	10	11,2	12,0	3	0,5	4,4	5	539,1	22,49	4,2
	100	108	8,1	3	2,0	1,8				
	500	548	9,6	3	11,5	2,1				
	1000	1052	5,2	3	18,4	1,8				
<b>all-trans-Retinylpalmitat</b>	10	11,8	17,5	3	0,8	6,6	5	524,8	12,57	2,4
	100	98,1	1,9	3	2,5	2,6				
	500	528	5,6	3	6,3	1,2				
	1000	1042	4,2	3	20,6	2,0				

$s$  Standardabweichung,  $V_K$  Variationskoeffizient,  $d_{rel}$  relative systematische Ergebnisabweichung



Als Referenzsubstanzen wurden Standards verwendet, die zuvor durch UV-Spektroskopie und Chromatographie überprüft und charakterisiert wurden (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Überprüfung auf Richtigkeit erfolgte nach einem Soll/Ist-Vergleich und Überprüfung mit dem *t-Test* ( $P = 95\%$ ). Als quantitatives Maß für die Richtigkeit ist die relative systematische Ergebnisabweichung  $d_{\text{rel}}$  (211) angegeben (**Tab. 3-13.**), die an der Bestimmungsgrenze generell kleiner als 18 %, bei den übrigen Konzentrationen kleiner als 10 % ist. Eine Überprüfung mit dem Sollwert-*t-Test* (208) ergibt in allen Fällen, daß der Sollwert mit der vorgesehenen Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb des Vertrauensbereichs des Analyseergebnisses liegt.

### 3.7.5 Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindungsrate erfolgte durch Aufstockexperimente (unabhängig hergestellte Aufstocklösungen). Optimal für diese Untersuchungen wäre eine analytfreie Probe mit der jeweiligen Matrix (Leerprobe). Der aufgestockte Analyt sollte dabei ähnlich an der Matrix gebunden sein wie unter realen Bedingungen (208). Hinsichtlich der zu untersuchenden biologischen Proben ist so gut wie keine Leerprobe verfügbar. Allein Plasma-Proben können in guter Näherung über Rinderserumalbumin-Lösungen simuliert werden, da in diesen Lösungen Retinoide ähnliche Bindungsverhältnisse aufweisen wie in den Plasma-Proben selbst. Für Gewebe, in denen andere Bindungsverhältnisse bestehen (vgl. Abschnitt 2.1.1), existiert keine akzeptable Leerprobe, so daß Wiederfindungsraten nur über ein Aufstocken realer Proben zugänglich sind. Beim Aufstocken realer Proben sollte die aufgestockte Konzentration nicht kleiner sein als die schon in der Probe vorhandenen endogenen Gehalte (119,208). Da die Wiederfindung von der Analytkonzentration abhängig sein kann, sind die so ermittelten Wiederfindungsraten damit streng genommen nur für einen Konzentrationsbereich oberhalb endogener Gehalte gültig (119). **Tab. 3-14.** und **Tab. 3-15.** geben einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Wiederfindung. Die Analyten (in Ethanol) wurden den BSA-Lösungen (5 %ige Rinderserumalbumin-Lösung in Phosphat-gepufferter Salzlösung) und Serum bei der Aufstockung in einem kleinen Volumen von 20  $\mu\text{L}$  pro 1000  $\mu\text{L}$  Probe zugegeben, um Effekte durch das Lösungsmittel zu minimieren. Das Aufstocken des Leberhomogenats führte -vermutlich aufgrund einer mangelnden Löslichkeit der Retinoide- zu keinen reproduzierbaren Proben. Daher erfolgte die Zugabe der Analyten hier zu Beginn der Probenvorbereitung mit dem Extraktionsmittel.

Die vorliegenden Ergebnisse für die polaren Retinoide zeigen unabhängig von der betrachteten Matrix und Konzentration akzeptable Wiederfindungsraten im Bereich von 81-95 %. Die Wiederfindungsraten der unpolaren Retinoide liegen im Bereich von 88-97 %.

Tab. 3-14. Validierungsergebnisse: Wiederfindung der polaren Retinoide ( $n = 3$ ).

% Wiederfindung (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)							
Retinoid	Konz. [ng/mL]	Serum (Ratte) <sup>§</sup>	IS [10 ng/mL]	Leber (Maus) <sup>§§</sup>	IS [10 ng/mL]	BSA	IS [10 ng/mL]
<b>all-trans-4-oxo-RA</b>	1					84 $\pm$ 7,2	82 $\pm$ 6,1
	2,5					84 $\pm$ 0,1	86 $\pm$ 4,5
	5	82 $\pm$ 10,4	85 $\pm$ 10,4			88 $\pm$ 4,8	86 $\pm$ 1,0
	7,5					88 $\pm$ 1,8	87 $\pm$ 1,1
	10	90 $\pm$ 3,0	88 $\pm$ 4,8	87 $\pm$ 2,3	85 $\pm$ 4,3		
	20	88 $\pm$ 3,6	87 $\pm$ 3,2	85 $\pm$ 3,5	87 $\pm$ 2,5		
	25			91 $\pm$ 3,8	88 $\pm$ 2,2		
<b>13-cis-4-oxo-RA</b>	1					87 $\pm$ 10,2	82 $\pm$ 6,1
	2,5					91 $\pm$ 0,6	86 $\pm$ 4,5
	5	84 $\pm$ 6,7	85 $\pm$ 10,4			92 $\pm$ 2,7	86 $\pm$ 1,0
	7,5					90 $\pm$ 1,1	87 $\pm$ 1,1
	10	92 $\pm$ 4,0	88 $\pm$ 4,8	88 $\pm$ 1,4	85 $\pm$ 4,3		
	20	88 $\pm$ 2,1	87 $\pm$ 3,2	87 $\pm$ 2,8	87 $\pm$ 2,5		
	25			84 $\pm$ 3,1	88 $\pm$ 2,2		
<b>13-cis-4-OH-RA</b>	1					86 $\pm$ 4,6	82 $\pm$ 6,1
	2,5					87 $\pm$ 0,8	86 $\pm$ 4,5
	5					83 $\pm$ 2,7	86 $\pm$ 1,0
	7,5					84 $\pm$ 3,2	87 $\pm$ 1,1
	10			85 $\pm$ 0,4	85 $\pm$ 4,3		
	25			84 $\pm$ 1,4	88 $\pm$ 2,2		
<b>3,4-dd-RA</b>	1					79 $\pm$ 5,9	82 $\pm$ 6,1
	2,5					78 $\pm$ 0,9 *	86 $\pm$ 4,5
	5					81 $\pm$ 7,9	86 $\pm$ 1,0
	7,5					83 $\pm$ 6,4	87 $\pm$ 1,1
	10			81 $\pm$ 2,8	85 $\pm$ 4,3		
	25			81 $\pm$ 1,6 *	88 $\pm$ 2,2		
<b>13-cis-RA</b>	1					86 $\pm$ 7,8	82 $\pm$ 6,1
	2,5					88 $\pm$ 0,4	86 $\pm$ 4,5
	5	83 $\pm$ 12,1	85 $\pm$ 10,4			89 $\pm$ 2,8	86 $\pm$ 1,0
	7,5					86 $\pm$ 3,4	87 $\pm$ 1,1
	10	90 $\pm$ 2,7	88 $\pm$ 4,8	83 $\pm$ 2,1	85 $\pm$ 4,3		
	20	87 $\pm$ 1,6	87 $\pm$ 3,2	87 $\pm$ 2,4	87 $\pm$ 2,5		
	25			86 $\pm$ 1,9	88 $\pm$ 2,2		
<b>9-cis-RA</b>	1					83 $\pm$ 7,1	82 $\pm$ 6,1
	2,5					84 $\pm$ 0,6	86 $\pm$ 4,5
	5	87 $\pm$ 9,8	85 $\pm$ 10,4			83 $\pm$ 6,8	86 $\pm$ 1,0
	7,5					84 $\pm$ 4,5	87 $\pm$ 1,1
	10	92 $\pm$ 2,3	88 $\pm$ 4,8	83 $\pm$ 3,0	85 $\pm$ 4,3		
	20	87 $\pm$ 2,8	87 $\pm$ 3,2	84 $\pm$ 1,4	87 $\pm$ 2,5		
	25			87 $\pm$ 2,6	88 $\pm$ 2,2		
<b>all-trans-RA</b>	1					88 $\pm$ 4,6	82 $\pm$ 6,1
	2,5					91 $\pm$ 0,4	86 $\pm$ 4,5
	5	86 $\pm$ 7,7	85 $\pm$ 10,4			92 $\pm$ 4,3	86 $\pm$ 1,0
	7,5					88 $\pm$ 1,2	87 $\pm$ 1,1
	10	92 $\pm$ 3,1	88 $\pm$ 4,8	87 $\pm$ 2,1	85 $\pm$ 4,3		
	20	91 $\pm$ 3,4	87 $\pm$ 3,2	89 $\pm$ 2,7	87 $\pm$ 2,5		
	25			93 $\pm$ 4,6	88 $\pm$ 2,2		

<sup>§</sup> entsprechend Abschnitt E-29, Gruppe: 0  $\mu$ g/kg, Tag 28

<sup>§§</sup> entsprechend Abschnitt E-27, Gruppe: 15.000 IE/kg

\* statistisch signifikant unterschiedlich vom internen Standard ( $t$ -Test,  $p < 0,05$ )

**Tab. 3-15.** Validierungsergebnisse: Wiederfindung der unpolaren Retinoide ( $n = 3$ ).

Retinoid	Konz. [ng/mL]	% Wiederfindungsrate in BSA (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	
		Retinoid	Retinylnonanoat (IS) [500 ng/mL]
<b>all-trans-Retinol</b>	10	97 $\pm$ 0,9	93 $\pm$ 4,8
	100	91 $\pm$ 3,3	94 $\pm$ 4,3
	500	93 $\pm$ 2,0	88 $\pm$ 5,2
	1000	93 $\pm$ 6,3	92 $\pm$ 2,6
<b>all-trans-Retinal</b>	10	96 $\pm$ 4,0	93 $\pm$ 4,8
	100	97 $\pm$ 3,3	94 $\pm$ 4,3
	500	93 $\pm$ 3,3	88 $\pm$ 5,2
	1000	92 $\pm$ 2,5	92 $\pm$ 2,6
<b>all-trans-Retinylpalmitat</b>	10	95 $\pm$ 3,3	93 $\pm$ 4,8
	100	93 $\pm$ 3,0	94 $\pm$ 4,3
	500	92 $\pm$ 1,6	88 $\pm$ 5,2
	1000	96 $\pm$ 7,3	92 $\pm$ 2,6

Besonders wichtig dabei ist, daß gemäß *t-Test* ( $P = 95\%$ ) zwischen Analyt und internem Standard im allgemeinen jeweils kein signifikanter Unterschied bezüglich der Wiederfindungsrate nachweisbar ist. Nur bei 3,4-dd-Retinsäure, die in realen Proben nicht detektiert werden konnte, kann verglichen mit dem internen Standard in zwei Fällen eine signifikant niedrigere Wiederfindung festgestellt werden.

### 3.7.6 Robustheit und Selektivität

Robustheit bezeichnet die Fähigkeit einer Analysenmethode, ein Ergebnis zu liefern, das durch eventuell variierende Bedingungen nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird (208,212). Vor allem vor dem Hintergrund der angestrebten Routine-Tauglichkeit erscheint zur raschen Beurteilung von Schwachstellen eine genauere Untersuchung der Robustheit zweckmäßig (198,213,214). Bereits in den Abschnitten 3.3 bis 3.6 wurde auf variationskritische Parameter der Methodik eingegangen. Diese umfassen bestimmte Aspekte der Probenvorbereitung (Verunreinigungen der Reagenzien und der Glasgeräte), die allgemeine Analyten- bzw. Proben-Stabilität sowie gewisse Aspekte der chromatographischen Bestimmung. Diese Parameter müssen sorgfältig kontrolliert und eingehalten werden, damit die Methodik überhaupt angewandt werden kann.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungsergebnisse beschreiben den Einfluß kleinerer (zufälliger) Abweichungen von den optimalen Betriebsbedingungen auf die Ergebnisse. Zu ihrer Ermittlung wurden ausgehend von den optimalen Bedingungen

bestimmte als kritisch angesehene Parameter der Probenvorbereitung und der HPLC-Messungen gezielt variiert.

Im Bereich der Probenvorbereitung erscheinen sowohl die Dauer der Flüssig-Extraktion als auch die Elution der polaren Retinoide in der Festphasenextraktion variationskritisch. **Tab. 3-16.** zeigt den Einfluß variierender Elutionsbedingungen in der Festphasenextraktion auf die Wiederfindung in der Fraktion der polaren Retinoide bei der Messung einer Leber-Probe. Da der interne Standard trotz der Variationen weiterhin seinen Kontrollzweck erfüllt, sind die mit der HPLC bestimmten Konzentrationen der endogenen *all-trans*-Retinsäure nahezu unabhängig von den untersuchten Elutionsbedingungen. Ein verminderter Eisessig-Anteil von 2 % statt 3 % führt zu deutlich niedrigeren Wiederfindungsraten und damit zu einer reduzierten Nachweis-Empfindlichkeit der Methodik.

**Tab. 3-16.** Validierungsergebnisse Robustheit: Elution der polaren Retinoide in der Festphasenextraktion.

Elutionsbedingungen für „polare Retinoide“	Wiederfindung*§	
	IS RO101670	<i>all-trans</i> -RA
3 mL CHCl <sub>3</sub> /2-Propanol (2:1) mit 4 % Eisessig (v/v)	+ 0,5 %	+ 0,6 %
3 mL CHCl <sub>3</sub> /2-Propanol (2:1) mit 2 % Eisessig (v/v)	-19,0 %	-20,8 %
3 mL CHCl <sub>3</sub> /2-Propanol (1,5:1) mit 3 % Eisessig (v/v)	+0,9 %	-0,5 %
2,5 mL CHCl <sub>3</sub> /2-Propanol (2:1) mit 3 % Eisessig (v/v)	-2,5 %	-1,9 %
3,5 mL CHCl <sub>3</sub> /2-Propanol (2:1) mit 3 % Eisessig (v/v)	-1,3 %	-1,2 %

\* im Vergleich zu den optimalen Bedingungen: 3 mL CHCl<sub>3</sub>/2-Propanol (2:1), 3 % Eisessig (v/v)

§ angegeben sind Mittelwerte ( $n = 2$ ), Bestimmung in Leberhomogenat (Abschnitt E-29, Gruppe 10 µg/kg, Tag 28)

Bei der Flüssig-Extraktion einer Leber-Probe konnten bei einer Verlängerung der Extraktionszeiten von 5 auf 10 bzw. 20 Minuten sowohl für die polaren als auch für die unpolaren Retinoide keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Überprüfung der Robustheit in der HPLC erfolgte für beide Systeme durch Variation relevanter chromatographischer Parameter anhand von Standard-Lösungen (208). Der Einfluß der variierten Parameter auf die chromatographischen Größen Peakhöhe, Peakfläche und Retentionszeit und schließlich auf die Konzentration ist in **Tab. 3-17.** und **Tab. 3-18.** dargestellt. Die HPLC-Methode zur Messung der polaren Retinoide ist hinsichtlich der Peakhöhe, der Peakfläche und der Konzentration robust. Die Variationen liegen hier in der Regel deutlich unter 10 %. Die Retentionszeiten einzelner Analyten werden zum Teil beträchtlich durch eine Variation des pH-Wertes oder des Methanol-Anteils in Eluent A beeinflusst. Die Trennfähigkeit hinsichtlich benachbarter Analyten wird dabei kaum beeinflusst.

**Tab. 3-17.** Validierungsergebnisse: Robustheit des HPLC-Systems zur Messung der polaren Retinoide.<sup>§</sup>

	Veränderung in [%]																
	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	13- <i>cis</i> -4-OH-RA	IS-RO 101670	3,4-dd-RA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -RA	all- <i>trans</i> -4-oxo-RA	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	13- <i>cis</i> -4-OH-RA	IS-RO 101670	3,4-dd-RA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA	all- <i>trans</i> -RA	
<b>Einfluß auf die Peakhöhe</b>																	
Wellenlänge (+/- 2 nm)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Temperatur (+/- 5 °C)	5,0	-3,1	5,2	-3,4	2,1	1,0	5,6	0,9	9,2	-2,8	4,5	0,8	3,1	3,9	3,0	0,3	
Flußrate (+/- 5 %)	-1,3	4,5	-2,9	5,0	-2,9	1,1	4,1	2,2	3,6	1,9	3,2	1,4	4,7	1,5	4,4	0,5	
Eluent A (+/- 5 % MeOH)	-1,9	4,0	-1,5	3,7	-2,5	2,4	-2,4	5,1	-4,0	4,6	-2,8	4,3	-3,3	3,1	-4,1	3,7	
Eluent A (+/- 10 mM Puffer)	11,4	-1,8	9,9	0,4	3,9	3,7	-4,5	7,4	-5,3	7,9	-5,2	7,5	-5,3	6,3	-6,4	6,9	
pH (+/- 0,5)	1,1	-1,3	1,2	0,6	0,2	-1,2	-0,3	-0,1	0,0	-2,3	-0,2	-0,4	-0,8	-1,2	0,0	0,2	
	2,7	-0,7	3,0	2,2	1,3	-2,6	-2,4	1,1	-4,5	1,0	-3,6	0,6	-4,2	3,8	-2,9	2,6	
<b>Einfluß auf die Peakfläche</b>																	
Wellenlänge (+/- 2 nm)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Temperatur (+/- 5 °C)	7,1	-1,0	8,5	-3,1	2,3	4,6	3,0	1,2	4,1	-4,4	3,0	2,3	3,2	3,6	2,7	0,4	
Flußrate (+/- 5 %)	6,9	3,9	-0,4	4,2	3,8	-2,0	5,3	2,9	3,1	1,3	3,6	0,5	5,1	0,2	5,6	0,2	
Eluent A (+/- 5 % MeOH)	-4,4	4,7	-5,1	1,9	-5,3	1,5	-4,3	4,4	-4,1	4,8	-1,8	4,6	-4,9	2,1	-4,9	5,3	
Eluent A (+/- 10 mM Puffer)	-1,6	4,1	-3,3	-0,1	-2,3	0,6	-0,6	-0,3	-0,1	1,5	-0,1	-0,4	-0,7	-1,5	-0,9	-0,8	
pH (+/- 0,5)	3,9	2,5	-0,3	-0,2	4,1	3,5	0,0	0,9	-0,6	-4,0	0,5	0,5	0,9	-1,0	1,4	0,2	
	-1,8	-0,8	-1,6	7,3	-6,6	-9,3	-0,5	-3,7	-5,0	-3,1	-5,4	-4,1	-5,6	-3,5	-2,9	-3,9	
<b>Einfluß auf die Retentionszeit</b>																	
Temperatur (+/- 5 °C)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Flußrate (+/- 5 %)	-6,9	6,5	-6,5	6,1	-6,4	6,2	-4,3	4,6	-3,4	3,8	-3,0	3,4	-2,9	3,4	-2,8	3,3	
Eluent A (+/- 5 % MeOH)	-4,6	4,4	-4,5	4,3	-4,1	4,0	-2,7	3,0	-2,4	2,8	-2,2	2,7	-2,2	2,6	-2,1	2,6	
Eluent A (+/- 10 mM Puffer)	-20,4	24,7	-21,0	24,4	-20,8	22,5	-13,9	12,5	-12,6	11,0	-11,7	10,2	-11,2	9,6	-10,7	9,1	
pH (+/- 0,5)	-0,4	-1,5	-0,2	-1,7	-0,6	-1,5	-0,5	-0,8	-0,5	-0,7	-0,4	-0,6	-0,4	-0,6	-0,4	-0,5	
	-6,9	15,4	-6,4	13,6	-6,5	12,4	-4,4	8,4	-3,8	7,2	-3,3	6,3	-3,4	6,4	-3,1	5,9	
<b>Einfluß auf die Konzentration</b>																	
Wellenlänge (+/- 2 nm)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Temperatur (+/- 5 °C)	3,7	-2,1	5,0	-4,3	-0,7	3,0	+	-	0,8	5,5	-0,3	1,1	0,3	2,3	-0,3	-0,7	
Flußrate (+/- 5 %)	1,3	1,0	-5,4	1,1	-1,3	-4,6	+	-	-2,0	-1,6	-1,6	-2,2	0,0	-2,6	0,2	-2,5	
Eluent A (+/- 5 % MeOH)	0,2	0,2	-0,7	-2,5	-0,9	-2,7	+	-	0,2	-1,5	2,9	0,2	-0,5	-2,1	0,7	0,7	
Eluent A (+/- 10 mM Puffer)	-0,8	4,2	-2,8	0,4	-1,6	0,8	+	-	0,5	1,8	0,5	0,0	0,0	-1,1	-0,3	-0,5	
pH (+/- 0,5)	3,7	1,6	-0,4	-1,2	3,9	2,3	+	-	-0,5	-4,7	0,5	-0,5	1,1	-1,9	1,3	0,3	
	-1,2	3,1	-1,1	2,6	-5,8	-5,6	+	-	-4,4	0,7	-4,8	-0,2	-5,2	0,5	-2,5	-0,2	

<sup>§</sup> angegeben sind die prozentualen Veränderungen im Vergleich zu den optimalen Bedingungen gemäß Abschnitt E-14 ( $n = 1$ )

**Tab. 3-18.** Validierungsergebnisse: Robustheit des HPLC-Systems zur Messung der unpolaren Retinoide.<sup>§</sup>

	Veränderung in [%]												
	Retinol	Retinal	Nonanoat	Laurat	Linolenat	Linoleat	Myristat	Oleat	Palmitat	Stearat	Arachidinat		
<b>Einfluß auf die Peakhöhe</b>													
Temperatur (10 °C/ 24 °C)	+ 3,2	- 8,2	+ 2,7	- 8,6	+ 0,7	- 8,5	+ 4,5	- 3,1	+ 7,1	- 7,6	+ 5,1		
Wellenlänge (+/- 2nm)	1,6	2,5	1,9	-0,5	-0,2	-3,2	-0,1	3,2	5,4	2,2	2,0		
Fluß (+/- 0,1 mL/min)	-0,8	4,2	-6,4	5,2	-8,0	4,0	-6,5	-5,8	-3,1	10,0	-4,6		
Eluent A (+/- 5 % Methanol)	1,5	1,1	-2,1	1,7	1,4	-0,7	0,0	0,0	2,2	3,3	0,2		
Eluent B (+/- 5 % CHCl <sub>3</sub> )	0,3	0,5	-8,6	-2,4	-7,4	-0,8	-8,1	-6,7	-5,8	-1,1	13,9		
<b>Einfluß auf die Peakfläche</b>													
Temperatur (10 °C/ 24 °C)	+ 1,2	- 0,7	+ 1,3	- 1,6	+ 3,4	- 5,0	+ 0,3	- 6,7	+ 1,2	- 4,6	+ 2,3		
Wellenlänge (+/- 2 nm)	-1,1	0,2	-0,3	-2,3	-4,3	-7,1	-1,3	-6,0	1,8	-0,9	2,3		
Fluß (+/- 0,1 mL/min)	-4,7	6,4	-7,0	6,9	-12,0	0,3	-4,4	-6,0	-6,3	8,5	0,1		
Eluent A (+/- 5 % Methanol)	-0,4	0,8	-2,1	-1,6	-5,9	-5,6	0,3	-12,5	-1,4	-1,2	8,3		
Eluent B (+/- 5 % CHCl <sub>3</sub> )	-1,4	-1,7	-2,1	-3,3	-5,8	-6,7	-2,6	-6,6	-0,1	0,4	1,0		
<b>Einfluß auf die Retentionszeit</b>													
Temperatur (10 °C/ 24 °C)	+ 2,2	- 8,7	- 2,7	- 12,6	+ 2,2	- 10,2	+ 3,0	- 3,1	+ 3,2	- 12,2	+ 3,7		
Wellenlänge (+/- 2 nm)	-1,4	-1,4	-0,8	-0,8	-0,6	-0,8	-1,0	-1,3	-1,5	-1,5	-1,6		
Fluß (+/- 0,1 mL/min)	-6,4	6,2	-4,7	4,3	-3,2	3,3	-3,4	-3,4	1,8	-3,4	-3,5		
Eluent A (+/- 5 % Methanol)	-2,1	1,3	-1,4	1,2	-0,5	0,7	-1,4	-1,6	-1,9	-0,1	-2,0		
Eluent B (+/- 5 % CHCl <sub>3</sub> )	-0,5	-0,5	1,1	0,6	2,9	0,7	3,4	3,6	3,6	-0,6	-1,4		
<b>Einfluß auf die Konzentration</b>													
Temperatur (10 °C/ 24 °C)	+ 0,7	- 2,2	+ 2,7	- 12,6	+ 2,2	- 10,2	+ 3,0	- 3,1	+ 3,2	- 12,2	+ 3,7		
Wellenlänge (+/- 2 nm)	-0,8	2,6	-1,6	-2,5	-3,9	-4,9	-1,0	-5,7	2,1	1,4	4,1		
Fluß (+/- 0,1 mL/min)	2,4	3,6	4,9	3,2	-5,4	-2,3	2,8	-5,9	0,8	5,6	7,7		
Eluent A (+/- 5 % Methanol)	1,7	2,5	-1,9	-2,4	-3,9	-4,0	2,4	-4,6	0,6	0,5	2,6		
Eluent B (+/- 5 % CHCl <sub>3</sub> )	0,7	1,7	1,45	-0,4	-3,7	-3,5	-3,1	-2,8	-2,7	3,8	-1,9		

<sup>§</sup> angegeben sind die prozentualen Veränderungen im Vergleich zu den optimalen Bedingungen gemäß Abschnitt E-12 (n = 1)

Bei der HPLC-Methode zur Messung der unpolaren Retinoide -obwohl ansonsten relativ robust- ist die Temperatur eine variationskritische Einflußgröße. Höhere Temperaturen führen zu einer Verschlechterung der Trennfähigkeit des Systems bezüglich der kritischen Paare Oleat/Palmitat und Linoleat/Myristat. Bei Raumtemperatur (24 °C) eluieren Linoleat und Myristat sogar als ein einzelner Peak. Das Paar Laurat/Linolenat ist dagegen bei höheren Temperaturen deutlich besser aufgetrennt.

Da bei Gradiententrennungen das Verweilvolumen eine zentrale Einflußgröße darstellt (vgl. Abschnitt 3.6.3), wurde dieses für beide HPLC-Systeme experimentell bestimmt (Abschnitt E-15). Im System für die polaren Retinoide beträgt es ca. 625 µL, im System für die unpolaren Retinoide ca. 1690 µL.

Die Robustheit der Methode wird weiterhin durch ihre erfolgreiche Anwendung bei der Messung mehrerer Hundert Proben verschiedenster Gewebe (Plasma/Serum, Leber, Niere, Gehirn, Hoden, embryonales Gewebe) unterschiedlicher Spezies (Ratte, Maus, Mensch) unterstrichen, von denen ein Teil in Abschnitt 5 beschrieben ist.

Die Selektivität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, verschiedene Analyten ohne gegenseitige Störung nebeneinander und ohne Störung durch Matrixkomponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren (208). Die Überprüfung der Selektivität für unbekannte Proben in Kombination mit geringen Analytmengen und komplexer Matrix ist schwierig. Es ist diffizil, sicherzustellen, ob die Peaks innerhalb eines Chromatogramms sauber sind oder aus mehr als einem Peak bestehen. Moderne Photodiodenarray-Detektoren oder massenspektrometrische Detektoren registrieren über das gesamte Chromatogramm hinweg die Spektren der eluierenden Komponenten, wodurch über einen Spektrenvergleich entlang eines Peaks eine Reinheitsüberprüfung relativ einfach ist. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Mehrwellenlängen-Detektoren ermöglichen die Detektion quasi-simultan auf zwei Wellenlängen. Bei Kenntnis der Absorptionsspektren der Retinoide läßt sich die Peakreinheit im Zweifelsfall durch Berechnung der Flächenverhältnisse bei zwei Wellenlängen zumindest abschätzen. **Tab. 3-19.** gibt einen Überblick über die charakteristischen Flächenverhältnisse verschiedener Retinoide bei den ausgewählten Wellenlängen.

Die Absorption der Retinoide im Wellenlängenbereich von 310 bis 370 nm ist relativ selektiv, da nur wenige andere Verbindungen in diesem Bereich eine derartig hohe Lichtabsorption zeigen. Andere Verbindungen stören daher häufig erst bei vergleichsweise sehr hohen Konzentrationen die Detektion. Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen der unpolaren Retinoide in den realen Proben ist die UV-Detektion in diesem Bereich daher sehr selektiv.

Die Detektion der polaren Retinoide kann dagegen wegen der geringen Konzentrationen durch wesentlich höher konzentrierte Matrixkomponenten gestört sein. Zur Überprüfung der Selektivität im Bereich der polaren Retinoide wurden daher im Rahmen der Untersuchungen zur Robustheit auch reale Proben den variierenden chromatographischen Parametern ausgesetzt. Untersucht wurden dabei eine Serum-Probe (Ratte) und ein Leberhomogenat (Maus). Die Selektivität der Methodik erwies sich bezüglich der in den Proben endogen auftretenden Retinoide unter den optimalen Bedingungen als hinreichend. Die Untersuchungen ergaben, daß sowohl bei *all-trans*-Retinsäure als auch bei dem internen Standard durch eine Veränderung des pH-Wertes von pH 5,7 auf pH 5,2 bzw. 6,2 Peak-Überlagerungen durch Matrixkomponenten auftreten. Auch eine niedrigere Trenntemperatur (55 °C statt 60 °C) ist in diesem Zusammenhang problematisch. Die anderen getesteten chromatographischen Parameter stellten sich als wenig variationskritisch heraus.

**Tab. 3-19.** Charakteristische Flächenverhältnisse verschiedener Retinoide bei UV-Detektion auf zwei Wellenlängen

Retinoid	Flächenverhältnis
	340 nm/356 nm
<i>all-trans</i> -4-oxo-Retinsäure	0,84
13- <i>cis</i> -4-oxo-Retinsäure	0,84
<i>all-trans</i> -4-OH-Retinsäure	1,29
13- <i>cis</i> -4-OH-Retinsäure	1,26
5,6-epoxy-Retinsäure	2,65
<i>all-trans</i> -3,4-dd-Retinsäure	0,80
13- <i>cis</i> -Retinsäure	1,16
<i>all-trans</i> -Retinsäure	1,20
9- <i>cis</i> -Retinsäure	1,39
9,13-di- <i>cis</i> -Retinsäure	1,19
<i>all-trans</i> -Acitretin	1,09
	325 nm/340 nm
<i>all-trans</i> -Retinol	1,32
<i>all-trans</i> -Retinal	0,70
Retinylester	1,10

### 3.7.7 Stabilität der Retinoide während der Analyse

Aufgrund der Labilität der Retinoide kann eine Artefakt-Bildung während der Analyse niemals vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurde untersucht, inwieweit die Methodik zu einer Isomerisierung einzelner Retinoide beiträgt.

Eine Überprüfung mit Standards der Retinsäure-Isomere ohne Matrix, die alle Schritte der Methodik durchlaufen, zeigte, daß die Isomerisierung in diesem Falle vernachlässigbar ist



(Tab. 3-20.). Bei Anwesenheit einer biologischen Matrix ist die Isomerisierung eines aufgestockten Retinoids dagegen katalysiert. Die Evaluierung der Isomerisierung während der Aufarbeitung ist wegen ihrer Matrixabhängigkeit bei gleichzeitig geringen Probenmengen schwierig. Die Situation ist zudem dadurch kompliziert, daß die Isomerisierung von den Konzentrationsverhältnissen der einzelnen Isomere untereinander abhängt (215,216). In der Literatur wurde darauf hingewiesen, daß eine geringe Isomerisierung des zugesetzten Retinoids schon im Moment der Aufstockung der Probe erfolgen kann, so daß aufgestockte Retinoide nicht unbedingt für endogene Retinoide, die durch ihre Bindungsverhältnisse stabilisiert sind, repräsentativ sind (158).

**Tab. 3-20.** Isomerisierungen aufgestockter Retinoide während der Aufarbeitung ( $n = 3$ ).

<b>ohne Matrix – 10 ng/mL Standard</b>	
<i>all-trans</i> -Retinsäure	0,3 % ± 0,2 % → 13- <i>cis</i> -Retinsäure
9- <i>cis</i> -Retinsäure	1,1 % ± 0,3 % → 13- <i>cis</i> -Retinsäure
	0,4 % ± 0,2 % → <i>all-trans</i> -Retinsäure
13- <i>cis</i> -Retinsäure	0,9 % ± 0,3 % → <i>all-trans</i> -Retinsäure
<b>Serum (Ratte)<sup>§</sup> – angereichert mit 5 ng/mL</b>	
<i>all-trans</i> -Retinsäure	2,3 % ± 0,6 % → 9- <i>cis</i> -Retinsäure
	1,3 % ± 0,4 % → 13- <i>cis</i> -Retinsäure
9- <i>cis</i> -Retinsäure	3,3 % ± 0,3 % → <i>all-trans</i> -Retinsäure
13- <i>cis</i> -Retinsäure	1,6 % ± 0,2 % → 9- <i>cis</i> -Retinsäure
	6,8 % ± 0,6 % → <i>all-trans</i> -Retinsäure
<b>Leber (human)<sup>§§</sup> – angereichert mit 50 ng/mL</b>	
<i>all-trans</i> -Retinsäure	4,1 % ± 0,3 % → 13- <i>cis</i> -Retinsäure
	1,2 % ± 0,4 % → 9- <i>cis</i> -Retinsäure

<sup>§</sup> entsprechend Abschnitt E-29

<sup>§§</sup> entsprechend Abschnitt E-28

In biologischen Proben tritt Retinsäure überwiegend in ihrer *all-trans*-Form auf. Es stellt sich damit häufig die Frage, ob eventuell detektierte *cis*-Formen wirklich endogener Natur sind oder ob sie aus Isomerisierungen während der Aufarbeitung resultieren. Aufgrund der oben diskutierten Gegebenheiten kann diese Frage nur subjektiv vor dem Hintergrund der in Tab. 3-20. dargestellten Ergebnisse abgeschätzt werden. Den Ergebnissen entsprechend isomerisieren allenfalls 5 % der *all-trans*-Form zu *cis*-Isomeren, so daß über diese Rate hinausgehende *cis*-Konzentrationen endogenen Ursprungs sein dürften.

Die Proben zur Untersuchung der Wiederfindung, der Robustheit und der Selektivität wurden jeweils in einem Arbeitsgang aufgearbeitet und dann bis zu ihrer Messung bis zu 36 Stunden im Dunkeln im gekühlten Autosampler gelagert. Während dieser Zeit konnten sowohl bei

matrixfreien Standards als auch bei biologischen Proben keinerlei Veränderungen festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt publizierte Beobachtungen (154). Auch im Rahmen der Anwendung dieser Methodik auf biologische Proben in der Routine (vgl. Abschnitt 5) gab es keinerlei Anhaltspunkte für eine Instabilität der Probenlösungen bei der Aufbewahrung im Autosampler. Die Werte der gefundenen Flächeneinheiten der internen Standards zeigten unabhängig vom Zeitpunkt der Messung (innerhalb von 36 Stunden) eine hohe Konstanz.

### 3.7.8 Nachweisvermögen

Wichtige Größen zur Beurteilung eines Analysenverfahrens sind die Nachweis-, die Erfassungs- und die Bestimmungsgrenze (NWG, EG und BG). Die Berechnung dieser Kenngrößen aus der Verfahrensstandardabweichung (siehe Abschnitt 3.7.2) entsprechend den Schnellschätzungen nach DIN 32 645 über die Kalibriergeradenmethode ergibt die in **Tab. 3-21.** angegebenen Werte (217). Die so ermittelten Nachweisgrenzen entsprechen dabei relativ gut denjenigen, die über eine Bestimmung des dreifachen Signal/Rausch-Verhältnisses im Chromatogramm ermittelt werden. Die in **Tab. 3-21.** angegebenen Nachweisgrenzen beziehen sich auf die Konzentrationen der in die HPLC injizierten Lösungen.

**Tab. 3-21.** Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der HPLC-Systeme gemäß Schnellschätzung nach DIN 32 645 (217).<sup>§</sup>

Retinoid	Nachweisgrenze [ng/mL]	Erfassungsgrenze [ng/mL]	Bestimmungsgrenze [ng/mL]
all- <i>trans</i> -4-oxo-Retinsäure	0,29	0,58	0,88
13- <i>cis</i> -4-oxo-Retinsäure	0,37	0,74	1,11
13- <i>cis</i> -4-OH-Retinsäure	0,34	0,68	1,02
3,4-dd-Retinsäure	0,37	0,74	1,11
13- <i>cis</i> -Retinsäure	0,19	0,37	0,56
9- <i>cis</i> -Retinsäure	0,35	0,70	1,05
all- <i>trans</i> -Retinsäure	0,23	0,45	0,68
all- <i>trans</i> -Retinol	1,96	3,92	5,89
all- <i>trans</i> -Retinal	4,59	9,19	13,78
all- <i>trans</i> -Retinylpalmitat	3,68	7,35	11,03

<sup>§</sup> berechnet auf der Basis eines Signifikanzniveaus von 95 % und  $n = 15$  ( $\phi_{15; 0,05} = 1,8$ ;  $k = 3$ ).

Bei einem Injektionsvolumen von 120  $\mu\text{L}$  entspricht eine Nachweisgrenze von 0,23 ng/mL für all-*trans*-Retinsäure einer absoluten Masse von knapp 30 pg (Massenempfindlichkeit). Unter Berücksichtigung der Wiederfindung (80 %) und der eingesetzten Probenmenge (400  $\mu\text{L}$  Plasma bzw. 200 mg Gewebe) ergibt sich für all-*trans*-Retinsäure eine Nachweisgrenze von etwa 0,14 ng/mL Plasma bzw. 0,28 ng/g Gewebe. Analoge Berechnungen sind für die übrigen Retinoide in **Tab. 3-22.** zusammengefaßt.

**Tab. 3-22.** Nachweisgrenzen der Retinoide in der entwickelten Methode.

Retinoid	Nachweisgrenze	
	[ng/mL Plasma]	[ng/g Gewebe]
all- <i>trans</i> -4-oxo-Retinsäure	0,18	0,36
13- <i>cis</i> -4-oxo-Retinsäure	0,23	0,46
13- <i>cis</i> -4-OH-Retinsäure	0,21	0,43
3,4- <i>dd</i> -Retinsäure	0,23	0,46
13- <i>cis</i> -Retinsäure	0,12	0,23
9- <i>cis</i> -Retinsäure	0,22	0,44
all- <i>trans</i> -Retinsäure	0,14	0,28
all- <i>trans</i> -Retinol	1,2	2,40
all- <i>trans</i> -Retinal	2,7	5,40
all- <i>trans</i> -Retinylpalmitat	2,2	4,40

Entsprechende Nachweisgrenzen lassen sich auch aus den Messungen realer Proben ableiten (vgl. Abschnitt 5). Eine Peakverbreiterung durch Matrixeffekte und eine damit einhergehende Erhöhung der Nachweisgrenze konnten nicht festgestellt werden.

Die zweifache bzw. dreifache Nachweisgrenze ergibt entsprechend die jeweilige Erfassungsgrenze bzw. Bestimmungsgrenze. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Signale größer oder gleich der Nachweisgrenze in die entsprechende Konzentration umgerechnet.

### 3.8 Ergänzungsmethoden

Wie bereits in Abschnitt 3.6.4 erwähnt, vermag die entwickelte Routine-Methodik nicht, die Glukuronide der Retinoide zu erfassen, noch 9,13-*di-cis*-Retinsäure von 13-*cis*-Retinsäure zu trennen. Für bestimmte Fragestellungen wurde daher auf Ergänzungsmethoden zurückgegriffen.

#### 3.8.1 Methode zur Bestimmung der Glukuronide

Zur Bestimmung der Glukuronide wurde eine indirekte Bestimmung nach *Sass et al.* (218) verwendet, die auf einer enzymatischen Hydrolyse der Glukuronide mit  $\beta$ -Glukuronidase beruht (Abschnitt E-16). Nach der enzymatischen Hydrolyse können die jeweiligen Retinoid-Glukuronide als ihr Aglykon mit der Routine-Methodik (Abschnitt 3.7) bestimmt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen nach Hydrolyse mit den Peakflächen einer Kontroll-Probe ohne Hydrolyse kann durch Differenzbildung auf die jeweiligen Gehalte der Glukuronide geschlossen werden. Aufgrund der indirekten Bestimmungsmethode können

aber vergleichsweise geringe Gehalte an Glukuronid neben hohen Gehalten des endogen auftretenden Aglykons in der natürlichen Streuung unerkennbar werden.

Zur Überprüfung des Assays wurden eine BSA-Lösung und ein Leberhomogenat mit *all-trans*-Retinoyl- $\beta$ -D-Glukuronid aufgestockt (vgl. Abschnitt E-16). In beiden Fällen war die Hydrolyse des aufgestockten Glukuronids quantitativ (ca. 100 %).

### 3.8.2 Methoden zur Trennung von 9,13-di-*cis*-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure

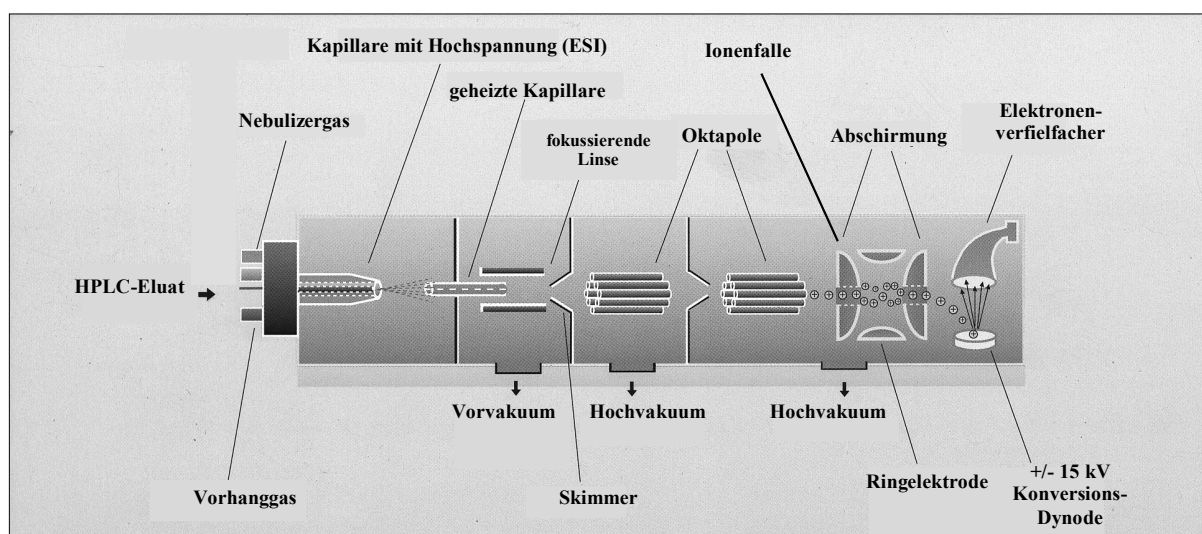
Wie bereits in Abschnitt 2.4.6 ausgeführt wurde, weisen die zur Verfügung stehenden Methoden zur Trennung von 9,13-di-*cis*- und 13-*cis*-Retinsäure relativ hohe Nachweisgrenzen auf. Um bei speziellen Fragestellungen diese beiden Isomere qualitativ bei ausreichendem Nachweisvermögen unterscheiden zu können, wurden in der Literatur beschriebene Methoden (151,156,157) modifiziert und auf 1-mm-Säulen übertragen (Abschnitt E-17). Aufgrund der mangelnden apparativen Robustheit waren diese Methoden allerdings nicht für einen großen Probendurchsatz in der Routine tauglich (Abschnitt 3.6.4). Zwei der modifizierten Methoden basieren auf einem mit Trifluoressigsäure angesäuerten Acetonitril/Wasser-Gradienten und einer stationären C18-Phase. In einer dritten Methode wird als stationäre Phase eine RP-Amid-C16-Phase (Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>, Supelcosil<sup>TM</sup> ABZ<sup>+</sup>Plus) verwendet. Diese Phase zeigt exzellente Trenneigenschaften für Retinsäure-Isomere (151,157). Die mobile Phase besteht aus Acetonitril, 1-Butanol, Methanol, wässriger Ammoniumacetatlösung und Eisessig.

In allen Methoden werden verhältnismäßig saure Eluenten verwendet, die im Rahmen der Probeninjektion eine optimale Fokussierung am Säulenkopf ermöglichen (vgl. Abschnitt 3.6.4). Auf diese Weise wird ein Injektionsvolumen von 120  $\mu$ L ermöglicht, das über einen Autosampler aufgegeben werden kann. Dabei kann trotz des Übergangs von einer 2,1-mm- auf eine 1-mm-Säule dieselbe Injektionstechnik wie in der Routine-Methode (Abschnitt E-14) verwendet werden. Die erhaltene Massenempfindlichkeit bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 beträgt in allen drei Methoden für die Retinsäuren ca. 10-15 pg. **Abb. 5-11.** in Abschnitt 5.3 zeigt mit diesen Methoden erhaltene Chromatogramme.

## 3.9 Übertragung der Methodik auf ein LC-DAD/MS<sup>n</sup>-System

### 3.9.1 Theoretische Grundlagen

Im Rahmen dieser Arbeit stand ein Ionenfallen-HPLC-MS-System (LCQ, Finnigan) zur Verfügung, das die Möglichkeit bietet, zwischen zwei Atmosphärendruck-*Interfaces*, nämlich einem *Electrospray-Interface* (ESI) und einem *Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization-Interface* (APCI), auszuwählen. Das System kann mit beiden Interfaces in einem positiven oder negativen Modus betrieben werden. **Abb. 3-13.** zeigt einen Schnitt durch das Massenspektrometer in der ESI-Konfiguration.



**Abb. 3-13.** Schnitt durch das LCQ-Massenspektrometer mit ESI-Interface und Ionenfalle (modifiziert nach (219))

Als Massenanalysator besitzt das LCQ-Massenspektrometer eine Ionenfalle. Die Ionenfalle besteht aus einer Dreielektrodenzelle in hyperbolischer Form. An die Ringelektrode wird eine variable Hochfrequenzspannung angelegt, während die Abschirmelektroden quasi potentialfrei sind (119). Nach der Ionisation werden die Ionen über eine Ionen-Optik (bestehend aus zwei Oktapolen und einer fokussierenden Inter-Oktapol-Linse) in die Ionenfalle überführt. Die Ionenfalle sammelt schrittweise Portionen des Ionenstroms, der kontinuierlich im Bereich des Interfaces erzeugt wird. Eine jede Portion repräsentiert einen Ausschnitt aller über eine gewisse Zeit (Injektionszeit) im Ionenstrom vorhandenen Ionen. Um einen für die Funktion der Ionenfalle optimalen Raumladungszustand zu erhalten, wird die Zahl der pro Schritt in die Ionenfalle eingeschleusten Ionen über einen schnellen Prescan erfaßt und über eine Torschaltung kontrolliert. In der Ionenfalle werden die Moleküle in stabile Umlaufbahnen überführt und schließlich zur Detektion durch Erhöhen der Umlaufamplitude -nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt- schrittweise über Öffnungen in einer

Abschirmelektrode ausgeschleust. Der jeweils austretende Ionenstrom wird detektiert. Die Geschwindigkeit mit der die Ionen aus der Falle gescannt werden, bestimmt die erhaltene Auflösung. Während des Massen-Scans werden keine Ionen in die Falle geleitet. Innerhalb der Ionenfalle helfen Helium-Gasatome über Stöße die Ionenbahnen zu stabilisieren und die Analytionen in der Ionenfalle zu halten. Entlang eines chromatographischen Peaks wird die Ionenfalle mehrmals zyklisch gefüllt und geleert. Die erhaltene Peakkurve verbindet die über die Injektionszeit „gemittelten“ Signale (119,220-224).

Aufgrund der sanften Ionisierungsmethode (ESI und APCI) sind die Spektren durch die protonierten (im positiven Modus) oder deprotonierten (im negativen Modus) Moleküle (Quasimolekülonen) geprägt. Die so erhaltenen Massenspektren sind damit relativ informationsarm. Über die Tandem-Massenspektrometrie oder  $MS^n$ -Experimente können aber Fragmentierungen herbeigeführt werden, die zusätzliche Strukturinformationen ermöglichen. Die auftretenden Fragmentierungsmechanismen unterscheiden sich aber signifikant von denen, die in der Elektronen-Ionisation auftreten, da hier Spezies mit einer geraden Elektronenzahl (gewöhnlich  $(M+H)^+$ ) fragmentiert werden, wohingegen in der Elektronen-Ionisation Radikal-Kationen ( $M^{\bullet+}$ ) fragmentiert werden. Da diese  $(M+H)^+$ -Fragmentierungsmechanismen bisher nicht ausführlich untersucht wurden, stehen keine Fragmentierungsregeln wie in der Elektronen-Ionisation zur Verfügung und eine Interpretation der Fragmentenspektren ist schwierig (225,226).

Bei der Tandem-Massenspektrometrie werden in der Ionenfalle über die gewählte Hochfrequenzspannung Primär-Molekülonen gezielt isoliert. Ionen mit anderen  $m/z$ -Verhältnissen werden nicht gespeichert. Über eine Resonanz-Anregungsfrequenz, die über die Abschirmelektroden eingestrahlt wird, wird das Primär-Molekülon in der Ionenfalle durch Stoßaktivierung mit dem Helium-Gas fragmentiert, wobei die gebildeten Produkt-Ionen keiner weiteren Fragmentierung unterliegen. Die gebildeten Produkt-Ionen werden schrittweise aus der Falle ausgeschleust und registriert ( $MS/MS$ -Spektren). Es besteht die Möglichkeit, daß nach der Fragmentierung ein Produkt-Ion in der Ionenfalle wiederum isoliert und dann weiter fragmentiert wird. Man erhält dann  $MS^3$ -Fragmentspektren (223,224). Bei der mehrstufigen Massenspektrometrie ( $MS^n$ ) werden diese Fragmentierungen nach jeweiliger Isolierung mehrfach ( $n$ ) vorgenommen.

Durch derartige  $MS^n$ -Experimente werden infolge der drastischen Verringerung des chemischen Rauschens insbesondere bei schwierigen Matrices niedrigere Nachweisgrenzen erhalten. Die Analysenergebnisse sind durch die Wahl des Primär-Molekülonen und der Auswertung des strukturspezifischen Produkt-Ionen-Spektrums selektiver und

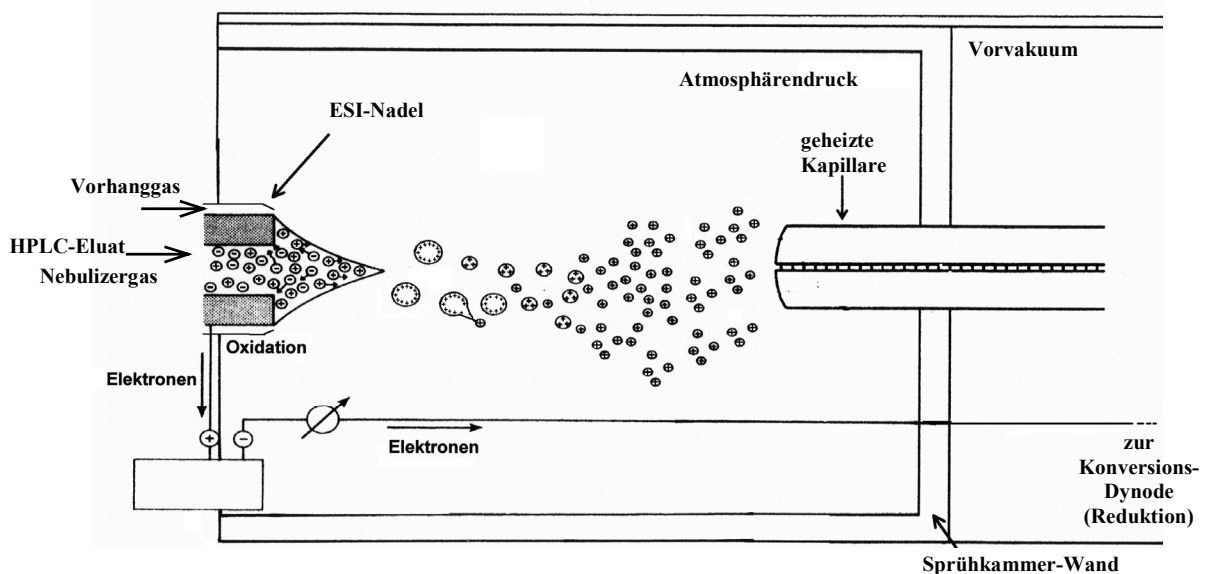
zuverlässiger (225). Durch die  $MS^n$ -Technik wird damit eine zusätzliche analytische Dimension ermöglicht, die mit der einstufigen MS nicht erreicht werden kann (227,228).

Im Massenanalysator selbst können Störungen praktisch nur durch Interferenzen von Ionen mit identischen  $m/z$ -Verhältnissen hervorgerufen werden. Wesentlich anfälliger für Störungen ist das wichtigste Element des LC/MS-Systems, das Interface (229).

### Electrospray-Interface (ESI)

Das HPLC-Eluat wird durch eine Kapillare, an die eine Hochspannung im unteren kV-Bereich angelegt ist, in das Interface eingeführt (**Abb. 3-14.**). Unterstützt durch Stickstoff als Nebulizer- und „Vorhanggas“ bilden sich am Ende der Kapillare kleine, hochgeladene Tröpfchen des Eluats, die im Gasstrom weitergetragen und desolvatisiert werden. Dabei steigt das Ladungs-Volumenverhältnis der Teilchen stark an, so daß durch „Coulomb-Explosionen“ eine weitere Verkleinerung der Tröpfchen stattfindet. Dieser gesamte Vorgang findet bei Atmosphärendruck statt. Die gebildeten Ionen werden durch eine geheizte Kapillare, die den Desolvatationsprozeß weiter unterstützt, ins Vakuum überführt.

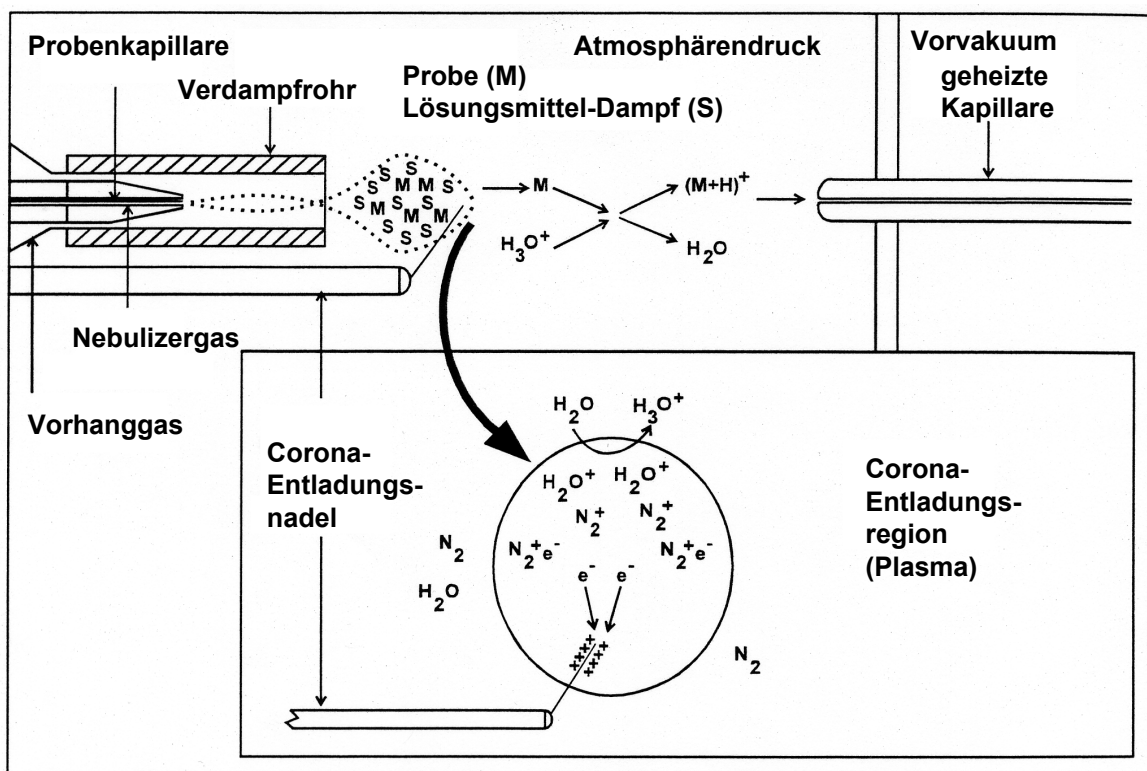
Das ESI-Verfahren eignet sich besonders für bereits ionische Substanzen oder für Substanzen, die leicht protoniert (bei Anlegen einer positiven Spannung an die Kapillare) oder deprotoniert (bei negativer Spannung) werden. Es ist für viele unpolare Substanzgruppen ungeeignet, da bei ihnen nahezu keine Ionisation beobachtet wird (119,230-234).



**Abb. 3-14.** Schematischer Aufbau des Electrospray-Interfaces (positiver Modus, modifiziert nach (224,235)).

### Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization-Interface (APCI)

Für die Untersuchung auch minder-polarer Verbindungen eignet sich das verwandte Verfahren der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck, dessen Aufbau in **Abb. 3-15** dargestellt ist. Das APCI-Verfahren wird auch als *heated-nebulizer*-Verfahren bezeichnet, da das HPLC-Eluat durch eine Kapillare in ein Verdampfrohr geführt und unter Zuhilfenahme von Stickstoff als Nebulizergas verdampft wird. Durch eine Corona-Entladung werden Lösungsmittelbestandteile protoniert (positive Spannung) oder deprotoniert (negative Spannung). Daraufhin folgt die eigentliche chemische Ionisation der Analytmoleküle (119,224,236).



**Abb. 3-15.** Schematischer Aufbau des APCI-Interfaces (positiver Modus, modifiziert nach (224)).

### 3.9.2 Anwendung zur Analytik von polaren Retinoiden

Vorversuche zeigten, daß bei beiden zur Verfügung stehenden Ionenquellen (ESI und APCI) der positive Modus die empfindlichere Variante bei der Detektion der Retinsäuren darstellt. Eine erfolgreiche Ionisation der Retinsäuren bei positiver Spannung wurde für ein ESI-Interface auch von *Gundersen et al.* (237) und für ein APCI-Interface von *Arnhold* (24) und *Tzimas et al.* (238,239) aufgezeigt. Eine Ionisation im positiven Modus erscheint vor dem Hintergrund einer im Sauren stattfindenden chromatographischen Trennung der Retinsäuren



sinnvoll, da eine Protonierung dann begünstigt ist (167,225,229). Massenspektrometer sind prinzipiell massenstromabhängige Detektoren, deren Response der Gesamtzahl der Moleküle, die pro Zeiteinheit detektiert werden, proportional ist. Damit kann der konzentrationsabhängige Empfindlichkeitsgewinn von *Microbore*-Säulen bei der UV-Detektion nicht notwendigerweise bei einer MS-Detektion umgesetzt werden. Die Steigerung der Analytkonzentration bei der Verwendung von *Microbore*-Säulen erfolgt auf Kosten einer reduzierten Flußrate, so daß die Zahl der pro Zeiteinheit aus den Trennsäulen unterschiedlicher Innendurchmesser austretenden Moleküle gleich bleibt. Bei Verwendung eines ESI-Interfaces ist die Detektion trotzdem quasi-konzentrationsabhängig und die Ionisation der Analyten steigt invers mit der Flußrate an. Gründe hierfür finden sich in dem Ionisationsmechanismus. Einmal wächst der Radius der primären Aerosol-Tröpfchen bei steigender Flußrate, gleichzeitig nimmt bei den primär gebildeten Tröpfchen das Verhältnis von Ladung zu Masse ab. Beide Effekte führen im Ionisationsmechanismus zu einer verringerten Effizienz der Ionisation (183,232).

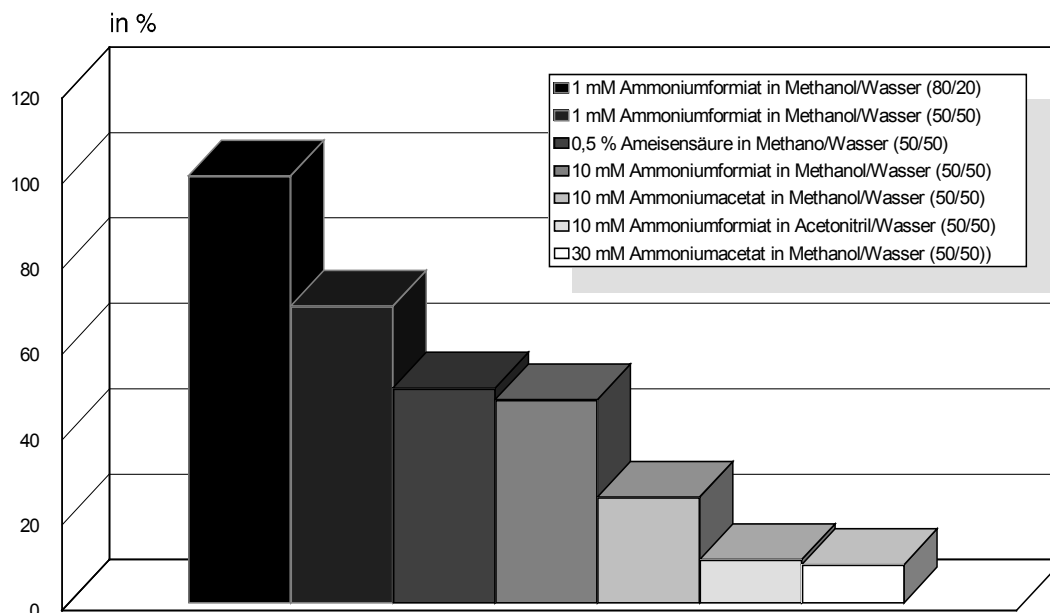
Vor dem Hintergrund der auf *Microbore*-Säulen abgestimmten HPLC-Methode erscheint zur Gewinnung einer maximalen Empfindlichkeit daher die Ionisation über ein ESI-Interface als guter Ansatzpunkt.

### **ESI-Interface**

Bei einer Electrospray-Ionisation hat die Eluenten-Zusammensetzung einen beträchtlichen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Methode (232,235,240).

Um den Effekt der Lösungsmittelzusammensetzung auf das ESI-MS-Signal von all-*trans*-Retinsäure im positiven Modus zu überprüfen, wurde ein Standard in mehreren Lösungsmitteln angesetzt (vgl. **Abb. 3-16.** und Abschnitt E-18). Die Standardlösungen wurden dann über eine Pumpe direkt, d.h. ohne HPLC-Kopplung, in das ESI-Interface überführt und die erhaltenen Signal-Intensitäten von  $m/z = 301$  ( $(M+H)^+$ ) abgelesen. Die verwendete Flußrate entsprach dabei derjenigen der Routine-Methodik mit der 2-mm-Säule.

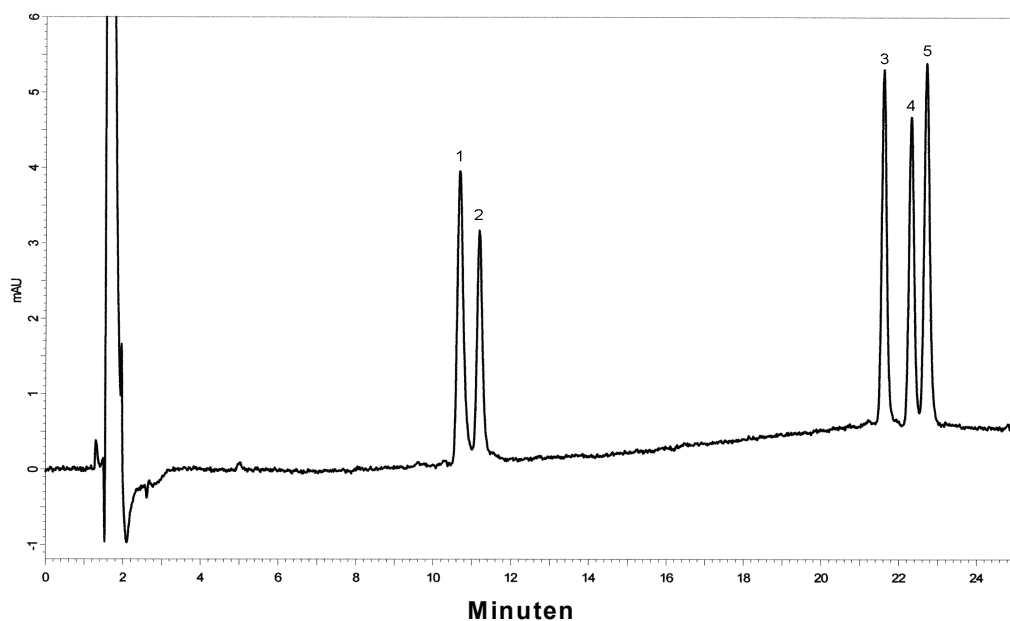
Die in **Abb. 3-16.** dargestellten Ergebnisse zeigen, daß als Puffer Ammoniumformiat besser geeignet ist als Ammoniumacetat. Dabei führen geringere Pufferkonzentrationen und ein höherer Methanol-Anteil zu größeren Signalen. Beim Vergleich Methanol und Acetonitril zeigt Methanol die besseren Ergebnisse.



**Abb. 3-16.** Abhängigkeit des MS-Signals (ESI, positiver Modus) von *all-trans*-Retinsäure von der Zusammensetzung des Eluenten (gemäß Abschnitt E-18). Die angegebenen Werte sind prozentual auf das größte erhaltene Signal (1 mM Ammoniumformiat in Methanol/Wasser (80/20)) bezogen.

Die gefundenen Einflüsse entsprechen jenen, die für andere Analyten bereits publiziert wurden (232,235,240,241). Eine sinkende Empfindlichkeit mit steigendem Wasser-Anteil in Methanol/Wasser-Gemischen wird auf eine erschwerte Tröpfchen-Verkleinerung durch das schwerer verdampfbare Wasser zurückgeführt (232,235). Die Bildung der Ladung des Tropfens erfolgt durch eine Trennung der positiven von den negativen Ionen im Ausgangsbereich der ESI-Nadel. Diese Ionen-Trennung ist bei geringeren Elektrolyt-Konzentrationen effizienter (235,240). Eine höhere Empfindlichkeit bei der Verwendung von Ammoniumformiat ( $pK_s = 3,77$ ) anstelle von Ammoniumacetat ( $pK_s = 4,76$ ) kann auf die unterschiedlichen  $pK_s$ -Werte zurückgeführt werden. Im positiven Modus ist bei Vorliegen mehrerer protonierbarer Moleküle prinzipiell die Protonierung der Moleküle mit der geringeren Acidität wahrscheinlicher (225,229). Damit ist die Konkurrenzsituation bei dem Ionisierungsprozeß der Retinsäure im Falle von Ammoniumformiat kleiner.

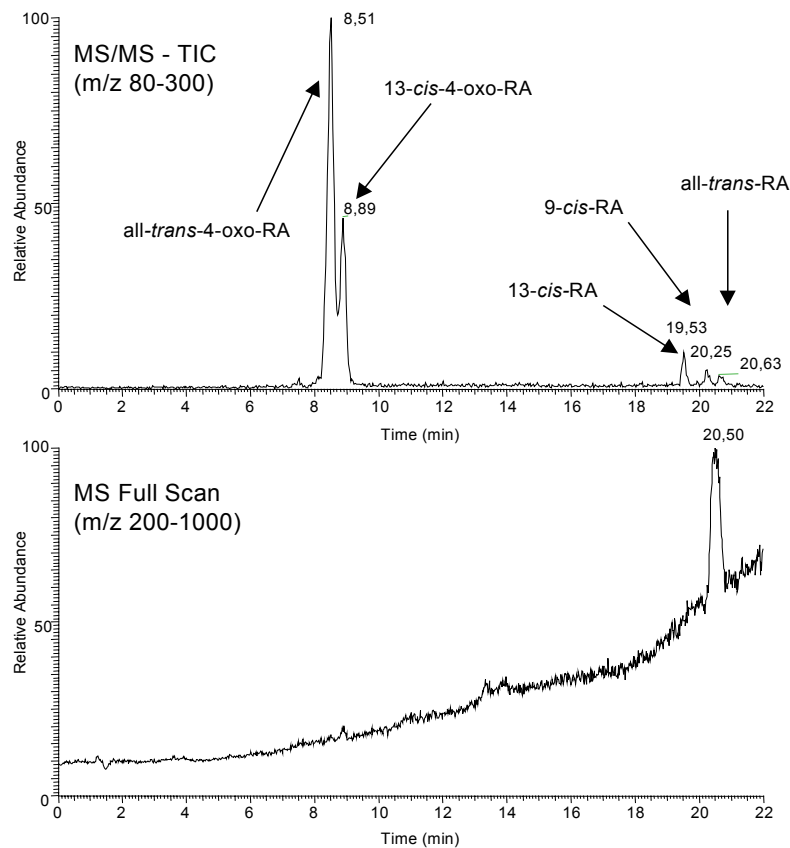
Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde das Puffersystem der HPLC-Methode für die polaren Retinoide von Ammoniumacetat (30 mM) auf Ammoniumformiat (5 mM) umgestellt (Abschnitt E-19). Pufferkonzentrationen unterhalb von 5 mM werden hinsichtlich der Methoden-Robustheit wegen der pH-Abhängigkeit der Trennung als kritisch angesehen (vgl. Abschnitt 3.7.6). Die Änderung des Puffers führte in der HPLC zu einer veränderten Selektivität. Insbesondere verschlechterte sich die Trennung des *9-cis*-/*all-trans*-Retinsäure-Paares stark. Erst durch eine Änderung der Flußrate und des Gradientenverlaufs konnte schließlich eine ausreichende Auflösung für diese beiden Peaks erhalten werden (**Abb. 3-17**).



**Abb. 3-17.** Chromatogramm eines Standards von polaren Retinoiden (10 ng/mL) nach der HPLC-Methode mit der für die ESI-MS-Detektion optimierten Eluentenzusammensetzung (UV-Detektion bei 340 nm, gemäß Abschnitt E-19; (1) *all-trans*-4-oxo-Retinsäure, (2) *13-cis*-4-oxo-Retinsäure, (3) *13-cis*-Retinsäure, (4) *9-cis*-Retinsäure und (5) *all-trans*-Retinsäure).

Im Anschluß wurde versucht, die so modifizierte HPLC-Methode mit der ESI-Tandem-Massenspektrometrie zu koppeln (Abschnitt E-20). **Abb. 3-18.** zeigt das Ergebnis. Auffällig ist die beträchtliche Signalunterdrückung im Bereich von *13-cis*-, *9-cis*- und *all-trans*-Retinsäure. Beim Vergleich mit der einfachen MS-Detektion im *Full-Scan-Modus* zeigt sich, daß diese Signalunterdrückung gut mit der ansteigenden Zahl von detektierten Massen im Verlauf des Gradienten korreliert.

Die genauere Auswertung der MS-Spur im *Full-Scan-Modus* ergab, daß die detektierten Massen wenigen dominierenden  $m/z$ -Werten zugeordnet werden können. Der dominierende  $m/z$ -Bereich läßt eine polymere Struktur vermuten und liegt zwischen  $m/z = 482,4$  und  $m/z = 966,4$  bei einer konstanten Differenz von  $m/z = 44$  ( $-\text{CO}_2$  ?). Zusätzliche dominante  $m/z$ -Verhältnisse liegen bei 279, 391 und 812.



**Abb. 3-18.** MS-Chromatogramme eines Standards (20 ng/mL) von polaren Retinoiden im MS/MS- (oben) und im *Full-Scan-Modus* (unten) (Messungen gemäß Abschnitt E-20).

Ein erhöhter Untergrund durch ungeeignete Materialien und Lösungsmittel ist in der Massenspektrometrie kein unbekannter Sachverhalt (225,229). Da normalerweise UV- oder Fluoreszenz-Detektion für die HPLC eingesetzt werden, ist die Reinheit der verwendeten Materialien auf diese Nachweismethoden optimiert worden. Eine geringe UV-Absorption eines Lösungsmittels ist jedoch nicht gleichbedeutend mit seiner Eignung für die Massenspektrometrie. HPLC-Lösungsmittel können so stark mit Siliconen, Weichmachern (insbesondere Phthalsäureester  $m/z = 279$  und  $391$ ) und anderen Additiven kontaminiert sein, daß die eigentlich mögliche Empfindlichkeit der MS-Detektion nicht umgesetzt werden kann. Auch das Bluten der Säulenmaterialien kann zu einer Signalunterdrückung beitragen (225). Die Signalunterdrückung ist ein Ergebnis von Komponenten, die die Ionisierung unterdrücken oder bei dem Ionisierungsprozeß in Konkurrenz mit dem eigentlichen Analyten stehen. Prinzipiell wird vorrangig das Molekül mit der geringsten Acidität protoniert wird, also der schwächste Protonendonator. Wenn neben dem Analyten gleichzeitig eine andere Verbindung eluiert, die ein schwächerer Protonendonator ist als der interessierende Analyt wird diese andere Verbindung bevorzugt protoniert und kann bei ausreichender Menge eine Protonierung

des Analyten bis zur Signallöschung unterdrücken (229). Im vorliegenden Fall scheinen sich derartige Verunreinigungen zunächst auf der Säule anzureichern, um dann im Verlauf des Gradienten mit steigendem Methanol-Anteil in massiver Form eluiert zu werden.

In biologischen Proben kann die natürliche Variation von endogenen Gehalten diverser Verbindungen von einer zur nächsten Probe zu einer jeweils unterschiedlichen Signalunterdrückung führen, was zwangsläufig eine korrekte Quantifizierung in der jeweiligen Probe unmöglich macht.

Da die Retinsäuren –wie gezeigt- gegenüber einer Signalunterdrückung insbesondere in dem zu verwendenden Gradientensystem sehr anfällig sind, wurden daher keine weiteren Versuche zur Optimierung der ESI-Ionisation unternommen und stattdessen die in dieser Hinsicht als robuster geltende APCI-Ionisation verwendet (225,229).

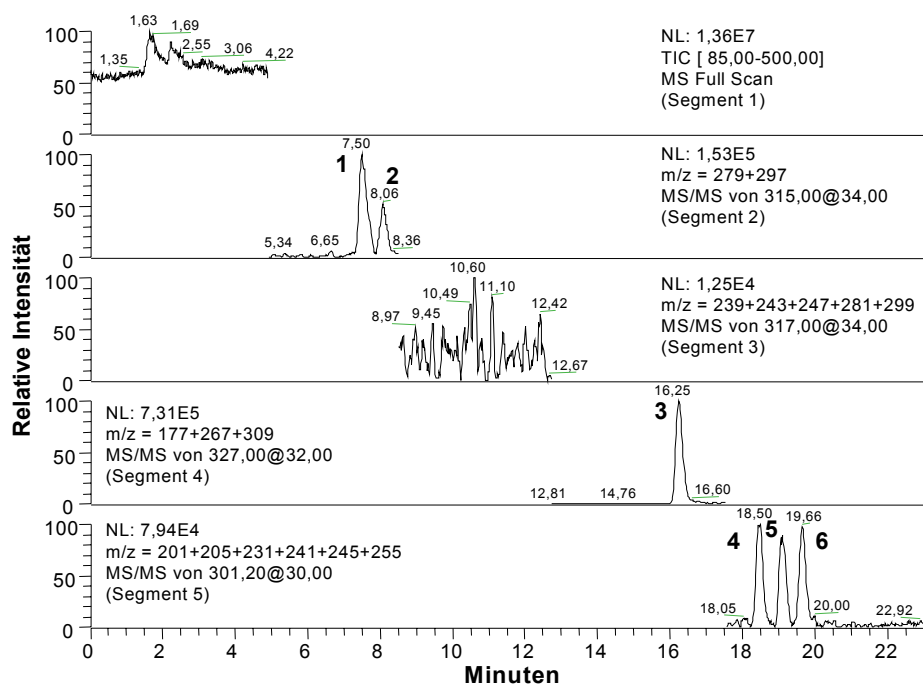
Die Ionisation mittels ESI ist im qualitativen Bereich (reine Strukturaufklärung) gut einsetzbar. Mittels einer in dem Massenspektrometer integrierten Spritzenpumpe können aufgereinigte Retinoide oder Standard-Substanzen bei einer kleinen Flußrate ohne chromatographische Trennung direkt in das Massenspektrometer eingespeist werden (Abschnitt E-21). Auf diese Weise aufgenommene MS/MS- und MS<sup>3</sup>-Spektren finden sich in Abschnitt 4.3.

### **APCI-Interface**

Die Ionisation durch APCI ist im allgemeinen weniger störanfällig und weniger von der Eluentenzusammensetzung abhängig als die Ionisation durch ESI (225,229). Daher wurde im folgenden die HPLC-Routine-Methode über das APCI-Interface mit der Massenspektrometrie gekoppelt.

Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde auch hier die Tandem-Massenspektrometrie angewandt (vgl. Abschnitt 3.9.1 und E-22). Dabei wurden je nach der zu detektierenden Substanz innerhalb eines HPLC-Laufes verschiedene Fragmentierungssegmente verwendet. Bei jeder MS-MS-Spur werden jeweils die Signale der stärksten Produkt-Ionen der Fragmentierung aufaddiert. **Abb. 3-19.** zeigt ein Chromatogramm nach MS/MS-Detektion eines Retinsäure-Standards, **Abb. 3-20.** das jeweilige MS/MS-Fragmentspektrum. Aufgrund der geringen Unterschiede in den Retentionszeiten von 4-oxo- und 4-OH-Retinsäuren ist es praktisch nicht möglich, beide Substanzgruppen im MS/MS-Modus parallel zu bestimmen, da sie eines unterschiedlichen Fragmentierungssegmentes bedürfen. Zur Bestimmung von 4-oxo- und 4-OH-Retinsäuren einer Probe *via* LC-MS/MS müßte die Untersuchung daher über zwei

getrennte Analysen erfolgen. Ähnlich verhält es sich mit 3,4-dd-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure.



**Abb. 3-19.** MS-MS-Chromatogramm eines Retinsäure-Standards (1 ng/mL) gemäß Abschnitt E-22; Fragmentierung der Primär-Ionen für (1) *all-trans*-4-oxo-Retinsäure (Segment 2,  $m/z = 315$ ), (2) 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (Segment 2,  $m/z = 315$ ), (3) RO101670 (Segment 4,  $m/z = 327$ ), (4) 13-*cis*-Retinsäure (Segment 5,  $m/z = 301$ ), (5) 9-*cis*-Retinsäure (Segment 5,  $m/z = 301$ ) und (6) *all-trans*-Retinsäure (Segment 5,  $m/z = 301$ ).

Während die in **Abb. 3-20.** dargestellten Retinoide als Primär-Ion das protonierte Molekül zeigen, entspricht das gebildete Primär-Ion der 4-OH-Retinsäuren mit  $m/z = 299$  der jeweils protonierten Verbindung nach einer Wasserabspaltung (vgl. Abschnitt 4). Im Verlauf der Messungen mit der Routine-Methodik wurde im Elutionsbereich der OH-Retinsäuren in biologischen Proben ein (unbekanntes) Retinoid detektiert, das ein stabiles Primär-Ion von  $m/z = 317$  aufweist (vgl. Abschnitt 4 und 4.3). 4-OH-Retinsäuren konnten dagegen in den hier untersuchten biologischen Proben bei Verwendung der UV-Detektion nicht aufgefunden werden (vgl. Abschnitt 5). Vor diesem Hintergrund wurden für die LC-MS/MS-Kopplung im Massenspektrometer die Fragmentierungssegmente von  $m/z = 315$  (4-oxo-Retinsäuren) und  $m/z = 317$  (unbekanntes Retinoid) ausgewählt, wohlwissend, daß diese Vorgehensweise die 4-OH-Retinsäuren unberücksichtigt läßt.

Das zur Verfügung stehende HPLC-System bietet die Möglichkeit einer Reihenschaltung eines Diodenarray-Detektors (DAD, nichtdestruktiv) mit dem Massenspektrometer (destruktiv). Untersuchungen ergaben, daß die erreichbare Empfindlichkeit im Massenspektrometer

ca. 3-4mal besser ist, wenn der Diodenarray-Detektor ausgespart wird. Dies ist wahrscheinlich auf eine sich in der Detektorzelle des Diodenarray-Detektors und/oder in den Verbindungsstücken ereignende Peak-Dispersion zurückzuführen. Aufgrund des beträchtlichen Informationsgehaltes der DAD-Detektion und da die direkte MS/MS-Detektion die Bestimmung bestimmter Verbindungen ausschließt, wurde schließlich trotz der geringeren Empfindlichkeit die Kopplung der HPLC mit DAD- und MS/MS-Detektion ausgewählt.

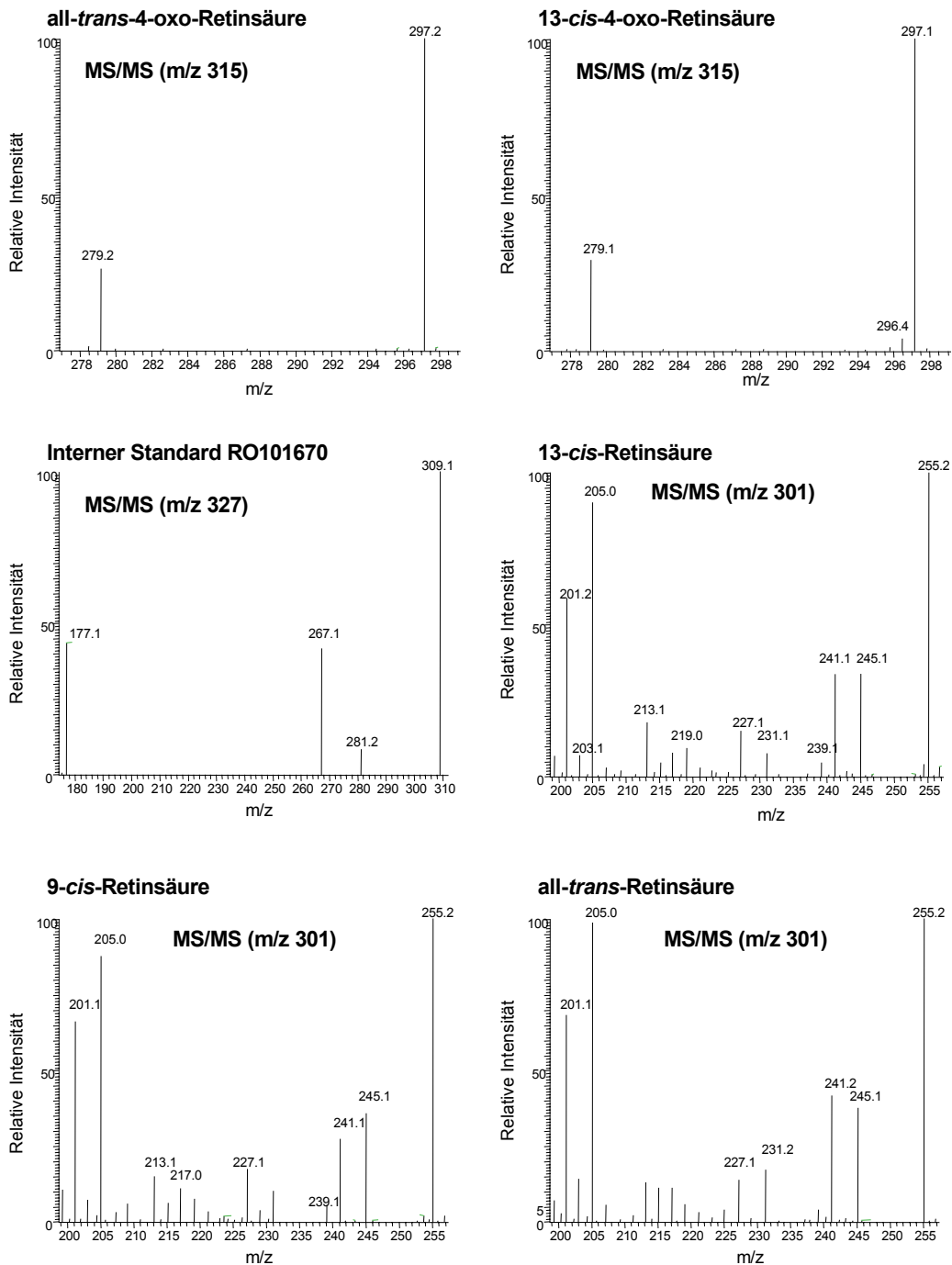
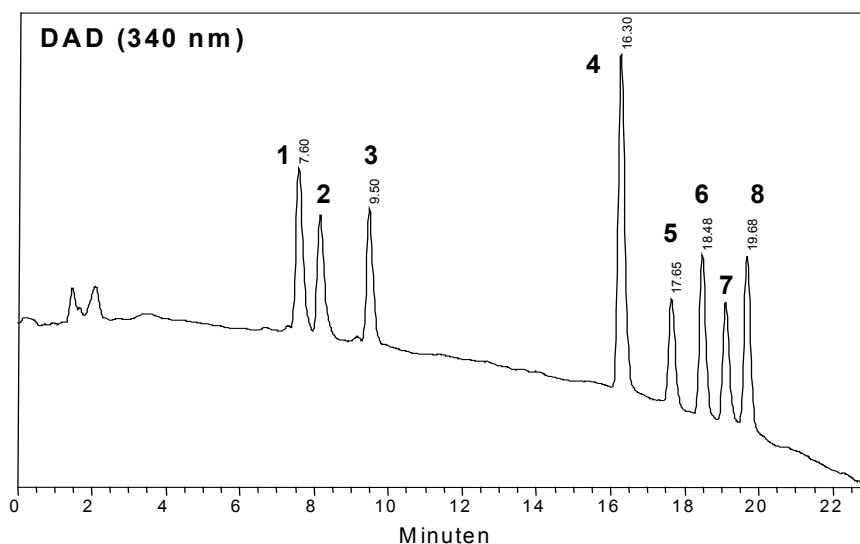


Abb. 3-20. MS-MS-Fragmentspektren verschiedener Retinoide bei der HPLC-DAD-APCI-MS<sup>2</sup>-Kopplung gemäß Abschnitt E-22.

Der zur Verfügung stehende DAD-Detektor (UV6000LP, Thermoquest) stellt dabei gegenüber herkömmlichen DAD-Detektoren eine Neuerung dar. Der UV6000LP besitzt eine neuartige Durchflußzelle, die trotz einer Länge von 50 mm -also der fünffachen Standardlänge - nur ein Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{L}$  hat. Aufgrund der resultierenden 2  $\mu\text{L}$  Volumen pro 10 mm Zellenlänge liefert diese neue Zelle dem Lambert-Beerschen Gesetz entsprechend höhere Peaks und hat damit eine entscheidend höhere Empfindlichkeit. Ein Zellvolumen von 10  $\mu\text{L}$  ist bei der Verwendung von 2-mm-Säulen eigentlich nicht optimal (vgl. Abschnitt 3.6.3 und 3.6.4). Da für den UV6000LP keine spezielle *Microbore*-Detektorzelle zur Verfügung stand, wurde trotzdem die 10- $\mu\text{L}$ -Zelle verwendet, wobei sich die erhaltene Auflösung als erstaunlich gut herausstellte (**Abb. 3-21.**). Nachteilig ist die beobachtete Drift im Verlauf des Gradienten, die sich vermutlich aus der speziellen Geometrie der Flußzelle ergibt.



**Abb. 3-21.** Chromatogramm (DAD-Spur bei 340 nm) eines Retinsäure-Standards (5 ng/mL) bei der Messung in dem HPLC-DAD-MS<sup>2</sup>-System gemäß Abschnitt E-22 (1: all-*trans*-4-oxo-Retinsäure, 2: 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure, 3: 13-*cis*-4-OH-Retinsäure, 4: IS RO 101670, 5: 3,4-*dd*-Retinsäure, 6: 13-*cis*-Retinsäure, 7: 9-*cis*-Retinsäure, 8: all-*trans*-Retinsäure).

Eine Kalibrierung beider Detektionsarten erfolgte auf 5 Konzentrationsniveaus bei 3 Messungen pro Konzentration. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0.5, 1, 2.5, 5 und 7.5 ng/mL. Die Konzentration des internen Standards all-*trans*-Acitretin (RO 101670) betrug in allen Kalibrierlösungen 10 ng/mL. Als mathematisches Modell wurde die lineare Regression ausgewählt. Die jeweilige Kalibrierfunktion  $y = mx + b$  wurde für beide Detektionsarten für das jeweilige Retinoid bestimmt und die entsprechenden Regressionsparameter sind in **Tab. 3-23.** und **Tab. 3-24.** wiedergegeben. Alle statistischen Berechnungen erfolgten in diesem Zusammenhang über SigmaStat<sup>®</sup> Statistical Software (Jandel Scientific, Erkrath).



Mit Hilfe des F-Tests ( $P = 99\%$ ; 13; 13) wurde jeweils überprüft, ob sich die Verfahrensstandardabweichungen  $S_{X0}$  (als Maß für die Präzision) signifikant voneinander unterscheiden (208,209). Signifikante Unterschiede bestanden nur für 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure und für 13-*cis*-Retinsäure. In diesen beiden Fällen liefert die UV-Detektion die bessere Güte. Für alle anderen Substanzen besteht hinsichtlich der Güte kein signifikanter Unterschied.

**Tab. 3-23.** Regressionsparameter für die MS/MS-Detektion gemäß Abschnitt E-22.

Retinoid	m	b	$S_y$	r	$t_b$	$S_{X0}$
<b>all-trans-4-oxo-RA</b>	1,85884	0,00505753	0,049	0,998761	0,250922	0,026361
<b>13-cis-4-oxo-RA</b>	0,916243	0,0416135	0,090	0,994968	1,11724	0,098227*
<b>13-cis-RA</b>	0,942564	0,000319339	0,027	0,999191	0,0282390	0,028645269
<b>9-cis-RA</b>	0,708677	0,00131647	0,014	0,999310	0,231128	0,019755121
<b>all-trans-RA</b>	0,861958	0,00192046	0,022	0,999623	0,212203	0,025523285

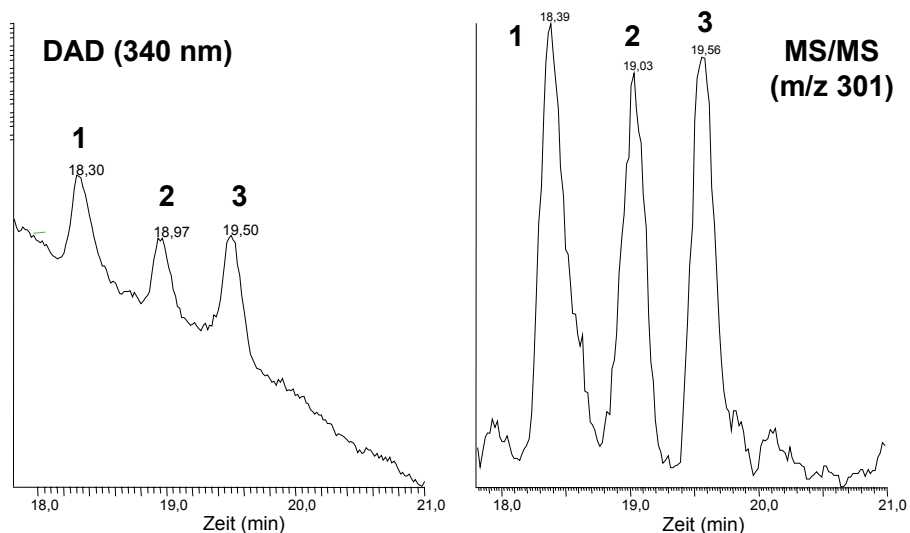
m (Steigung der Geraden), b (Ordinatenabschnitt),  $S_y$  (Reststandardabweichung), r (Korrelationskoeffizient),  $t_b$  (berechnete Testgröße zur Signifikanz-Prüfung einer Abweichung von b hinsichtlich des Nulldurchgangs gemäß *t-Test*),  $S_{X0}$  (Verfahrensstandardabweichung); \*relativ große Verfahrensstandardabweichung ergibt sich aus der engen Segmentgrenze, die einen Teil des Peaks abschneidet

**Tab. 3-24.** Regressionsparameter für die DAD-Detektion (340 nm) gemäß Abschnitt E-22.

Retinoid	m	b	$S_y$	r	$t_b$	$S_{X0}$
<b>all-trans-4-oxo-RA</b>	1,04183	-0,0138969	0,015	0,999470	2,18743	0,014398
<b>13-cis-4-oxo-RA</b>	0,731621	-0,00760826	0,011	0,999905	1,72407	0,015035
<b>13-cis-4-OH-RA</b>	0,719787	-0,00357643	0,015	0,999910	0,587336	0,020839
<b>3,4-dd-RA</b>	0,597629	0,000482507	0,016	0,999453	0,0732751	0,026772
<b>13-cis-RA</b>	0,816334	-0,00236365	0,010	0,999854	0,547590	0,012250
<b>9-cis-RA</b>	0,627996	0,00301205	0,015	0,999012	0,496722	0,023886
<b>all-trans-RA</b>	0,955009	-0,00500622	0,017	0,999561	0,706659	0,017801

m (Steigung der Geraden), b (Ordinatenabschnitt),  $S_y$  (Reststandardabweichung), r (Korrelationskoeffizient),  $t_b$  (berechnete Testgröße zur Signifikanz-Prüfung einer Abweichung von b hinsichtlich des Nulldurchgangs gemäß *t-Test*),  $S_{X0}$  (Verfahrensstandardabweichung)

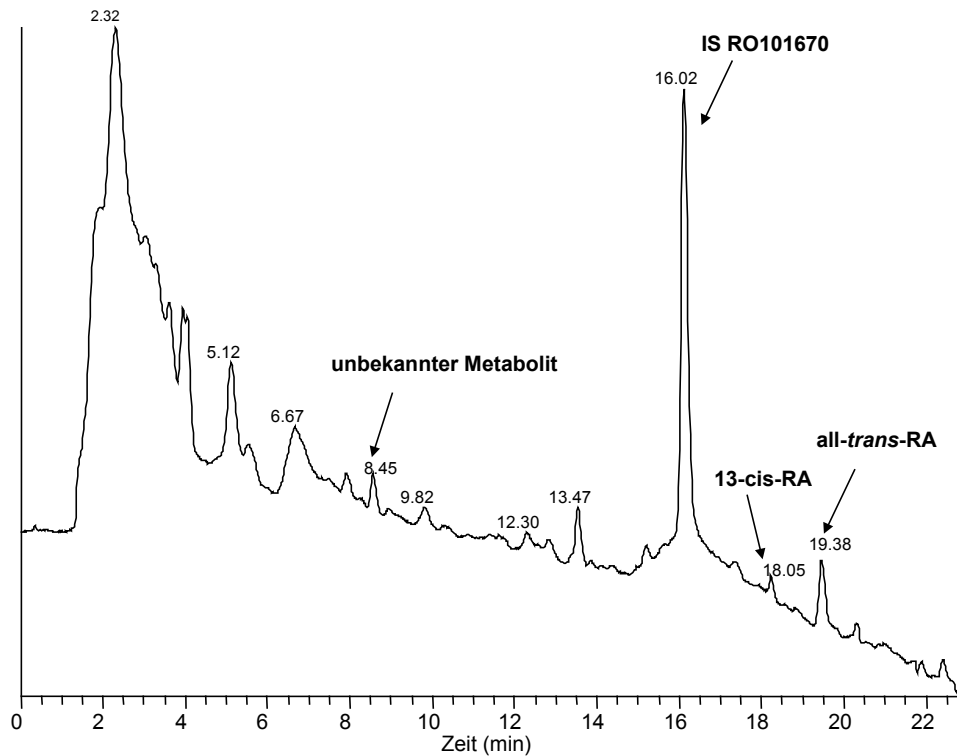
Um einen Eindruck von den erhaltenen Nachweisgrenzen zu erhalten sind in **Abb. 3-22.** die DAD-Spur bei 340 nm und die MS/MS-Spur im Elutionsbereich der Retinsäure-Isomere für einen Standard nahe der Nachweisgrenze dargestellt. Das erhaltene Signal bei einer injizierten Menge von 60 pg Retinsäure entspricht bei der DAD-Spur dem 9-13fachen, bei der MS/MS-Spur dem 7-10fachen Grundrauschen. Die Nachweisgrenze bei einem 3fachen Signal/Rauschverhältnis unterscheidet sich damit für beide Detektionsarten nur marginal von der Nachweisgrenze der Routine-HPLC-Methode gemäß Abschnitt E-14.



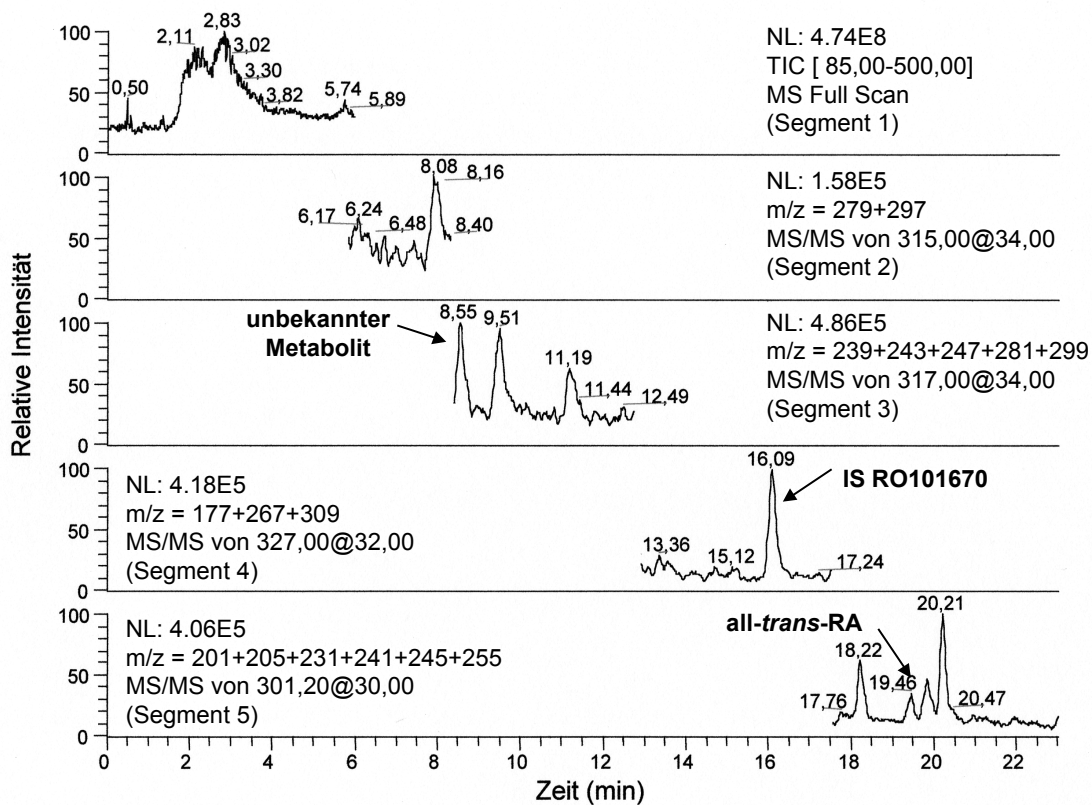
**Abb. 3-22.** Vergleich der Signalstärken eines Gemisches aus Retinsäure-Isomeren in der DAD-Spur (340 nm) und in der MS/MS-Spur (Primär-Ion:  $m/z = 301$ ) chromatographiert am HPLC-DAD-MS<sup>2</sup>-System (Abschnitt E-22; 1: 13-*cis*-Retinsäure, 2: 9-*cis*-Retinsäure, 3: all-*trans*-Retinsäure; je 60 pg).

Eine Detektion von all-*trans*-Retinsäure über eine Tandem-Massenspektrometrie im negativen Modus nach Fragmentierung des Primär-Moleküliions  $m/z = 299$  ( $M-H$ )<sup>-</sup> (Abschnitt E-23) war in etwa 10mal unempfindlicher als die Detektion im positiven Modus.

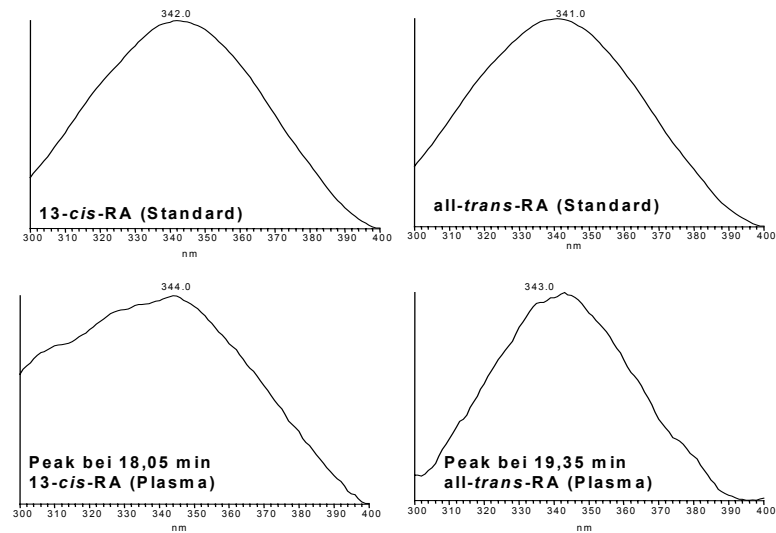
Die beschriebene HPLC-DAD-MS<sup>2</sup>-Kopplung im positiven Modus wurde schließlich zur Messung der polaren Retinoide in Serum-Proben (NMRI-Mäuse, vgl. Abschnitt 5.1) eingesetzt. In **Abb. 3-23.** und **Abb. 3-24.** sind die Chromatogramme einer Serum-Probe in der DAD- und MS/MS-Detektion dargestellt. Mit der DAD-Detektion können im wesentlichen drei Retinoide detektiert werden, nämlich all-*trans*-Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure (bzw. 9,13-di-*cis*-Retinsäure, Koelution, vgl. Abschnitt 3.6.4) und ein unbekannter Retinoid-Metabolit. Der Peak bei Minute 13,47 resultiert aus einer nicht zu vermeidenden, über die Probenvorbereitung eingebrachten Kontamination. Auf die Charakterisierung des unbekannteten Metaboliten wird in Abschnitt 4 genauer eingegangen. In **Abb. 3-25.** sind die DAD-Spektren der Peaks bei Minute 18,05 und 19,38 den Spektren von 13-*cis*- und all-*trans*-Retinsäure-Standards gegenübergestellt. Trotz der geringen Analytmenge in der Probe sind die erhaltenen Spektren noch aussagekräftig und der Vergleich mit den Referenzspektren zeigt eine gute Übereinstimmung.



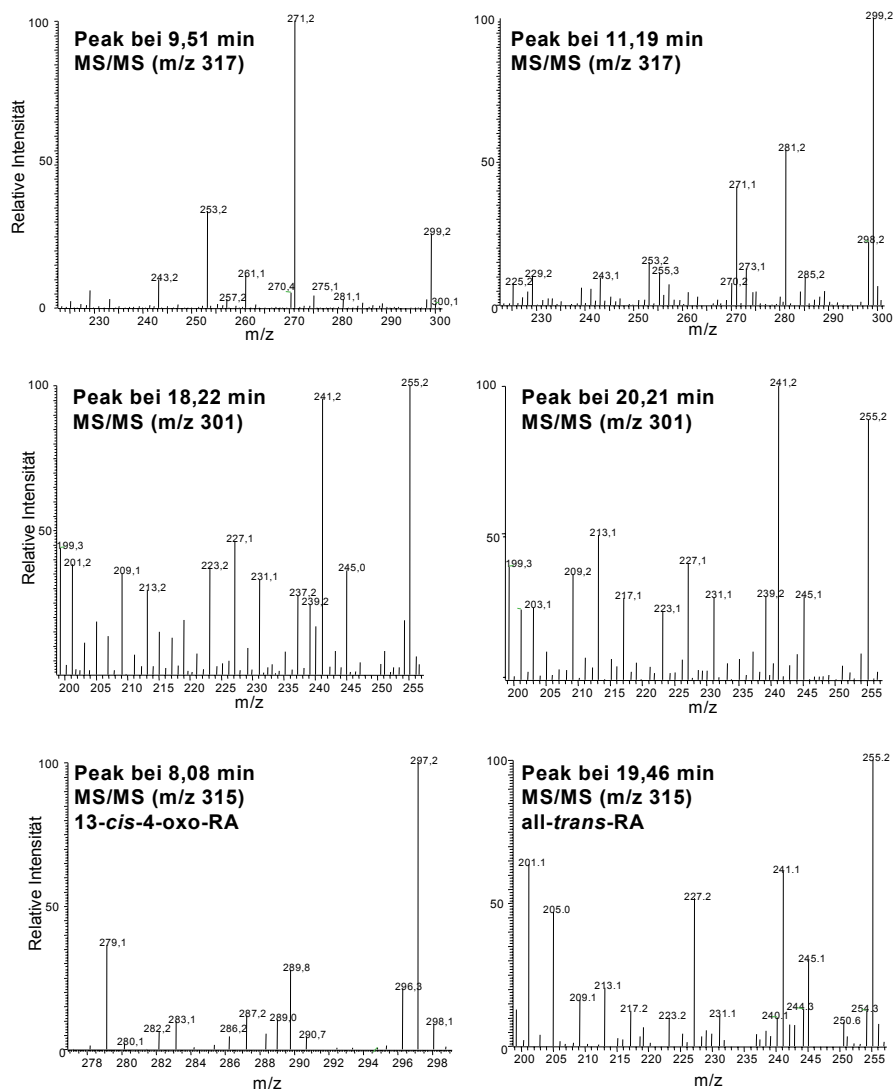
**Abb. 3-23.** DAD-Chromatogramm (340 nm) einer Serum-Probe (polare Retinoide, NMRI-Maus gemäß Abschnitt E-27, Gruppe: 15.000 IE/kg; analysiert mittels HPLC-Methode nach Abschnitt E-22).



**Abb. 3-24.** MS/MS-Chromatogramm einer Serum-Probe (polare Retinoide, NMRI-Maus, gemäß Abschnitt E-27, Gruppe: 15.000 IE/kg; analysiert mittels HPLC-Methode nach Abschnitt E-22). Die Probe ist identisch mit der in **Abb. 3-23.** beschriebenen Probe.



**Abb. 3-25.** Vergleich der DAD-Spektren von 13-*cis*- und all-*trans*-Retinsäure-Standards mit den in einer Serum-Probe detektierten Peaks entsprechender Retentionszeit (vgl. **Abb. 3-23.**, NMRI-Maus, gemäß Abschnitt E-22).



**Abb. 3-26.** MS/MS-Fragmentspektren der in einer Serum-Probe (NMRI-Maus, gemäß Abschnitt E-22) detektierten Peaks (vgl. **Abb. 3-24.**).

Im Rahmen der MS/MS-Detektion werden einige Peaks erhalten, die in der DAD-Detektion nicht auftreten. Der Peak bei Minute 8,08 entspricht der Retentionszeit von 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure. Ein Vergleich der Fragmentspektren (vgl. **Abb. 3-26.** und **Abb. 3-20.**) zeigt zudem eine gute Übereinstimmung.

Die Peaks bei Minute 9,51 und 11,19 zeigen Retinoid-ähnliche Fragmentspektren (vgl. **Abb. 3-26.** mit **Abb. 4-8.** und **Abb. 4-9.**), sind über den DAD aber nicht detektierbar. Auch die Peaks bei Minute 18,22 und 20,21 zeigen Retinoid-ähnliche Fragmentspektren (**Abb. 3-26.**), ohne über den DAD detektiert werden zu können. Der kleine Peak bei Minute 19,45 (**Abb. 3-24.**) entspricht der Retentionszeit von all-*trans*-Retinsäure. Auch das Fragmentspektrum zeigt in weiten Teilen eine Übereinstimmung (vgl. **Abb. 3-26.** mit **Abb. 3-20.**). Verglichen mit der DAD-Detektion zeigt sich für all-*trans*-Retinsäure aber ein deutlich schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis. Der Grund hierfür sind Interferenzen von Fragment-Ionen gleichen *m/z*-Verhältnisses, die sich über den gesamten Elutionsbereich erstrecken und insbesondere in den angrenzenden Peaks dominierend werden.

Ob es sich bei den Peaks, die zwar über die Tandem-Massenspektrometrie detektiert werden können, nicht aber über die Diodenarray-Detektion, um Retinoide handelt, kann nur spekuliert werden. Falls dem so sein sollte, müßten die entsprechenden Substanzen jedenfalls unter den gegebenen APCI-Bedingungen wesentlich besser ionisiert werden als die bekannten Retinoide. Nur so wäre es erklärbar, daß sie -obwohl in der DAD-Detektion nicht nachweisbar- in der MS/MS-Detektion derartig deutliche Signale liefern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die hier untersuchte Kopplung der HPLC mit der Diodenarray-Detektion *und* der APCI-Tandem-Massenspektrometrie gegenüber der UV-Detektion auf zwei Wellenlängen den Vorteil hat, daß eine weitergehende und damit wesentlich sicherere Identifizierung des Analyten ermöglicht wird. Eine Steigerung der Empfindlichkeit der Methode konnte aber nicht erreicht werden. Die erhaltenen Nachweisgrenzen sind in matrixfreien Proben für beide Detektionsarten mit denen der UV-Detektion auf zwei Wellenlängen vergleichbar. In biologischen Proben ist die DAD-Spur zur Quantifizierung besser geeignet als die MS/MS-Spur, bei der die auftretenden *m/z*-Interferenzen (vgl. all-*trans*-Retinsäure) eine quantitative Auswertung quasi unmöglich machen (zumindest in Verbindung mit der hier verwandten Probenvorbereitung). Eine alleinige Detektion mit der Tandem-Massenspektrometrie ist daher nicht sinnvoll.

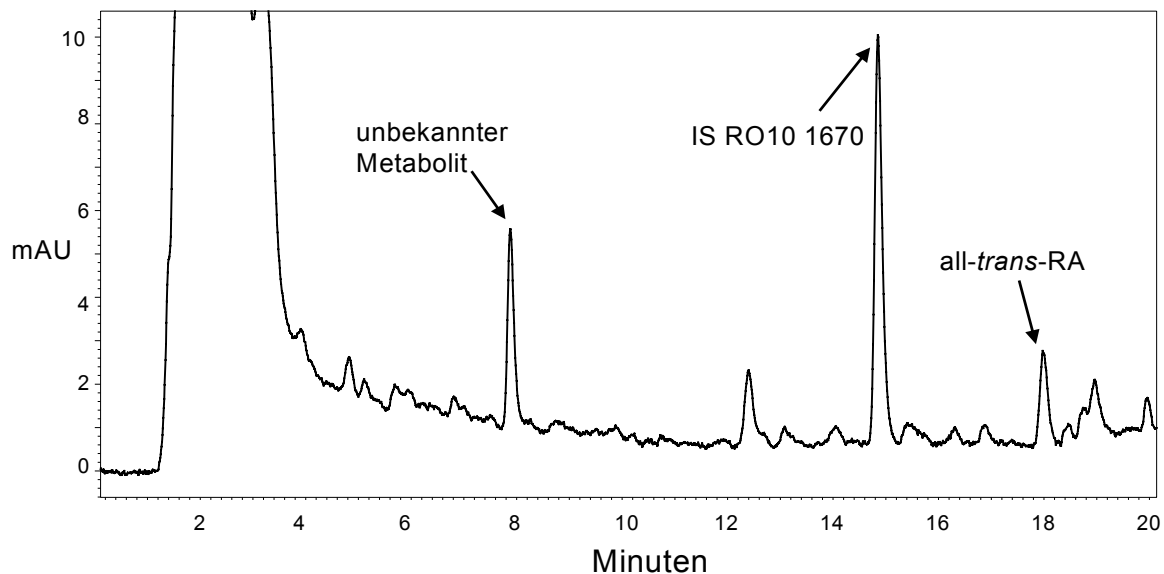
Die in der Literatur beschriebenen Methoden einer LC-ESI-MS- (133) bzw. einer LC-APCI-MS<sup>2</sup>-Kopplung (24) zur Analytik von Retinsäuren zeigen nur ihre Anwendbarkeit bei der

Analyse von Standards (24,133) oder einer Plasma-Probe einer Maus (24) bei erhöhten Gehalten nach einer verabreichten *all-trans*-Retinsäure-Dosis auf. Die Messung der Plasma-Probe war dabei rein qualitativer Natur. Der Nachweis ihrer Anwendbarkeit bei der quantitativen Messung physiologischer Konzentrationen in biologischen Matrices muß noch unter Beweis gestellt werden. Die erhaltenen Nachweisgrenzen bei der Analyse von Standard-Lösungen waren jeweils mit der hier erreichten Empfindlichkeit vergleichbar.

Es ist gut möglich, daß Interferenzen bei höheren Konzentrationen eine eher untergeordnete spielen. Ebensogut ist es möglich, daß eine veränderte, auf die Massenspektrometrie optimierte Probenvorbereitung einige Interferenzen ausklammern kann und bessere Resultate liefert. Fest steht hingegen, daß die Tandem-Massenspektrometrie in Verbindung mit einer Ionenfalle als Massenanalysator keinen deutlichen Empfindlichkeitsgewinn gegenüber einer UV-Detektion liefert. Eine UV-Detektion erscheint insgesamt das robustere Verfahren zu sein und sie weist aufgrund der speziellen Struktur der Retinoide bereits eine hervorragende Selektivität auf. Die Verwendung eines Diodenarray-Detektors anstelle eines Mehrwellenlängen-Detektors ist vorteilhaft, da über das jeweilige UV-Spektrum der Verbindung eine weitergehende Absicherung des analytischen Ergebnisses ermöglicht wird.

## 4 Charakterisierung eines unbekanntes Vitamin-A-Metaboliten

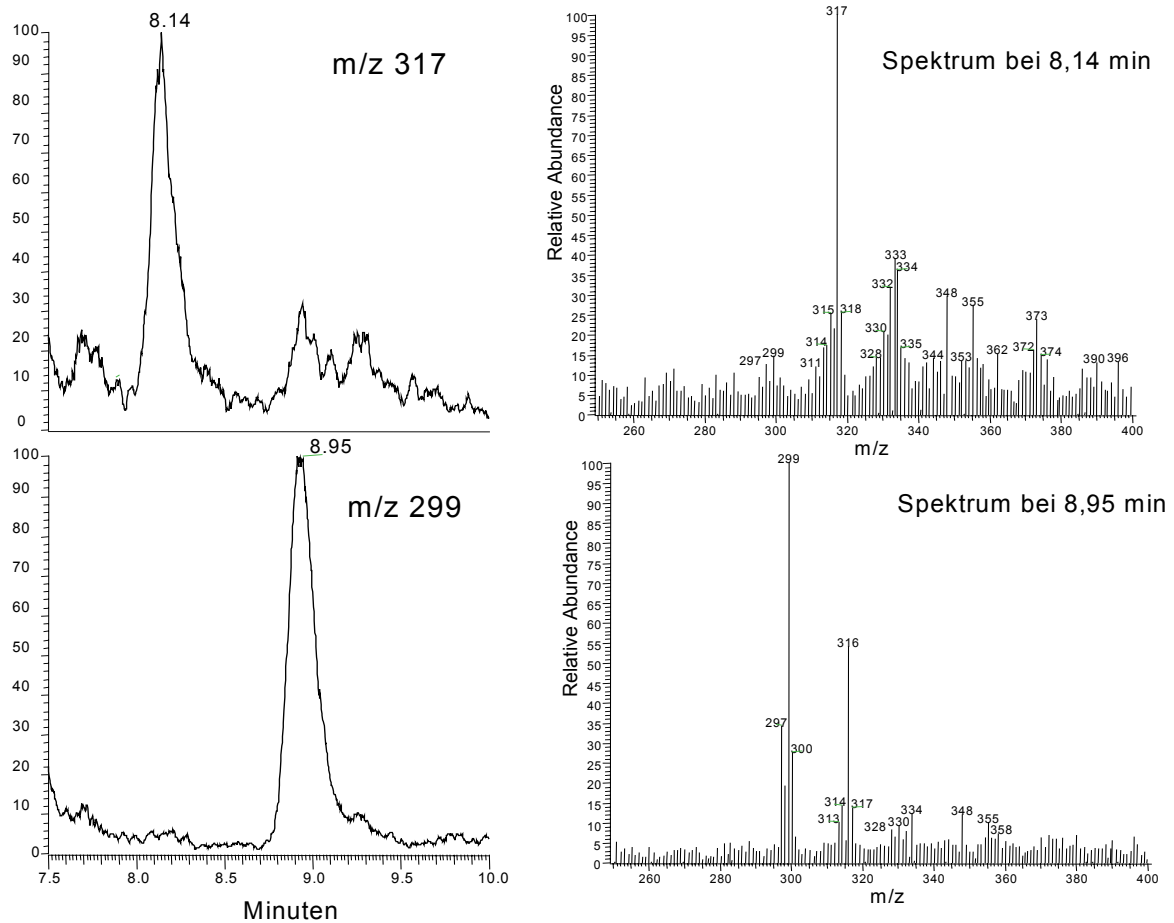
Bei der Analyse von Leber-Proben von Mäusen wurde im Chromatogramm im Retentionsbereich der 4-OH- und 4-oxo-Retinsäuren ein Peak detektiert, der eine Retentionszeit zwischen der von *all-trans*-4-OH-Retinsäure und 13-*cis*-4-OH-Retinsäure aufweist und bei der Detektion auf zwei Wellenlängen ein für 4-OH-Retinsäuren charakteristisches Flächenverhältnis (340 nm/356 nm) von 1,2 zeigt (**Abb. 4-1**).



**Abb. 4-1.** Chromatogramm einer Leber-Probe einer Maus (polare Retinoide, NMRI, entsprechend Abschnitt E-27, Gruppe 15.000 IE/kg). Die Messung erfolgte entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-14).

Die Messung einer mit 13-*cis*-4-OH-Retinsäure aufgestockten Leber-Probe mit LC-APCI-MS im *Full-Scan-Modus* zeigt für 13-*cis*-4-OH-Retinsäure ( $M = 316$ ) ein dominierendes Ion bei  $m/z = 299$  ( $(M+H)^+ - H_2O$ ). Das Molekülion bei  $m/z = 317$  kann dagegen kaum detektiert werden. Das dominierende Ion des unbekanntes Metaboliten ist hingegen  $m/z = 317$ , wohingegen das Ion bei  $m/z = 299$  kaum detektiert werden kann (**Abb. 4-2**).

Dieser unbekanntes Metabolit wurde auch in den Lebern von Ratten und in einer humanen Leber-Probe gefunden (vgl. Abschnitte 5.2, 5.3 und 5.5). Bei höheren Gehalten in der Leber konnte er in vergleichsweise geringeren Konzentrationen in Serum und Niere von Mäusen detektiert werden (Abschnitt 5.1). Zur näheren Strukturaufklärung wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die im folgenden dargestellt werden.



**Abb. 4-2.** Chromatogramm einer Leber-Probe einer Maus (entsprechend Abschnitt E-27, Gruppe: 15.000 IE/kg), die im Rahmen der Flüssig-Extraktion mit 13-*cis*-4-OH-Retinsäure (100  $\mu$ L eines 5-ng/mL-Standards) aufgestockt wurde. Die Messung erfolgte entsprechend der LC-APCI-MS-Methodik (Abschnitt E-22, aber *Full-Scan-Modus*). Links ist der Elutionsbereich der OH-Retinsäuren (Massenspur  $m/z = 317$  (unbekannter Metabolit) und  $m/z = 299$  (13-*cis*-4-OH-Retinsäure)) dargestellt, rechts die jeweiligen Massenspektren im Peakmaximum.

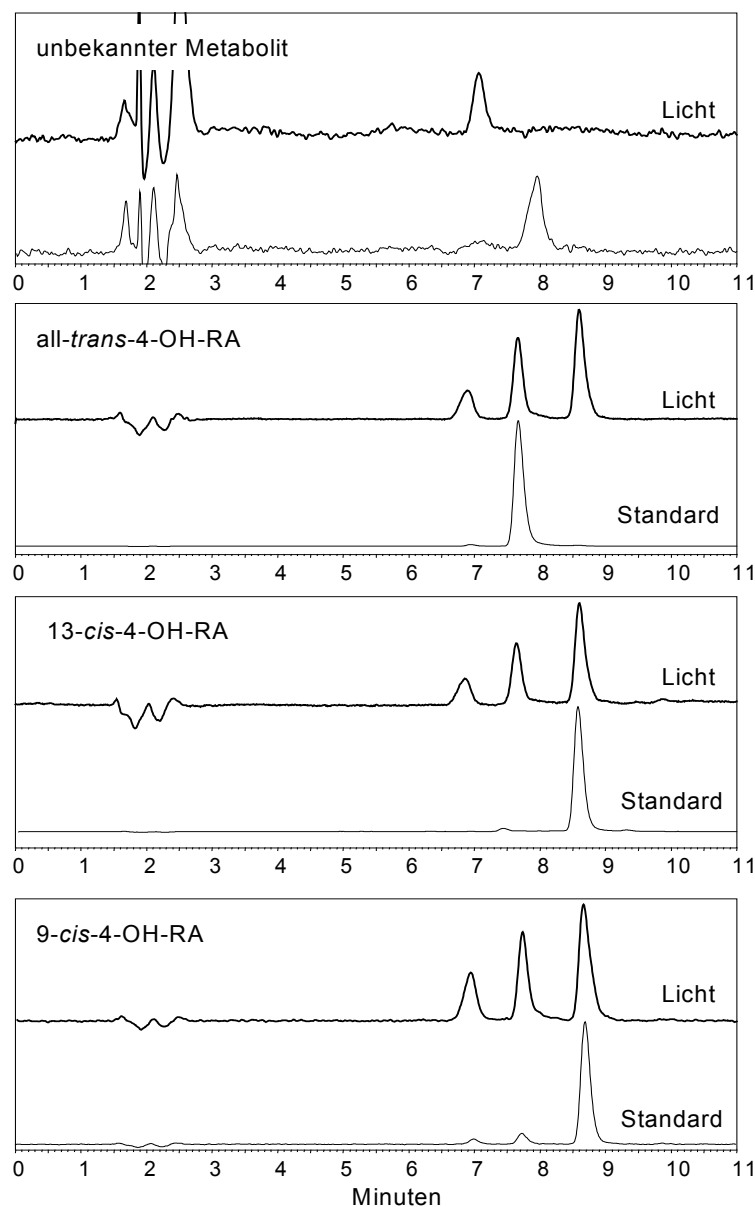
#### 4.1 Retentionszeiten und Untersuchungen der Isomerisierung

Der unbekannte Metabolit wurde chromatographisch aus den Leber-Proben isoliert, indem nach der Trennung relevante Eluate gesammelt und anschließend vereint wurden. Nach Vakuumkonzentration und Wiederaufnahme (vgl. Abschnitt E-9 und E-10) wurden ein Aliquot dieser Lösung und verschiedene Standardlösungen von OH-Retinsäuren in Glasvials für 20 Minuten dem Tageslicht ausgesetzt. **Abb. 4-3.**, **Abb 4-4.** und **Abb. 4-5.** zeigen die Chromatogramme nach der anschließenden Messung mit der Routine-Methode im Vergleich mit den unbelichteten Standardlösungen.

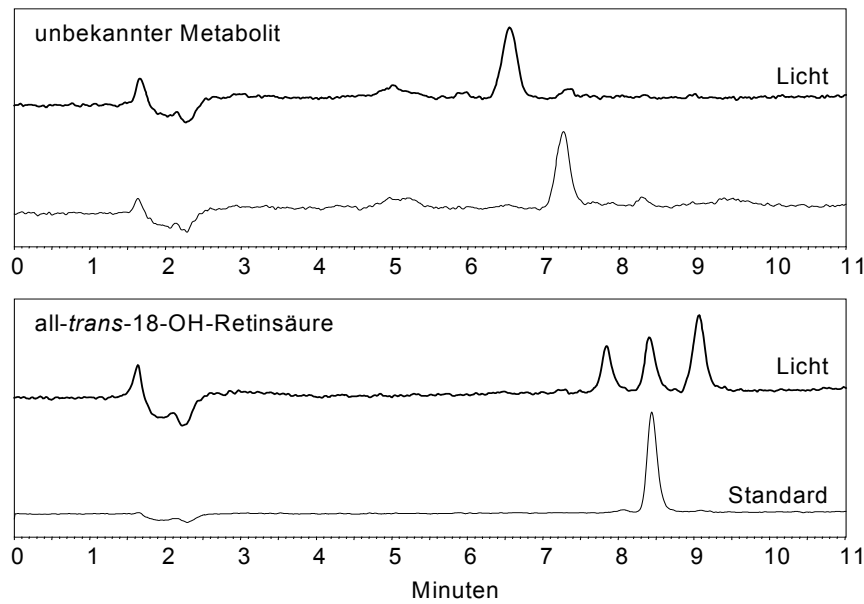
Keiner der getesteten Standards zeigt dieselbe Retentionszeit wie der unbekannte Metabolit. Bei der Bestrahlung der 4-OH-Retinsäure-Standards mit Tageslicht entsteht durch die Licht-Isomerisierung unabhängig vom eingesetzten Isomer eine charakteristische Peakgruppierung. Da unabhängig von dem eingesetzten Isomer die gleiche Peakgruppierung entsteht und keiner



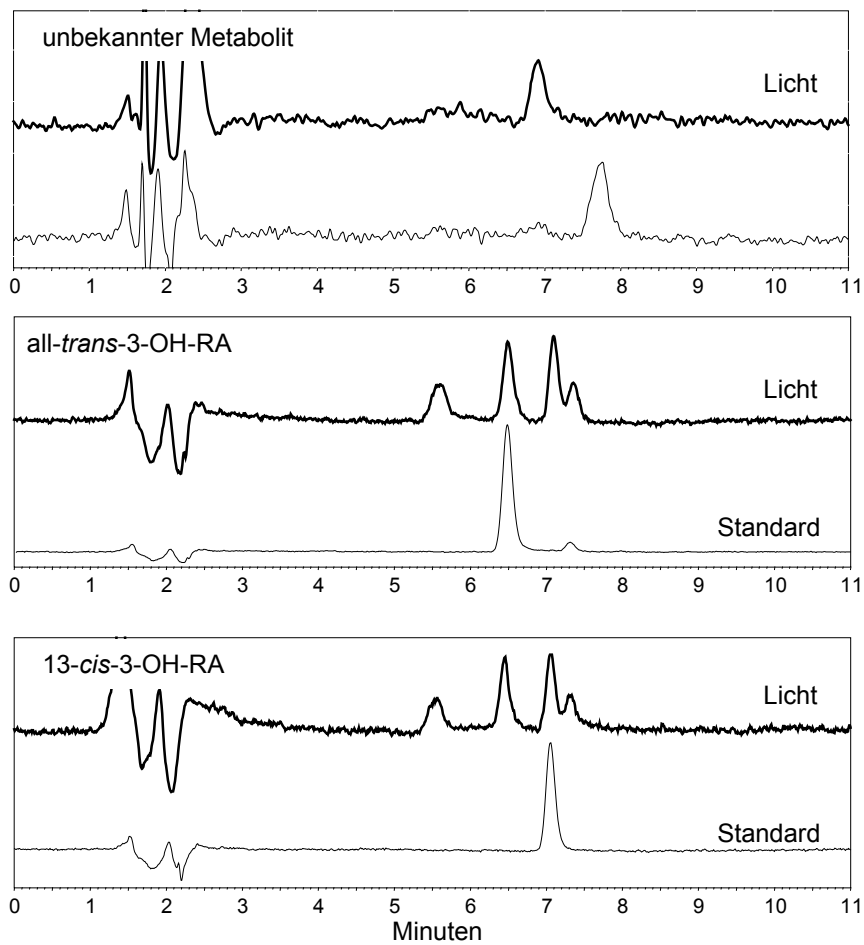
dieser Peaks mit dem unbekanntes Metaboliten oder seinem Isomerisierungsprodukt nach seiner Bestrahlung mit Tageslicht (**Abb. 4-3.**) koeluiert, kann eine 4-OH-Retinsäure-Struktur komplett ausgeschlossen werden. Falls es sich um eine 4-OH-Retinsäure-Struktur handeln würde, würde nach Bestrahlung des unbekanntes Metaboliten mit Tageslicht, die gleiche Peakgruppierung zu erwarten sein, wie nach Bestrahlung der drei 4-OH-Retinsäure-Isomere. Auch nach Bestrahlung von *all-trans*-18-OH-Retinsäure (**Abb. 4-4.**) und der 3-OH-Retinsäuren (**Abb. 4-5.**) koeluiert keines der nach Bestrahlung mit Tageslicht entstandenen Isomere mit den Peaks des unbekanntes Metaboliten. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem unbekanntes Metaboliten weder um ein 3-OH- noch um ein 4-OH- oder 18-OH-Retinsäure-Isomer handelt.



**Abb. 4-3.** Chromatogramme des aufgereinigten unbekanntes Metaboliten und von 4-OH-Retinsäure-Standards in ihrer ursprünglichen Form und nach Bestrahlung mit Tageslicht (Messung entsprechend der Routine-Methode (Abschnitt E-14). Die Chromatogramme sind jeweils auf den größten Peak skaliert).



**Abb. 4-4.** Chromatogramme des aufgereinigten unbekanntes Metaboliten und eines all-trans-18-OH-Retinsäure-Standards in ihrer ursprünglichen Form und nach Bestrahlung mit Tageslicht (Messung entsprechend der Routine-Methode (Abschnitt E-14)). Die Chromatogramme sind jeweils auf den größten Peak skaliert).



**Abb. 4-5.** Chromatogramme des aufgereinigten unbekanntes Metaboliten und von 3-OH-Retinsäure-Standards in ihrer ursprünglichen Form und nach Bestrahlung mit Tageslicht (Messung entsprechend der Routine-Methode (Abschnitt E-14)). Die Chromatogramme sind jeweils auf den größten Peak skaliert).

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden bei der Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die chromatographische Trennung auch Leber-Proben untersucht. **Tab. 4-1.** gibt einen Überblick über die prozentuale Verschiebung der Retentionszeiten im Vergleich zu den optimalen Bedingungen. Da auch eine hydroxylierte 4-oxo-Retinol-Struktur eine Molmasse von 316 hat, wurde in gleicher Weise die pH-Abhängigkeit der Retentionszeit von all-*trans*-4-oxo-Retinol untersucht.

**Tab. 4-1.** pH-Abhängigkeit der Retentionszeit des unbekanntes Metaboliten, 13-*cis*-4-OH-Retinsäure und all-*trans*-4-oxo-Retinol in der chromatographischen Trennung (vgl. Abschnitt 3.7.6).

	prozentuale Veränderung der Retentionszeit gegenüber pH 5,7		
	unbekannter Metabolit	13- <i>cis</i> -4-OH-Retinsäure	all- <i>trans</i> -4-oxo-Retinol
pH 5,2	+ 11 %	+ 12 %	- 1 %
pH 6,2	- 3 %	- 7 %	0 %

Der unbekanntes Metabolit zeigt bei unterschiedlichen pH-Werten ein ähnliches Retentionsverhalten wie 13-*cis*-4-OH-Retinsäure. Die Retentionszeiten von all-*trans*-4-oxo-Retinol sind in dem getesteten Bereich hingegen unabhängig vom pH-Wert. Die vorliegenden Ergebnisse lassen damit als ein Strukturelement des unbekanntes Metaboliten eine Carboxy-Funktion vermuten.

## 4.2 UV-Spektren

Aufgrund ihrer zahlreichen konjugierten Doppelbindungen zeigen Retinoide eine im UV-Bereich beträchtliche Absorption im Wellenlängenbereich von 310 bis 370 nm. Beispielsweise hat all-*trans*-Retinol mit fünf konjugierten Doppelbindungen ein Absorptionsmaximum bei 325 nm, wohingegen Retinoide mit einer zusätzlichen in Konjugation stehenden Doppelbindung, wie all-*trans*-Retinsäure (-C=O der Carboxylgruppe) oder 3,4-*dd*-Retinol (-C=C- im Cyclohexenring), ihr Maximum bei 350 nm zeigen (in Ethanol). 5,6-epoxy-Retinsäure hat verglichen mit all-*trans*-Retinsäure eine konjugierte Doppelbindung weniger und zeigt bei 327 nm maximale Absorption (166).

*Retro*-Retinoide, wie 14-Hydroxy-4,14-*retro*-Retinol oder Anhydroretinol (vgl. **Abb. 2-3.**), weisen ein UV-Spektrum mit einer charakteristischen vibronischen Feinstruktur auf (**Abb. 4-6.**).

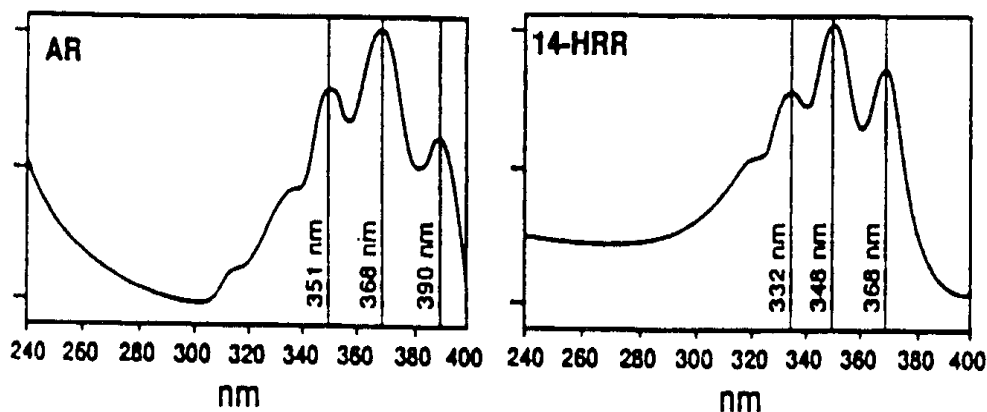
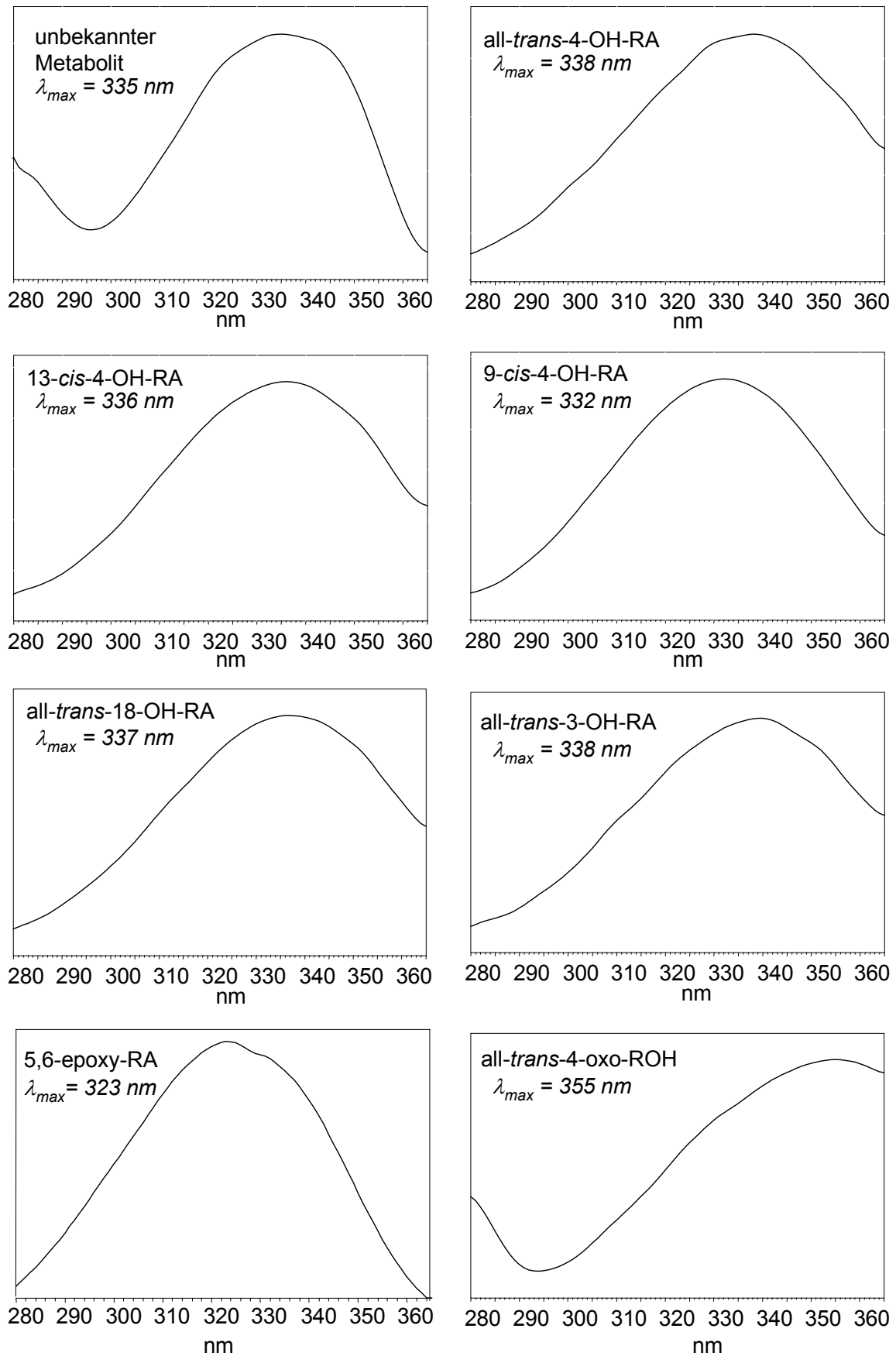


Abb. 4-6. UV-Spektren von Anhydroretinol (AR) und 14-Hydroxy-4,14-*retro*-Retinol (14-HRR) (modifiziert nach (242)).

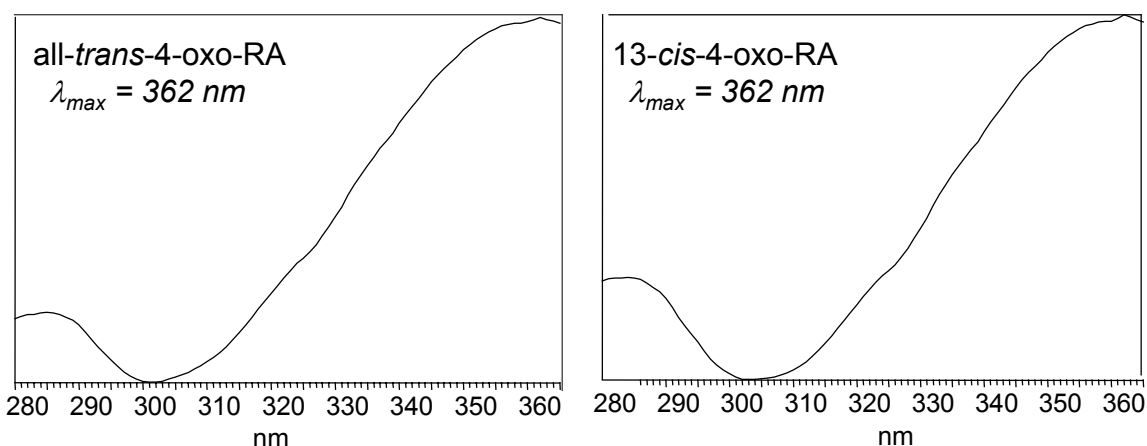
Der unbekanntes Metabolit zeigt hingegen ein breites Maximum ( $\lambda_{\max} = 336 \text{ nm}$ ) im Wellenlängenbereich von 300 bis 360 nm (Abb. 4-7.). Das Absorptionsmaximum ähnelt prinzipiell dem der untersuchten OH-Retinsäuren und läßt eine vergleichbare Anzahl von konjugierten Doppelbindungen erwarten.

Die UV-Spektren wurden überwiegend mit dem Mehrwellenlängen-Detektor im *stopped-flow*-Modus direkt in der Flußzelle des chromatographischen Systems aufgenommen (Abschnitt E-24). Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen kein Diodenarray-Detektor zur Verfügung statt. Im Nachhinein wurden auch einige wenige Spektren mit einem Diodenarray-Detektor aufgenommen. Die so erhaltenen Spektren sind in Abb. 4-7. und Abb. 4-8. dargestellt.

All-*trans*-5,6-epoxy-Retinsäure mit einer Molmasse von 316 wäre prinzipiell auch ein Kandidat für den unbekanntes Metaboliten, weist aber ein deutlich niedrigeres Absorptionsmaximum bei 323 nm auf. Da *cis*-Isomere der jeweiligen all-*trans*-Struktur bei Retinoiden generell nur geringe Unterschiede in ihren Absorptionsmaxima aufweisen (166), können 5,6-epoxy-Retinsäure-Isomere höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden. Prinzipiell wäre auch eine hydroxylierte 4-oxo-Retinol-Struktur denkbar, die ebenfalls eine Molmasse von 316 hat. Das UV-Spektrum von all-*trans*-4-oxo-Retinol zeigt aber ein Absorptionsmaximum bei 355 nm. Da die Einführung einer Hydroxy-Funktion bei anderen Retinoid-Strukturen gewöhnlich kaum einen Einfluß auf das Absorptionsmaximum hat (vgl. Abb. 3-25. (all-*trans*-RA  $\lambda_{\max} = 341 \text{ nm}$  und 13-*cis*-RA  $\lambda_{\max} = 342 \text{ nm}$ )), erscheint auch eine OH-4-oxo-Retinol-Struktur eher unwahrscheinlich, kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden.



**Abb. 4-7.** UV-Spektren des unbekannten aufgereinigten Metaboliten und wichtiger Retinoid-Standards in den mobilen Phasen des chromatographischen Systems (aufgenommen mit dem Mehrwellenlängen-Detektor im *stopped-flow*-Modus nach Abschnitt E-14; Ausnahme 5,6-epoxy-Retinsäure (DAD-Spektrum nach Abschnitt E-22)).



**Abb. 4-8.** UV-Spektren von all-*trans*-4-oxo- und 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure in der mobilen Phase des chromatographischen Systems (DAD-Spektrum nach Abschnitt E-22)).

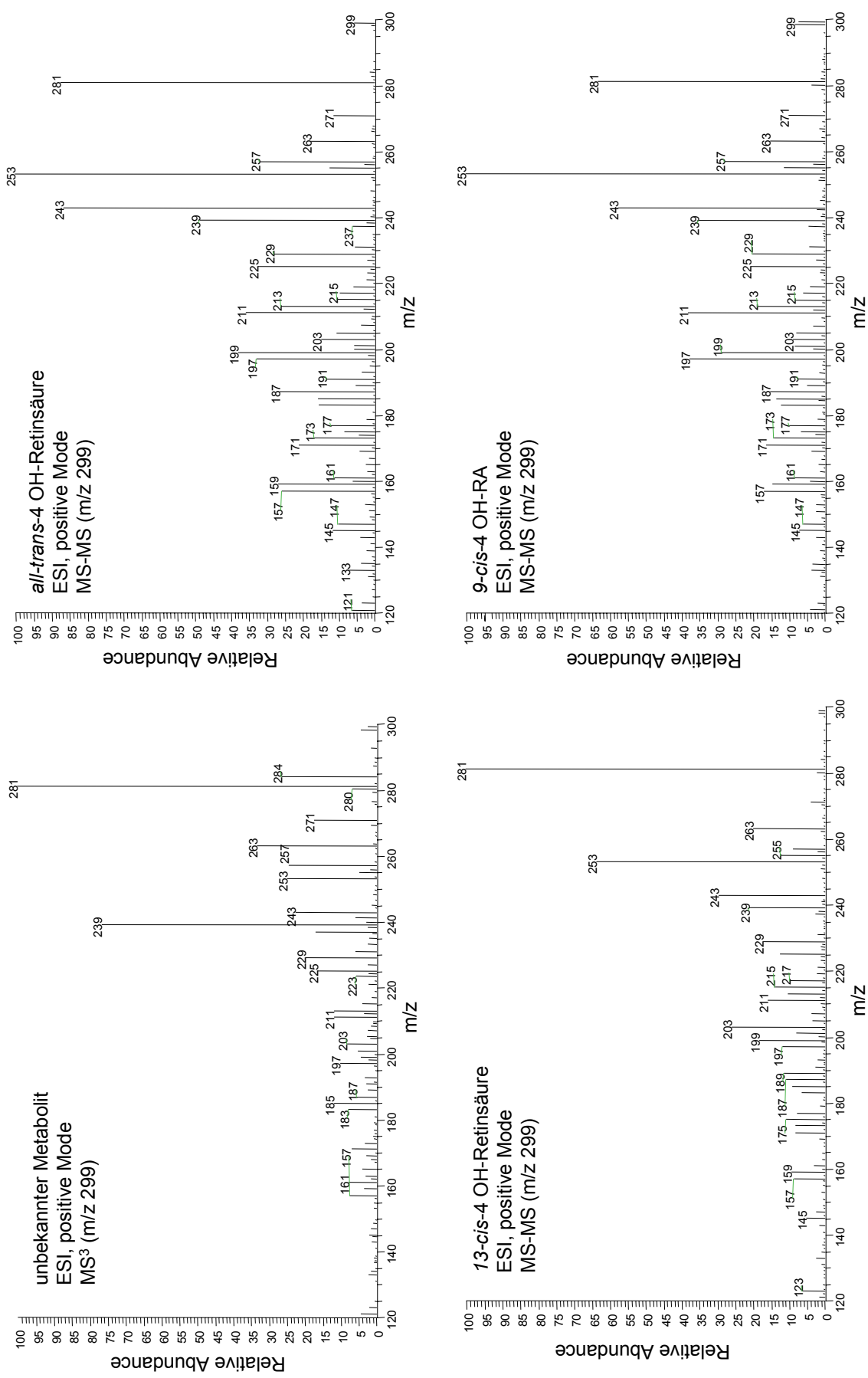
Alle Spektren von Retinoiden mit einer Keto-Gruppe an Position 4 zeigen im Bereich von 270 bis 290 nm ein Nebenmaximum, das interessanterweise auch im Spektrum des unbekanntes Metaboliten auftritt.

### 4.3 MS<sup>n</sup>-Fragmentspektren

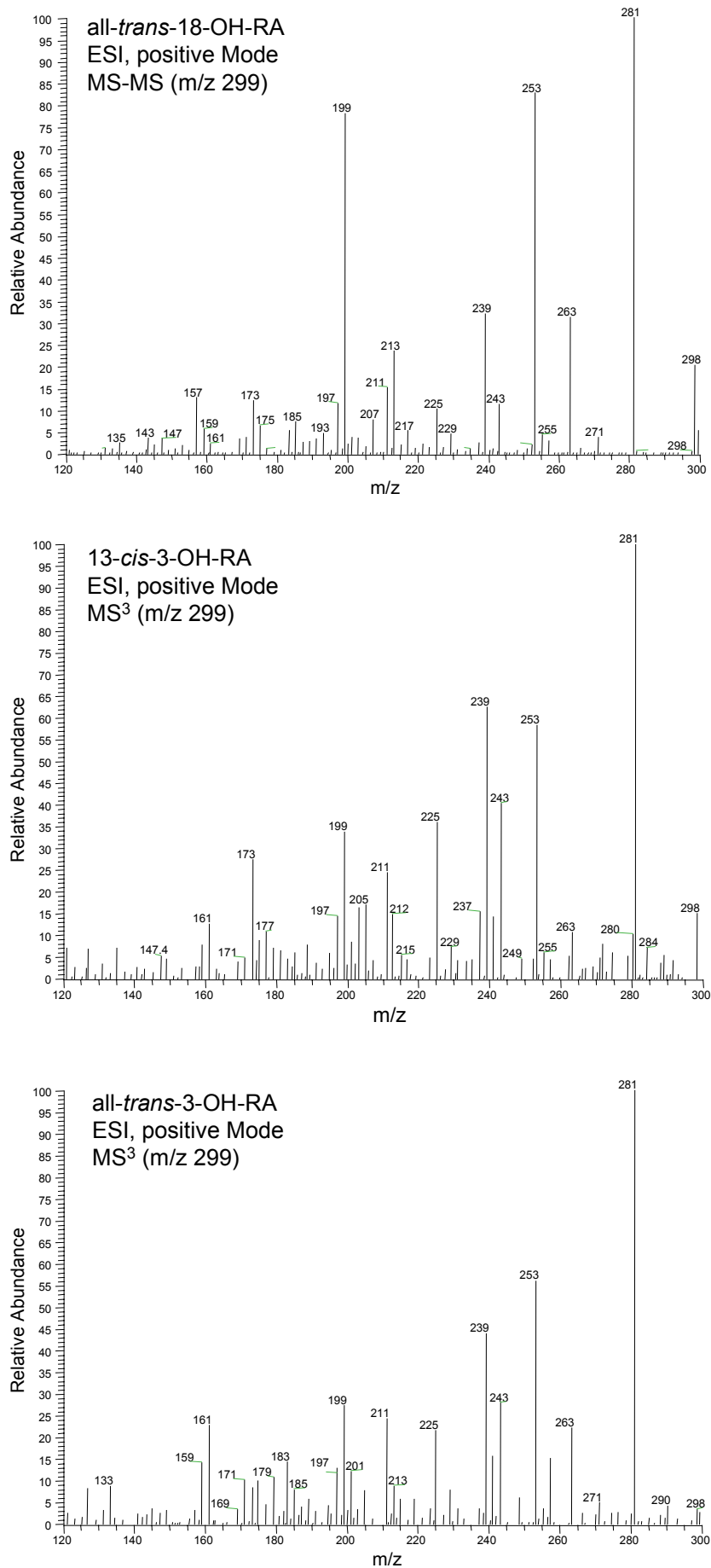
Wie bereits in **Abb. 4-2.** erwähnt, zeigt der unbekanntes Metabolit im *Full-Scan*-Massenspektrum ein stabiles Ion bei  $m/z$  317, wohingegen 13-*cis*-4-OH-Retinsäure ein dominierendes Ion bei  $m/z$  299 aufweist. Das Ion  $m/z$  299 entsteht dabei aus dem Molekülion  $(M+H)^+$  ( $m/z = 317$ ) nach einer Wasserabspaltung. Diese Wasserabspaltung ist aufgrund der allylischen Stellung der 4-OH-Gruppe erleichtert, da das entstehende Ion Mesomerie-stabilisiert ist.

Der aufgereinigte unbekanntes Metabolit und verschiedene OH-Retinsäure-Standards wurden mittels ESI-MS<sup>n</sup> (Abschnitt E-21) vermessen, um weitere Strukturinformationen über die Fragmentspektren zu erhalten. Das zur Verfügung stehende Massenspektrometer ermöglicht das sequentielle Auswählen von Ionen, deren Massenspektren durch anschließende Fragmentierung in der Ionenfalle erzeugt werden können.

Diese Eigenschaft ermöglicht es, bei unterschiedlichen Ausgangsionen (hier:  $m/z$  317 und  $m/z$  299) durch eine Mehrfachfragmentierung ein Fragmentspektrum auf der Basis des gleichen Ions zu erhalten. Moleküle mit einem dominierenden Ion bei  $m/z$  317 wurden daher einer MS<sup>3</sup>-Fragmentierung unterzogen, wobei nach Fragmentierung des Ions bei  $m/z$  317 das Ion bei  $m/z$  299 ausgewählt und anschließend weiter fragmentiert wurde. Bei Molekülen mit einem dominierenden Ion bei  $m/z$  299 wurde dieses Ion direkt fragmentiert (MS<sup>2</sup>).



**Abb. 4-9.** ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmentspektren des aufgereinigten unbekannteten Metaboliten und der 4-OH-Retinsäuren (aufgenommen entsprechend Abschnitt E-21).



**Abb. 4-10.** ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmentspektren von all-*trans*-18-OH-Retinsäure und 3-OH-Retinsäuren (aufgenommen entsprechend Abschnitt E-21).



**Abb. 4-9.** und **Abb. 4-10.** zeigen die so erhaltenen Fragmentspektren des unbekanntes Metaboliten und der untersuchten OH-Retinsäuren.

Bei allen OH-Retinsäuren mit der OH-Funktion in Allylstellung (4-OH-Retinsäuren und 18-OH-Retinsäuren) war das Ion bei  $m/z$  299 das dominierende Ausgangsion. Bei den 3-OH-Retinsäuren, bei denen die OH-Funktion nicht allylisch steht, und bei dem unbekanntes Metaboliten dominiert dagegen das Ion bei  $m/z$  317. Das dominierende Ion bei  $m/z$  317 läßt damit für den unbekanntes Metaboliten eine Struktur vermuten, bei der keine allylisch stehende OH-Funktion auftritt. Das Fragmentspektrum von  $m/z$  299 des unbekanntes Metaboliten ähnelt in weiten Bereichen dem der anderen OH-Retinsäuren. Alle Fragmentspektren zeigen übereinstimmend die folgenden Ionen als Hauptfragmente: 281, 263, 253, 243 und 239. Unterschiede bestehen jedoch in den Intensitätsverhältnissen der einzelnen Signale. Während die Fragmentspektren der OH-Retinsäure-Standards alle ein intensives Signal bei  $m/z$  199 zeigen, ist dieses im Spektrum des unbekanntes Metaboliten deutlich kleiner. Eine Strukturaufklärung anhand dieser Spektren ist nur schwer möglich, da für die verwendete Fragmentierungstechnik keine Fragmentierungsregeln wie in der Elektronen-Ionisation (EI) zur Verfügung stehen. Das Ion bei  $m/z$  281 entspricht einer weiteren Wasserabspaltung:  $((M+H)^+ - 2H_2O)$ . Das Ion bei  $m/z = 253$  kann aus dem Verlust einer CO-Gruppierung resultieren:  $((M+H)^+ - 2H_2O - CO)$ . Ausgehend von Fragment  $m/z$  243 erhält man ein Fragment mit  $m/z$  199 durch eine Abspaltung einer  $CO_2$ -Gruppierung  $((M+H)^+ - (m/z 56) - CO_2)$ .

#### 4.4 $^1H$ -NMR-Spektroskopie

Für viele Retinoide, insbesondere für geometrische Isomere, sind die UV-Absorptionsspektren so ähnlich, daß es unmöglich ist, sie auf diese Weise zu unterscheiden oder ihre Identität abzuleiten. Die kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) zeichnet sich innerhalb der spektroskopischen Strukturaufklärungsverfahren durch ihren großen stereochemischen Informationsgehalt aus. Daher ist sie in der Identifizierung und Charakterisierung von nah verwandten Retinoiden sehr nützlich.

Verglichen mit der Massenspektrometrie ist die kernmagnetische Protonenresonanzspektroskopie eine eher unempfindliche Methodik. Während bei älteren Instrumenten noch mehrere Milligramm einer Verbindung nötig waren, um ein  $^1H$ -NMR-Spektrum aufzunehmen, ist es mit dem heutigen Stand der Technik möglich, ein aussagekräftiges Spektrum mit weniger als 1  $\mu g$  eines Retinoids aufzunehmen (143,166). Entscheidende Faktoren hinsicht-

lich der Empfindlichkeit einer Messung sind die Stärke des äußeren Magnetfeldes und die Zahl der aufgenommenen Scans. Da der Besetzungsunterschied der Kerne zwischen dem energieärmeren und dem energiereicheren Niveau und damit die Intensitäten eines Kernresonanzsignals von der Stärke des äußeren Magnetfeldes abhängen, können mit Hochfeldgeräten bei Betriebsfrequenzen von 400-600 MHz höhere Empfindlichkeiten erreicht werden (137,243). Zudem verbessert sich das Signal/Rausch-Verhältnis von NMR-Messungen mit dem Faktor  $\sqrt{n}$ , wenn eine größere Zahl  $n$  von aufgenommenen Spektren addiert wird, da sich das elektronische Zufallsrauschen teilweise herausmittelt, wohingegen die Beteiligung der Signale immer positiv ist (137,243).

Bei  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen bestehen erhebliche Schwierigkeiten bezüglich der Empfindlichkeit, da Kohlenstoff mit der Massenzahl 13 zu den unempfindlichen Nukliden zählt. Zum einen ist die Konzentration der durch Kernresonanz erfassbaren  $^{13}\text{C}$ -Atome mit 1,1% bezogen auf den natürlichen Kohlenstoff sehr gering, zum anderen beträgt das magnetische Moment des  $^{13}\text{C}$ -Kerns nur ca.  $\frac{1}{4}$  des Protons. Bei einer gleichen Anzahl von Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen führt dies zu einem Verhältnis der Signalintensitäten von  $^1\text{H}$  zu  $^{13}\text{C}$  von 5700 : 1 (137).

Eine große Zahl von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Retinoiden wurde publiziert oder kann über entsprechende Datenbanken abgerufen werden (44,141,155,165,215,244-256). Durch Aufnahme von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren und Vergleich der erhaltenen Spektren mit publizierten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Retinoiden ist es in den meisten Fällen möglich, die Konfiguration einer neuen Retinoid-Struktur schnell und zuverlässig aufzuklären. Mit Unterstützung der veröffentlichten NMR-Studien können folgende allgemeinere Gesetzmäßigkeiten aufgestellt werden, die bei der Identifizierung von unbekanntes Metaboliten weiterhelfen:

- 9-*cis*-Retinsäuren zeigen im Vergleich zu all-*trans*-Isomeren eine Tieffeldverschiebung des C-8-Dubletts ( $\sim 0.5$  ppm) und eine Hochfeldverschiebung des C-10-Dubletts ( $\sim 0.1$  ppm).
- Eine Isomerisierung der Doppelbindung zwischen C-13 und C-14 von *cis* nach *trans* führt zu einer starken Hochfeldverschiebung des H-12 ( $\sim 1.5$  ppm) und einer mäßigen Tieffeldverschiebung der C-20-Methyl-Protonen ( $\sim 0.3$  ppm).
- Der Vergleich von 13-*cis*-RA und 11,13-di-*cis*-RA zeigt Hochfeldverschiebungen für H-11 ( $\sim 0.4$  ppm) und H-12 ( $\sim 0.8$  ppm).

- Die Einführung einer Keto-Gruppe am Ringkohlenstoffatom C-4 verursacht Tieffeldverschiebungen für H-10 (~ 0.1 ppm); C-16- u. C-17-Methyl-Protonen (~ 0.16 ppm) und C-18-Methyl-Protonen (~ 0.13 ppm).
- In 4-oxo-Verbindungen erscheinen die C-2 und C-3-Methylengruppen als zwei Triplets bei ca. 1.8 und 2.5 ppm (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-).
- Die Einführung einer Hydroxy-Gruppe am Ringkohlenstoffatom C-4 führt zu einem Signal im Bereich von 4 ppm für H-4; zu einer Nicht-Äquivalenz der C-16- u. C-17-Methyl-Protonen und zu einer Tieffeldverschiebung der 18-CH<sub>3</sub>-Protonen (~ 0.1 ppm).
- Die Einführung einer Hydroxy-Gruppe an Kohlenstoffatom 18 verursacht anstatt des Singulets bei 1,72 ppm (18-H. 3H) ein Singulett bei 4.13 ppm (2H).
- 13-*cis*-RA mit einer Hydroxy-Gruppe an Position 16 zeigt anstelle der beiden Methylgruppen C-16 und C-17 bei 1.03 ppm nur noch eine Methylgruppe bei 1.01 ppm, dafür aber zwei Signale bei 3.29 ppm und 3.62 ppm ( $J = 11$  Hz).
- 4-oxo-Retinsäuren mit einer Hydroxy-Gruppe in Position 2 bzw. 3 (-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-) führten je zu einem doppelten Dublett entsprechend bei 3.87 bzw. 4.32 ppm.
- Eine 5,6-epoxy-Gruppierung zeigt zwei nicht äquivalente Signale für H-16, H-17 und eine Hochfeldverschiebung der Protonen an C-18 (~ 0.6 ppm).
- Photocyclisierte 13-*cis*- oder 13-*trans*-RA-Isomere zeigen charakteristische Kopplungskonstanten von ca. 5,6 Hz für die Kopplung zwischen H-7 und H-8.
- Bei Retinol-Isomeren findet man für H-14 ein Triplett bei 5,6 - 5,7 ppm ( $J = 7$  Hz) und für die Protonen am Kohlenstoffatom 15 ein Dublett bei ca. 3.9 - 4.7 ppm.
- Retinal-Isomere zeigen zwei Dubletts bei 5.95 ppm (C-14,  $J = 8$  Hz) und 10.15 ppm (C-15)

**Tab. 4-2.** gibt einen Überblick über publizierte NMR-Spektraldaten relevanter Retinoide.

Tab. 4-2. <sup>1</sup>H-NMR-Spektraldaten von Retinoiden (alle in CDCl<sub>3</sub> aufgenommen, bis auf\* (DMSO-d<sub>6</sub>), \*\* (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) und \*\*\* (Aceton))

δ [ppm]	olefinische Protonen										Methyl-Protonen					CH <sub>2</sub> -Gruppen					Literatur
	7,8	10	11	12	14	16,17	18	19	20	2	3	4	15								
all- <i>trans</i> -Retinylacetat	6.12; 6.18	6.09	6.65	6.27	5.61	1.03; 1.03	1.70	1.95	1.89	1.82	2.48	4.70	?	(257)							
all- <i>trans</i> -4-oxo-ROL	6.21; 6.31	6.22	6.59	6.35	5.72	1.15; 1.15	1.82	1.95	1.84	1.30	1.70	4.31	400 MHz	(44)							
all- <i>trans</i> -4-OH-ROL	6.10; 6.17	6.12	6.61	6.31	5.71	1.03; 1.06	1.84	1.96	1.88	1.50	1.50	4.02	400 MHz	(44)							
all- <i>trans</i> -RA	6.14; 6.28	6.13	7.01	6.28	5.78	1.02; 1.02	1.71	2.00	2.35	1.85	2.49	2.00	100 MHz	(254)							
all- <i>trans</i> -4-OH-RA	6.20; 6.20	6.16	7.04	6.33	5.81	1.04; 1.00	1.83	2.01	2.38	1.70	2.54	4.04	100 MHz	(244)							
all- <i>trans</i> -4-oxo-RA	6.34; 6.34	6.14	6.97	6.30	5.79	1.17; 1.17	1.84	2.02	2.32	1.85	2.49	2.00	100 MHz	(252)							
all- <i>trans</i> -16-OH-4-oxo-RA-ME	6.35; 6.35	6.25	6.97	6.35	5.82	1.16; 3.72/3.44	1.87	2.01	2.40	1.70	2.54	2.00	100 MHz	(251)							
all- <i>trans</i> -16-OH-RA	6.22; 6.22		6.98		5.79	3.59/3.29; 1.01							200 MHz	(255)							
all- <i>trans</i> -18-OH-RA	6.19; 6.19	6.28	6.98	6.15	5.78	1.02; 1.02	4.12	1.98	2.34	1.47	1.62	2.03	200 MHz	(255)							
all- <i>trans</i> -3-OH-RA*	6.23; 6.23	6.27	7.08	6.42	5.81	1.05; 1.05	1.71	2.01	2.30	3.78		2.18	80 MHz	(258)							
all- <i>trans</i> -16-carboxy-4-oxo-RA	6.48; 6.48	6.29	6.97	6.43	5.75	1.46	2.04	1.91	2.31	2.45			100 MHz	(251)							
all- <i>trans</i> -16-OH-4-oxo-RAL	6.37; 6.37	6.24	7.1	6.4	5.95	3.60; 1.17	2.05	1.9	2.32			10.13	100 MHz	(251)							
all- <i>trans</i> -5,6-epoxy-RA-ME	6.33	6.23	6.93	6.30	5.79	1.09; 1.14	0.94	1.96	2.34				90 MHz	(259)							
13- <i>cis</i> -RA	6.18; 6.29	6.26	7.03	7.74	5.66	1.04; 1.04	1.72	2.00	2.10	1.47	1.62	2.03	400 MHz	(155)							
13- <i>cis</i> -4OH-RA	6.20; 6.20	6.26	7.00	7.77	5.67	1.04; 1.02	1.82	1.98	2.08		4.01		100 MHz	(244)							
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	6.35; 6.35	6.36	6.99	7.82	5.71	1.21; 1.21	1.86	2.03	2.10	1.85	2.50		100 MHz	(244)							
13- <i>cis</i> -2OH-4-oxo-RA-ME	6.34; 6.34	6.37	6.96	7.84	5.71		1.87	2.03	2.08	3.87	2.71		100 MHz	(254)							
13- <i>cis</i> -3OH-4-oxo-RA-ME	6.27; 6.39	6.36	6.94	7.84	5.69	1.19; 1.31	1.91	2.00	2.08		4.32		100 MHz	(254)							
13- <i>cis</i> -16OH-RA	6.19; 6.22	6.26	6.97	7.78	5.65	3.28/3.61; 1.01	1.77	1.99	2.07	1.36; 1.38	1.67	2.10	200 MHz	(255)							
13- <i>cis</i> -3OH-RA*	6.23; 6.23	6.28	7.05	7.69	5.63	1.02; 1.04	1.70	1.98	2.04	3.75			250 MHz	(258)							
13- <i>cis</i> -5,6-epoxy-RA-ME	6.33	6.23	6.93	7.79	5.65	1.09; 1.14	0.94	1.96	2.09	1.47	1.61	2.02	90 MHz	(259)							
11,13-di- <i>cis</i> -RA	6.12; 6.28	6.40	6.65	6.97	5.72	1.02; 1.02	1.71	1.96	2.21				400 MHz	(155)							
9- <i>cis</i> -4-OH-RA	6.20; 6.64	6.04	7.08	6.21	5.79	1.05; 1.03				1.89	2.50	4.02	400 MHz	(165)							
9- <i>cis</i> -4-oxo-RA	6.32; 6.82	6.20	7.05	6.30	5.80	1.2; 1.2	1.90	2.01	2.31	1.49	1.64	2.05	400 MHz	(165)							
9- <i>cis</i> -RA	6.29; 6.65	6.06	7.13	6.25	5.80	1.04; 1.04	1.75	2.01	2.35	1.47	1.64	2.05	400 MHz	(155)							
9- <i>cis</i> -13,14-dihydro-RA***	6.16; 6.64	5.92	6.59	5.64		1.02; 1.02	1.71	1.90	1.06	1.48	1.64		400 MHz	(26)							
11- <i>cis</i> -RA	6.14; 6.29	6.53	6.59	5.91	5.90	1.03; 1.03	1.72	1.97	2.36	1.47	1.62	2.02	400 MHz	(155)							
11- <i>cis</i> -ROL**	6.29; 6.35	6.38	6.83	5.87	5.69	1.09; 1.09	1.66	1.73	1.86	1.46	1.57	1.92	500 MHz	(246)							
9,13-di- <i>cis</i> -RA	6.35; 6.79	6.18	7.20	7.78	5.70	1.05; 1.05	1.75	1.99	2.10	1.50	1.64	2.00	400 MHz	(155)							
9,11,13-tri- <i>cis</i> -RA	6.29; 6.67	6.29	6.73	6.87	5.72	1.03; 1.03	1.73	1.99	2.20	1.47	1.62	2.03	400 MHz	(155)							
photocyclisierte 13- <i>trans</i>	5.77; 5.84	2.80	6.25	6.20	5.70	1.13; 1.14	0.98	1.68	2.33	1.45	1.45	1.45	400 MHz	(155)							
photocyclisierte 13- <i>cis</i>	5.76; 5.83	2.89	6.24	7.61	5.66	1.12; 1.14	0.97	1.69	2.06	1.40	1.40	1.40	400 MHz	(155)							
7- <i>cis</i> -RA-ME	5.95; 6.11	6.22	6.93	6.26	5.78	1.04; 1.04	1.52	1.90	2.34				100 MHz	(248)							
7,13-di- <i>cis</i> -RA-ME	6.00; 6.23	6.36	7.07	7.82	5.69	1.06; 1.06	1.54	1.96	2.09				100 MHz	(248)							

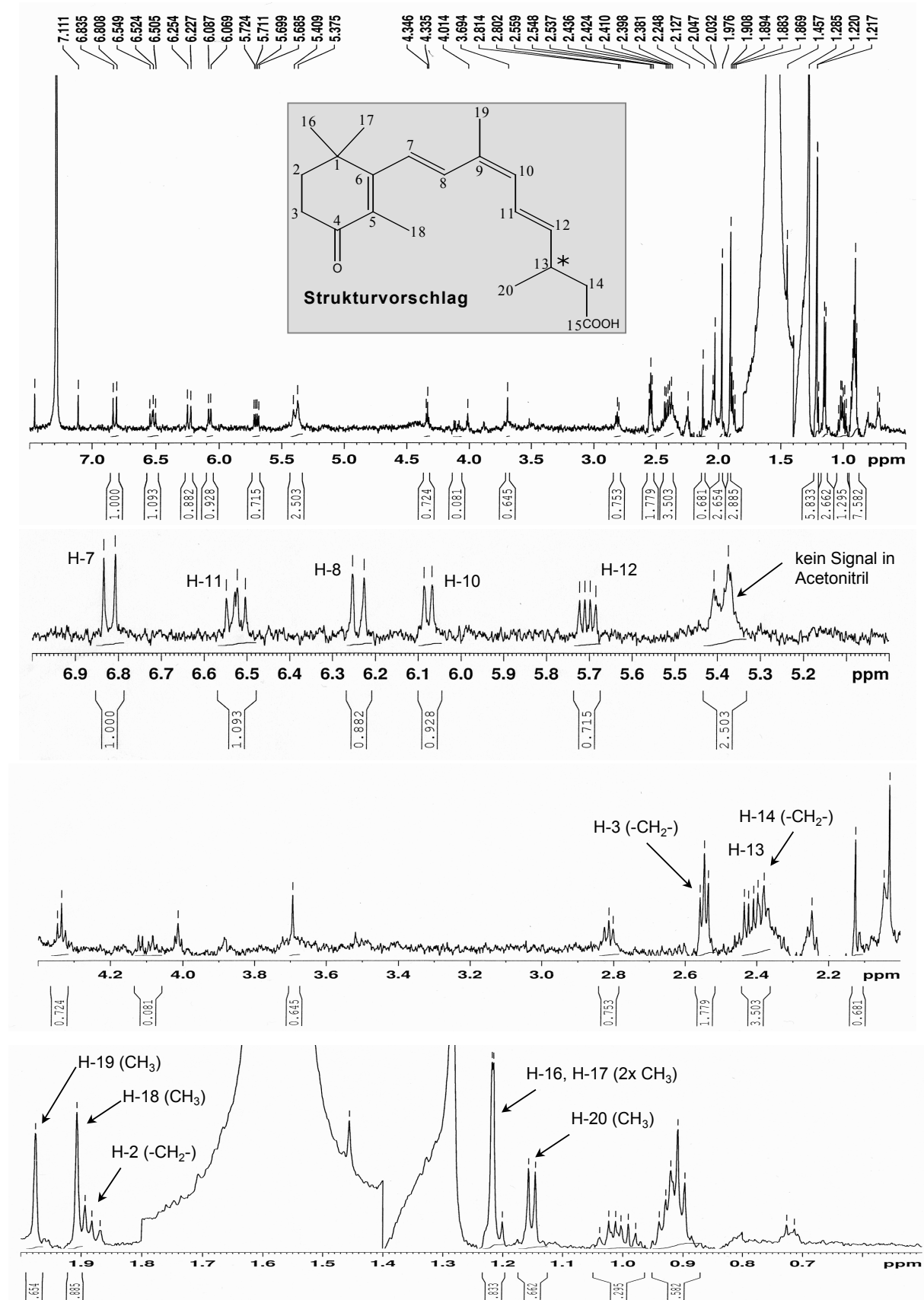
Für die Strukturaufklärung zweckmäßig sind die Kopplungskonstanten für unterschiedliche Konfigurationsisomere von all-*trans*-Retinsäure (**Tab. 4-3**).

**Tab. 4-3.** Kopplungskonstanten für all-*trans*-Retinsäure-Isomere in Hertz (141,155).

	H-7/H-8	H-10/H-11	H-11/H-12
photocyclisierte 13- <i>cis</i>	5,6	10,7	15,7
photocyclisierte 13- <i>trans</i>	5,7	10,5	15,3
9,11,13-tri- <i>cis</i>	16,0	11,5	12,0
all- <i>trans</i> -5,6-epoxy	15,0	11,3	15,8
9,13-di- <i>cis</i>	16,0	11,5	14,7
11- <i>cis</i>	16,4	11,8	12,3
9- <i>cis</i>	16,0	11,3	14,8
13- <i>cis</i>	16,5	12,3	15,3
11,13-di- <i>cis</i>	16,0	12,6	11,6
all- <i>trans</i>	16,0	11,4	15,0

Nachdem festgestellt wurde, daß eine Fütterung von Mäusen mit erhöhten Vitamin-A-Gehalten zu höheren Konzentrationen des unbekanntes Metboliten in der Leber führt (Abschnitt 5.1), wurden Lebern von Mäusen nach Fütterung höherer Vitamin-A-Gehalte im präparativen Maßstab aufgearbeitet und der unbekanntes Metabolit anschließend über drei verschiedene chromatographische Methoden aufgereinigt und zunächst in Acetonitril aufbewahrt (Abschnitt E-25). Auf diese Weise konnten schätzungsweise 800–1000 ng des unbekanntes Metaboliten isoliert werden, eine Menge die eine Messung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ermöglicht.

Der Metabolit wurde mit einem Hochfeldgerät mit einer Betriebsfrequenz von 600 MHz (Bruker-Avance) in CD<sub>3</sub>CN und in CDCl<sub>3</sub> (jeweils 70 µL Lösungsmittel) vermessen (Abschnitt E-26). Die Anzahl der durchgeführten Scans lag im ersten Fall bei etwa 4000, im zweiten Fall bei etwa 8000 Scans. **Abb. 4-11.** zeigt das erhaltene Spektrum in CDCl<sub>3</sub>. Da die überwiegende Zahl der publizierten Spektren ebenfalls in CDCl<sub>3</sub> aufgenommen wurden, ist dieses Spektrum für Vergleichszwecke besser geeignet als das Spektrum in CD<sub>3</sub>CN. Das erhaltene Spektrum in CD<sub>3</sub>CN zeigte zudem geringere Signalintensitäten und ein breites Signal im Bereich von 1.7 bis 2.5 ppm, das die Signale interessanter Methyl-Protonen überlagert. Abgesehen davon konnten keine größeren Unterschiede zwischen beiden Spektren festgestellt werden.



**Abb. 4-11.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des unbekannten Metaboliten in  $\text{CDCl}_3$  (Avance, 600 MHz, Bruker, gemäß Abschnitt E-26)

Die Interpretation des aufgenommenen Spektrums ist schwierig, da durch die geringe zur Verfügung stehende Menge sowohl die Integralhöhe als auch die Kopplungskonstanten nur verhältnismäßig ungenau bestimmt werden können. Zudem können etwaige Verunreinigungen zu einer Mißinterpretation der Spektren beitragen.

Ein Vergleich des erhaltenen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums mit den Literatur-Spektren zeigt, daß keines der in **Tab. 4-2.** aufgeführten Retinoide mit dem zu identifizierenden Metaboliten identisch ist. Das aufgenommene Spektrum weist Retinoid-charakteristische Signale auf, unterscheidet sich aber zum Teil deutlich von den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in der Literatur:

$^1\text{H-NMR}$ , unbekannter Metabolit ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  (ppm) 6.82 (d, 1H,  $J = 16$  Hz), 6.54 (dd, 1H,  $J$  15 and 11 Hz), 6.24 (d, 1H,  $J$  16 Hz), 6.08 (d, 1H,  $J$  11 Hz), 5.70 (dd, 1H,  $J$  8 and 15 Hz), 5.41 (1H), 4.34 (1H,  $J$  7 Hz), 3.69 (1H), 2.81 (1H,  $J$  7 Hz), 2.55 (2H,  $J$  7 Hz), 2.40 (m), 2.13 (1H), 2.05 (1H), 1.98 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.89 (t, 2H), 1.22 (2s, 6 H), 1.15 (d, 3H,  $J$  7 Hz).

Besonders charakteristisch für Retinoide sind ihre olefinischen Protonen. Im Vergleich zu den Literatur-Spektren (6 olefinische Protonen) finden sich aber nur 5 olefinische Protonen im Spektrum. Das Spektrum wurde aus Gründen der Empfindlichkeit nur im Bereich von 0-8 ppm aufgenommen, da so mehr Scans pro Zeiteinheit ermöglicht werden. Keines der publizierten Spektren zeigt chemische Verschiebungen für olefinische Protonen von größer 8 ppm. Es ist daher eher unwahrscheinlich, daß sich das fehlende olefinische Proton in diesem nicht-aufgezeichneten Bereich befindet.

Die Dubletts bei einer chemischen Verschiebung  $\delta$  von 6.82 und 6.24 ppm mit einer Kopplungskonstante  $J$  von 16 Hz können sicher den Protonen an C-7 und C-8 zugeordnet werden (vgl. **Tab. 4-2.** und **Tab. 4-3.**).

Aufgrund der Kopplungskonstanten von 16 Hz können photocyclisierte Verbindungen ( $J_{7,8} = 5,6$  Hz) ausgeschlossen werden. Prägnant ist die große Differenz in der chemischen Verschiebung dieser beiden Signale. Ähnliche Unterschiede finden sich nur in 9-*cis*-, 9,13-di-*cis*- und 9,11,13-di-*cis*-Strukturen.

Das Signal der chemischen Verschiebung  $\delta = 6,54$  ppm kann dem Proton an C-11 zugeordnet werden. Das Kopplungsmuster resultiert aus der Kopplung mit den Protonen an C-10 ( $J = 11$  Hz) und an C-12 ( $J = 15$  Hz). Im Rahmen der Meßgenauigkeit können über die Kopplungskonstanten alle 11-*cis*-Strukturen ausgeschlossen werden (vgl. **Tab. 4-3.**,  $J = 11,8$  Hz und  $J = 12,3$  Hz). Ein Kopplungspartner findet sich im Spektrum bei

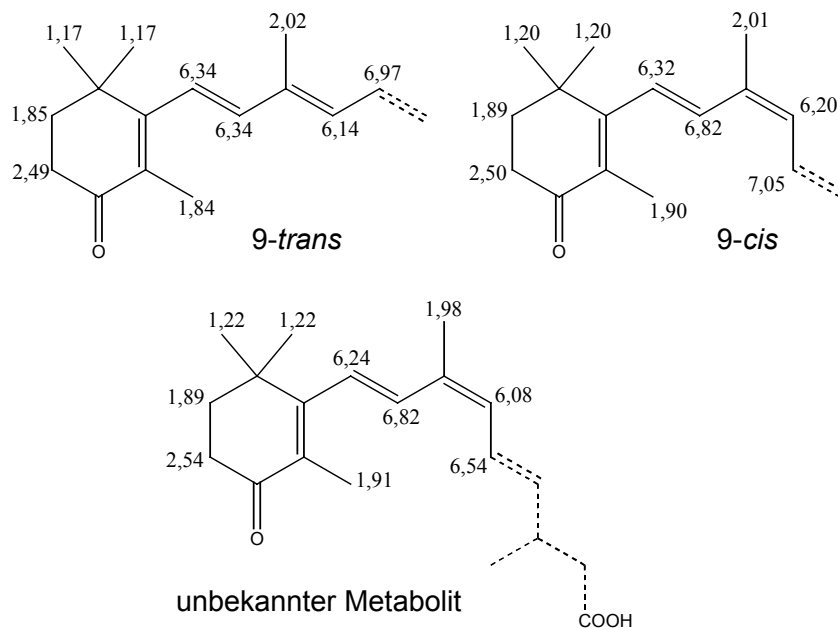
$\delta = 6.08$  ppm, nämlich das Proton an C-10 (11 Hz). Eine 15-Hz-Kopplung findet sich in dem Signal bei  $\delta = 5.70$  ppm wieder. Verglichen mit den publizierten Daten ist diese chemische Verschiebung sehr charakteristisch für das olefinische Proton an C-14 (**Tab. 4-2**). Laut den publizierten Spektren wäre aber für ein Proton an C-14 bei benachbarter Carboxy-Gruppierung nur ein Singulett zu erwarten. Bei Retinol-Strukturen würde man ein Triplett mit einer 7 Hz-Kopplung erwarten, bei Retinal-Strukturen zwei eng beieinanderliegende Dubletts mit einer Kopplung von 8 Hz. Das Signal bei  $\delta = 5.70$  ppm zeigt ein Dublett eines Dubletts mit einer 8 Hz- und einer 15-Hz-Kopplung. Die Integralhöhe des Signals deutet auf ein einzelnes Proton hin, wodurch eine Retinal-Struktur (zwei Dubletts und 2 Protonen) ausgeschlossen werden kann. Die chemisch sehr unterschiedlichen Kopplungskonstanten von 8 und 15 Hz lassen auf zwei magnetisch nicht-äquivalente Protonen schließen. In Retinol-Strukturen sind die Protonen an C-15 aber chemisch äquivalent. Gemäß den publizierten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren würde man in diesem Fall ein Dublett im Bereich von  $\delta$  3.9 bis 4.7 ppm (C-15, 2H) erwarten, das im Spektrum nicht auffindbar ist. Die gefundene Signalaufspaltung läßt sich anhand des in **Abb. 4-11**. gemachten Strukturvorschlags, bei dem die Doppelbindung zwischen C-13 und C-14 hydriert ist, erklären. Das Signal bei  $\delta = 5.70$  kann demnach dem Proton an C-12 zugeordnet werden. Die 15-Hz-Kopplung resultiert aus der Kopplung mit dem Proton an C-11, die 8-Hz-Kopplung aus der Kopplung mit dem Proton an C-13. Dieses Kopplungsmuster und die entsprechenden chemischen Verschiebungen ähneln dem in der Literatur beschriebenen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 9-*cis*-13,14-dihydro-Retinsäure (26) (**Tab. 4-2**).

Weitere charakteristische Merkmale des Spektrums sind die Signale der Protonen der Methylgruppen. Die sehr eng beieinander liegenden Singuletts (6H) bei  $\delta = 1.22$  ppm stammt aller Wahrscheinlichkeit nach von den Methylprotonen an C-16 und C-17. Die Signale bei  $\delta = 1.98$  ppm (s, 3H) und 1.91 ppm (s, 3H) stammen ebenfalls von Methylprotonen (an C-19 und C-18). Das Signal der Methylgruppe an C-20 kann bei  $\delta = 1.15$  ppm (d, 3H,  $J = 7$  Hz) aufgefunden werden. Das Dublett resultiert aus der Kopplung mit dem Proton an C-13. Auch diese Kopplung und chemische Verschiebung ähneln dem in der Literatur beschriebenen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 9-*cis*-13,14-dihydro-Retinsäure (26) (**Tab. 4-2**).

Die Protonen des Rings finden sich bei  $\delta = 1,89$  ppm (t, 2H,  $J = 7$  Hz) und 2,54 ppm (t, 2H,  $J = 7$ Hz). Diese chemischen Verschiebungen sind charakteristisch für 4-oxo-Strukturen (vgl. **Tab. 4-2**).



In **Abb. 4-12.** sind die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektraldaten von 9-*cis*-4-oxo-Retinsäure, all-*trans*-4-oxo-Retinsäure und des unbekanntem Metaboliten gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der Daten des unbekanntem Metaboliten mit denen der 9-*cis*-4-oxo-Retinsäure. Insbesondere die große Differenz der chemischen Verschiebungen der Protonen an C-7 und C-8 sind hier charakteristisch (vgl. **Tab. 4-2.**).



**Abb. 4-12.** Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektraldaten (chemische Verschiebungen in ppm) wichtiger Strukturelemente des unbekanntem Metaboliten mit denen von all-*trans*-4-oxo-Retinsäure und 9-*cis*-4-oxo-Retinsäure .

## 4.5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Charakterisierung des unbekanntem Metaboliten können wie folgt zusammengefasst werden. UV-, MS-Fragment- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen Retinoid-charakteristische Signale; die vorliegenden Untersuchungsergebnisse können eine Vielzahl von möglichen Strukturen eindeutig ausschließen.

Ausgeschlossen werden können:

- 3-OH-, 4-OH- oder 18-OH-Retinsäuren (Abschnitt 4.1)
- *Retro*-Retinoide (Abschnitt 4.2)
- 5,6-epoxy-Retinsäuren (Abschnitt 4.2)
- 16-OH-Retinsäuren (Abschnitt 4.4)
- alle in **Tab. 4-2.** aufgeführten Retinoide (Abschnitt 4.4)
- photocyclisierte Strukturen und Strukturen mit 11-*cis*-Konfiguration (Abschnitt 4.4)

Anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ist es möglich, einen Strukturvorschlag zu machen (vgl. **Abb. 4-11**). Demnach handelt es sich bei dem unbekanntes Metaboliten mit großer Wahrscheinlichkeit um 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure. Diese Struktur wird durch die Ergebnisse der übrigen Untersuchungen befürwortet.

9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure hat ein Molekulargewicht von 316 und weist keine allylisch stehende Hydroxy-Gruppierung auf. In der Massenspektrometrie (positiver Modus) ist daher ein Primärmolekül-Ion von  $m/z = 317$  sehr wahrscheinlich.

Bei der Untersuchung der Isomerisierung in Abschnitt 4.1 fällt auf, daß bei dem unbekanntes Metaboliten nach Bestrahlung mit Tageslicht jeweils nur ein Peak beobachtet wird, wohingegen die Bestrahlung der OH-Retinsäuren zu drei und mehr Peaks führt. Dieses Phänomen kann über eine hydrierte Doppelbindung in dem unbekanntes Molekül erklärt werden. Durch die Hydrierung einer Doppelbindung ist die Zahl der möglichen *cis-trans*-Isomere reduziert.

Die pH-Abhängigkeit der Retentionszeit des zu identifizierenden Retinoids im chromatographischen System (Abschnitt 4.1), die jener von 13-*cis*-4-OH-Retinsäure ähnelt, ergibt sich aus der Existenz der Carbonsäure-Gruppierung in der Verbindung.

Das UV-Spektrum der unbekanntes Verbindung zeigt das für 4-oxo-Retinoide typische Nebenmaximum. Das Absorptionsmaximum bei 335 nm (5 konjugierte Doppelbindungen) steht in Einklang mit den Maxima von all-*trans*-4-oxo-Retinsäure bei 362 nm (7 konjugierte Doppelbindungen) und von all-*trans*-4-oxo-Retinol bei 355 nm (6 konjugierte Doppelbindungen) (vgl. Abschnitt 4.2).

Die Ähnlichkeit des  $\text{MS}^3$ -Fragmentspektrums der unbekanntes Verbindung mit Fragmentenspektren der OH-Retinsäuren läßt die vorgeschlagene Struktur zunächst als unwahrscheinlich erscheinen (vgl. Abschnitt 4.3). Betrachtet man die MS/MS-Fragmentenspektren der eher strukturverwandten all-*trans*-4-oxo-Retinsäure oder 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (**Abb. 3-20**), stellt man fest, daß die auftretenden Hauptfragmente ( $m/z = 315 \rightarrow m/z = 297+279$ ) aus einer einfachen bzw. zweifachen Wasserabspaltung resultieren. Auch bei der unbekanntes Substanz resultieren die Hauptfragmente aus einer einfachen bzw. zweifachen Wasserabspaltung ( $\text{MS}^3$ ,  $m/z = 317 \rightarrow m/z = 299 \rightarrow m/z = 281$ ).

9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure weist ein Asymmetriezentrum an C-13 auf. Prinzipiell sind daher zwei Enantiomere möglich.

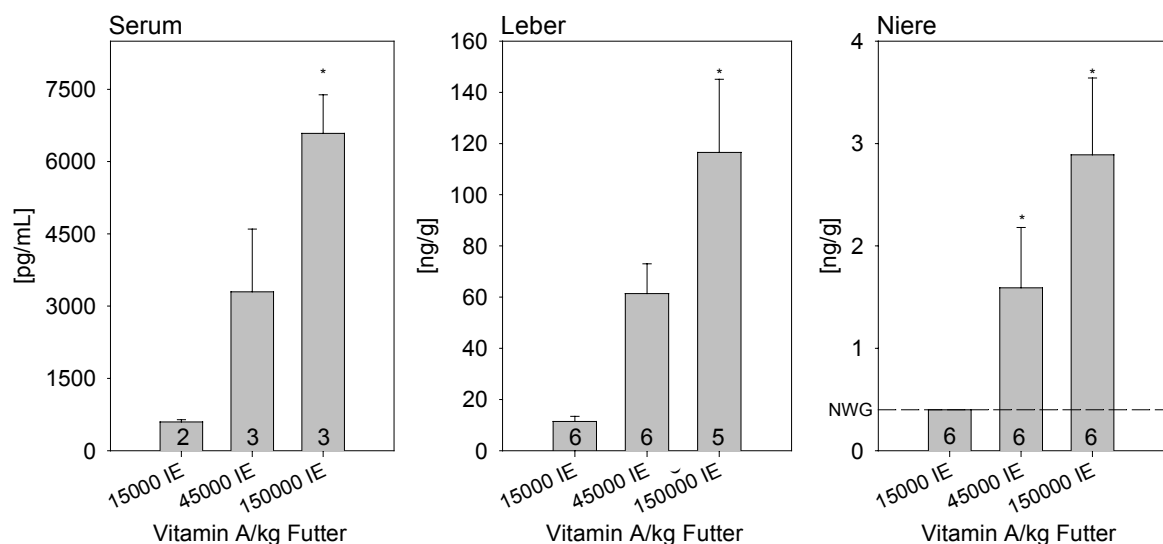
Um konkretere Aussagen über die Struktur des unbekanntes Retinoids treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen, wie  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, zweidimensionale NMR-Spektroskopie (z. B. H-Relayed-(H,H)-COSY- und H-Relayed-(H,C)-COSY-Experimente), IR-Spektroskopie und Polarimetrie herangezogen werden. Im Falle einer kristallinen Substanz könnte eine Röntgenstruktur-Analyse zur vollständigen Strukturaufklärung beitragen. Zur Durchführung dieser Analyse-Methoden werden allerdings nach heutigem Stand der Technik analytische Mengen im (unteren) mg-Bereich benötigt, die im Rahmen dieser Untersuchungen nicht verfügbar waren.

Für einen abschließenden Beweis bedarf es einer ausreichenden Menge an 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure, die über eine (asymmetrische) Synthese erhältlich wäre. Eine Übereinstimmung der hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse mit analogen Untersuchungen an dem Syntheseprodukt würde dann die vorgeschlagene Struktur letztendlich bestätigen. Zur Strukturaufklärung bezüglich der Enantiomere bietet sich schließlich eine chirale HPLC-Trennung an.

## 5 Endogene Retinoid-Spiegel und ihre Beeinflussung durch TCDD

### 5.1 Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A in Mäusen - eine subchronische Exposition mit Retinylpalmitat

Diese Studie wurde durchgeführt, um den Einfluß der täglichen Vitamin-A-Aufnahme auf die endogenen Retinoid-Gehalte zu untersuchen. NMRI-Mäuse wurden während einer Eingewöhnungsphase zunächst mit einem Standard-Nagetierfutter (15.000 IE Vitamin A/kg Futter; 1 IE  $\equiv$  0,3  $\mu$ g all-*trans*-Retinol; Vitamin A als Retinylpalmitat) gefüttert. Die Mäuse wurden dann in drei Gruppen zu je 6 Mäusen aufgeteilt und schließlich für 14 Tage *ad libitum* mit Nagetierfutter unterschiedlicher Vitamin-A-Gehalte gefüttert (15.000 IE, 45.000 IE und 150.000 IE/kg Futter). Die Autopsie erfolgte am 15. Tag nach Beginn der Exposition um die Mittagszeit (Abschnitt E-27). Bezogen auf die tägliche Aufnahme ergeben sich Retinylpalmitat-Expositionen von 1.900, 5.700 und 19.000 IE/kg Körpergewicht und Tag, wenn davon ausgegangen wird, daß eine Maus mit einem Gewicht von 31 g in etwa 4 g Futter pro Tag frißt (260). Die Gewebe-Proben wurden jeweils als Einfachbestimmung pro Probe mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Routine-Methodik analysiert (vgl. Abschnitt 3.7). Die Analyse der polaren Retinoide in den Serum-Proben erfolgte nach Poolen von je zwei Proben mit der in Abschnitt E-22 beschriebenen LC-DAD-APCI-MS-Kopplung (vgl. Abschnitt 3.9.2 und **Abb. 3-23.** bis **Abb. 3-26.**). Die quantitative Auswertung erfolgte über die DAD-Spur.



**Abb. 5-1.** Vergleich der Gehalte des neuentdeckten Metaboliten (vermutlich: 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure) in Serum, Leber und Niere nach subchronischer Exposition (*ad libitum*, 14 Tage Fütterungsdauer) von weiblichen NMRI-Mäusen mit Nagetierfutter unterschiedlicher Retinylpalmitat-Gehalte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrolle mit  $p < 0.05$  (vgl. Abschnitt E-27), die Zahlen in den Balken entsprechen jeweils der Zahl  $n$  der gemessenen Proben, NWG: Nachweisgrenze).

**Tab. 5-1.** Retinoid-Gehalte<sup>#</sup> in Serum und Geweben weiblicher NMRI-Mäuse nach Fütterung unterschiedlicher Vitamin A-Mengen

	Vitamin A (Retinylpalmitat)/kg Futter		
	15.000 IE (I)	45.000 IE (II)	150.000 IE (III)
<b>Retinylester<sup>§</sup></b>			
Serum [nmol/mL] <sup>⊙⊙</sup>	<sup>c</sup> 0,35 ± 0,14	<sup>c</sup> 0,96 ± 0,19*	<sup>c</sup> 1,39 ± 0,25*
Leber [μmol/g] <sup>⊙</sup>	<sup>a</sup> 4,19 ± 0,53	<sup>a</sup> 7,73 ± 1,45*	<sup>b</sup> 16,8 ± 1,9* <sup>+</sup>
Niere [nmol/g] <sup>⊙⊙</sup>	<sup>a</sup> 0,80 ± 0,17	<sup>a</sup> 1,80 ± 0,63*	<sup>a</sup> 2,37 ± 0,83*
Gehirn [nmol/g]	<sup>b</sup> 0,52 ± 0,30	<sup>a</sup> 0,51 ± 0,40	<sup>b</sup> 0,44 ± 0,22
<b>Retinol</b>			
Serum [μg/mL] <sup>⊙⊙⊙</sup>	<sup>c</sup> 0,17 ± 0,01	<sup>c</sup> 0,19 ± 0,04	<sup>c</sup> 0,25 ± 0,03*
Leber [μg/g] <sup>⊙⊙</sup>	<sup>a</sup> 11,0 ± 1,3	<sup>a</sup> 23,6 ± 17,6	<sup>b</sup> 37,1 ± 17,6*
Niere [μg/g] <sup>⊙⊙</sup>	<sup>a</sup> 0,41 ± 0,04	<sup>a</sup> 0,62 ± 0,14*	<sup>a</sup> 0,79 ± 0,13*
Gehirn [μg/g]	<sup>b</sup> 0,65 ± 0,44	<sup>a</sup> 0,59 ± 0,48	<sup>b</sup> 0,81 ± 0,42
<b>neuentdeckter Metabolit</b>			
<b>(9-<i>cis</i>-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure)</b>			
Serum [ng/mL] <sup>⊙⊙</sup>	<sup>d</sup> 0,60 ± 0,05	<sup>c</sup> 3,30 ± 1,30	<sup>c</sup> 6,59 ± 0,80* <sup>+</sup>
Leber [ng/g] <sup>⊙</sup>	<sup>a</sup> 11,4 ± 2,0	<sup>a</sup> 61,4 ± 11,6	<sup>b</sup> 117 ± 29*
Niere [ng/g] <sup>⊙</sup>	<sup>a</sup> < NWG <sup>§</sup>	<sup>a</sup> 1,59 ± 0,59*	<sup>a</sup> 2,89 ± 0,75* <sup>+</sup>
<b>all-<i>trans</i>-Retinsäure</b>			
Serum [ng/mL] <sup>⊙⊙⊙</sup>	<sup>d</sup> 1,08 ± 0,33	<sup>c</sup> 0,67 ± 0,15	<sup>c</sup> 0,48 ± 0,06*
Leber [ng/g]	<sup>a</sup> 5,55 ± 1,78	<sup>a</sup> 4,68 ± 1,63	<sup>b</sup> 7,55 ± 4,68
Niere [ng/g] <sup>⊙</sup>	<sup>a</sup> 2,37 ± 0,95	<sup>a</sup> 1,25 ± 0,20*	<sup>a</sup> 0,65 ± 0,18* <sup>+</sup>
Gehirn [ng/g] <sup>⊙⊙⊙</sup>	<sup>b</sup> 1,60 ± 0,27	<sup>a</sup> 1,47 ± 0,36	<sup>b</sup> 1,02 ± 0,11*
<b>13-<i>cis</i>-Retinsäure<sup>§§</sup></b>			
Serum [ng/mL]	<sup>d</sup> 0,32 ± 0,14	<sup>c</sup> 0,42 ± 0,15	<sup>c</sup> 0,38 ± 0,14
Leber [ng/g]	<sup>a</sup> 1,22 ± 0,17	<sup>a</sup> 1,41 ± 0,39	<sup>b</sup> 1,48 ± 0,84
Niere [ng/g]	<sup>a</sup> 0,66 ± 0,15	<sup>a</sup> 0,56 ± 0,12	<sup>a</sup> 0,62 ± 0,18

<sup>#</sup> Mittelwerte ± Standardabweichung; <sup>§</sup> Summe von Retinylinoleat, Retinyleoleat, Retinylpalmitat und Retinylstearat

<sup>§§</sup> Koelution mit 9,13-*di-cis*-Retinsäure; <sup>§</sup> NWG: Nachweisgrenze

<sup>⊙</sup> p < 0,001, <sup>⊙⊙</sup> p < 0,01, <sup>⊙⊙⊙</sup> p < 0,05, signifikant unterschiedlich (*One Way ANOVA Test*)

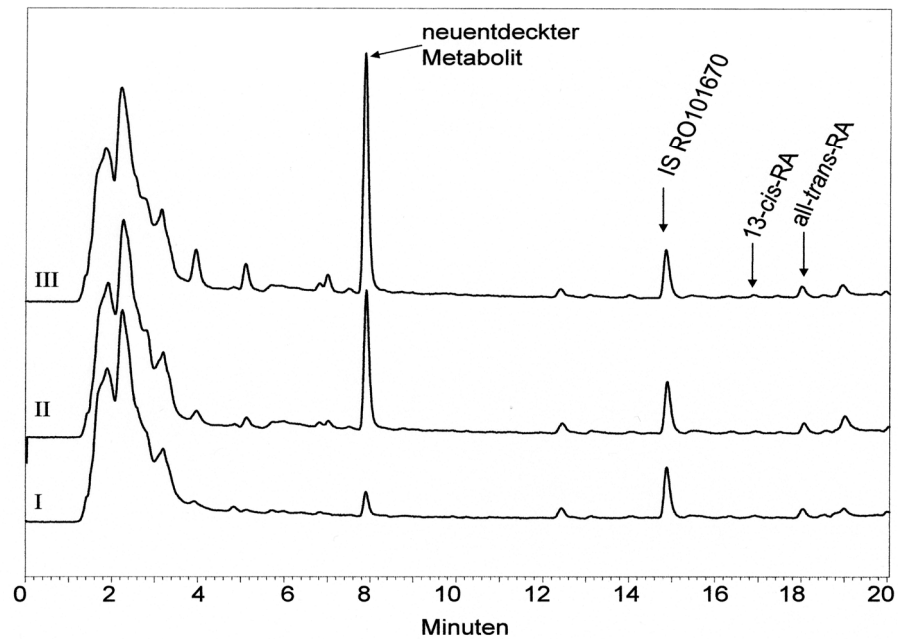
\* p < 0,05, signifikant unterschiedlich (vgl. Abschnitt E-27) von Gruppe I (15.000 IE/kg Futter)

<sup>+</sup> p < 0,05, signifikant unterschiedlich (vgl. Abschnitt E-27) von Gruppe II (45.000 IE/kg Futter)

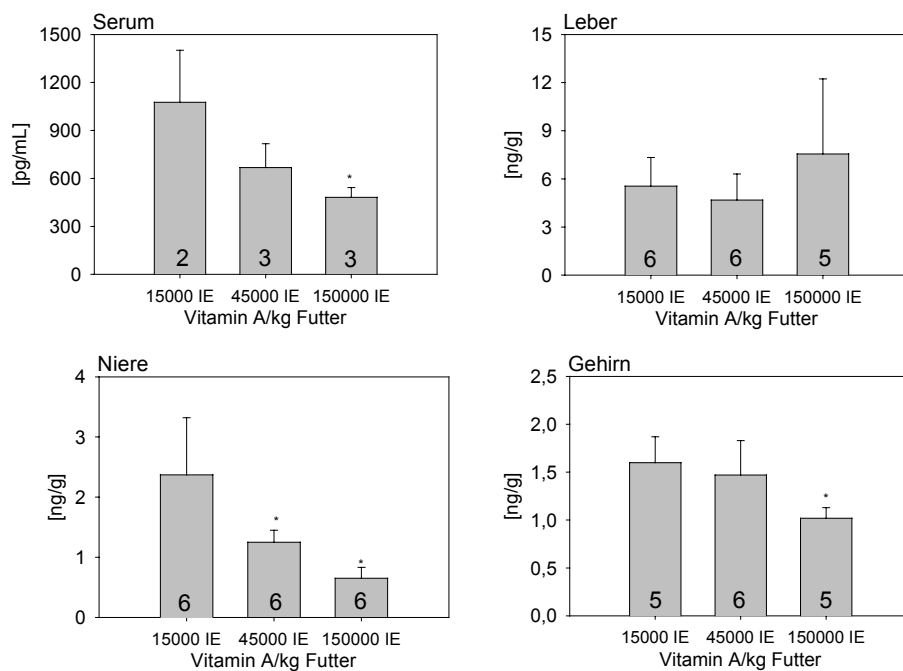
<sup>a</sup> n = 6 ; <sup>b</sup> n = 5 ; <sup>c</sup> n = 3 ; <sup>d</sup> n = 2

## Ergebnisse

Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Tab. 5-1.**, **Abb. 5-1.** und **Abb. 5-3.** dargestellt. Auffällig ist der deutliche Anstieg der Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten (wahrscheinlich 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure, vgl. Abschnitt 4) in Serum, Leber und Niere nach erhöhter Exposition mit Retinylpalmitat über das Futter (**Abb. 5-1.**). Eine dreimal höhere Exposition führt in jedem untersuchten Gewebe zu einer vier- bis sechsfachen Steigerung der Spiegel. Eine weitere, zusätzliche ca. dreifache Steigerung der Exposition führt dagegen nur noch zu einer ein- bis zweifachen Erhöhung der Gehalte dieses Retinoids (**Abb. 5-2.** und **Abb. 4-1.**).

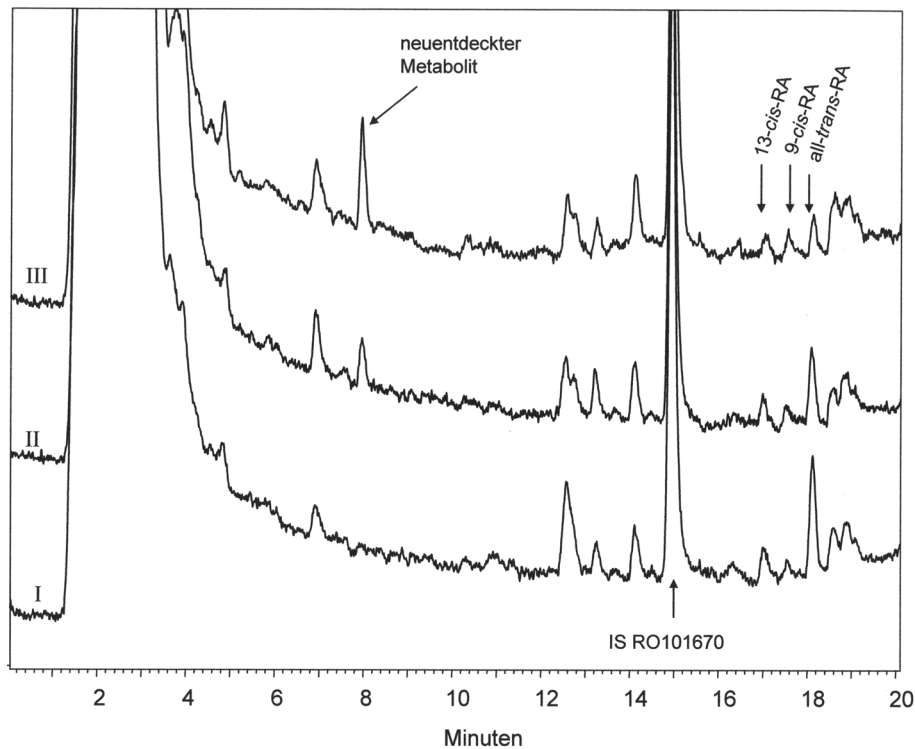


**Abb. 5-2.** Chromatogramme (polare Retinoide) von Leber-Proben von weiblichen NMRI-Mäusen nach subchronischer Exposition mit Nagetierfutter unterschiedlicher Retinylpalmitat-Gehalte (*ad libitum*, 14 Tage Fütterungsdauer, I: 15.000 IE/kg Futter, II: 45.000 IE/kg Futter, III: 150.000 IE/kg Futter). Die Messungen erfolgten entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-14).



**Abb. 5-3.** Vergleich der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in Serum, Leber, Niere und Gehirn nach subchronischer Exposition (*ad libitum*, 14 Tage Fütterungsdauer) von weiblichen NMRI-Mäusen mit Nagetierfutter unterschiedlicher Retinylpalmitat-Gehalte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrolle mit  $p < 0.05$  (vgl. Abschnitt E-27), die Zahlen in den Balken entsprechen jeweils der Zahl  $n$  der gemessenen Proben, NWG: Nachweisgrenze).

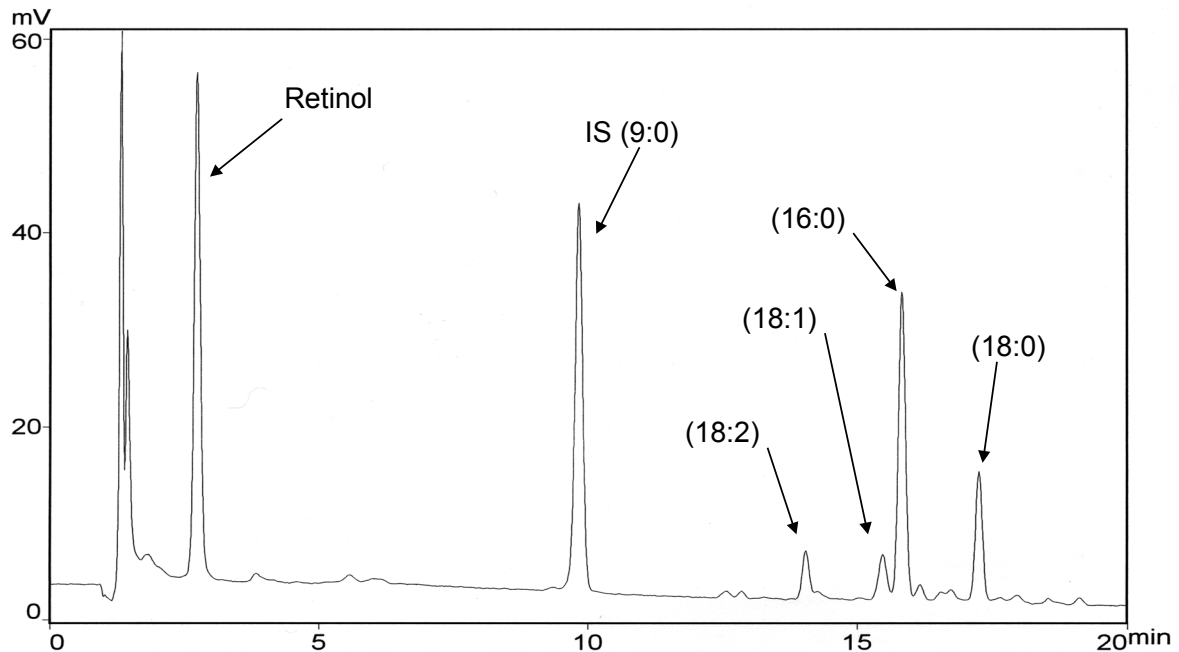
In Gehirn-Proben konnte der neuentdeckte Metabolit in keiner Gruppe detektiert werden. All-*trans*-Retinsäure-Spiegel (**Abb. 5-3.**) sind bei erhöhter Exposition mit Retinylpalmitat in Serum, Niere und Gehirn signifikant verringert. Besonders deutlich ist dieser Effekt in der Niere (**Abb. 5-4.**). Eine zehnfache Erhöhung des Vitamin-A-Gehaltes im Futter führt bei subchronischer Exposition zu einer Verringerung der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in der Niere auf ein Viertel und im Serum auf die Hälfte des Vergleichswertes.



**Abb. 5-4.** Chromatogramme (polare Retinoide) von Nieren-Proben von weiblichen NMRI-Mäusen nach subchronischer Exposition mit Nagetierfutter unterschiedlicher Retinylpalmitat-Gehalte (*ad libitum*, 14 Tage Fütterungsdauer, I: 15.000 IE/kg Futter, II: 45.000 IE/kg Futter, III: 150.000 IE/kg Futter). Die Messungen erfolgten entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-14).

In Serum, Niere und Leber konnten geringe Gehalte an 13-*cis*-Retinsäure (und/oder 9,13-*di-cis*-Retinsäure) detektiert werden, die bei erhöhter Exposition mit Retinylpalmitat keine signifikanten Änderungen aufwiesen (**Tab. 5-1.**, vgl. Abschnitt 3.9.2 und **Abb. 3-23.**). Mittels MS-Kopplung konnten in Serum-Proben geringe Mengen 13-*cis*-4-*oxo*-Retinsäure detektiert werden, die in der DAD-Spur kaum sichtbar waren (Abschnitt 3.9.2, **Abb. 3-23.** und **Abb. 3-24.**). Die Gehalte lagen unter 0,2 ng/mL (Nachweisgrenze) und es waren keine Änderungen nach erhöhter Exposition mit Retinylpalmitat wahrnehmbar. In den Chromatogrammen von Nieren-Proben ist ein kleiner Peak im Retentionsbereich von 9-*cis*-Retinsäure erkennbar (**Abb. 5-4.**). Die erhaltene Fläche entspricht einer Konzentration knapp unterhalb

der Nachweisgrenze (0,4 ng/g). Auch in Gehirn-, Leber- und Serum-Proben findet sich in einigen Proben ein Signal vergleichbarer Größe, das von 9-*cis*-Retinsäure herrühren kann.



**Abb. 5-5.** Chromatogramm (unpolare Retinoide) einer Serum-Probe einer weiblichen NMRI-Maus nach subchronischer Exposition mit Retinylpalmitat über das Futter (*ad libitum*, 14 Tage Fütterungsdauer, 45.000 IE/kg Futter). Die Messungen erfolgten entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-12).

In Serum, Leber und Niere führt eine steigende Exposition mit Retinylpalmitat zu einem Anstieg der Retinol- und Retinylester-Gehalte (vgl. **Tab. 5-1.**). Die Niere enthält jeweils nur ca. 0,02 % der Menge an Retinylestern, die in der Leber gefunden werden. Eine zehnfache Erhöhung des Vitamin-A-Gehaltes im Futter führt bei subchronischer Exposition zu einer Erhöhung der Retinol-Spiegel in der Leber um das Dreifache und im Serum um das Andert-halb-fache. Die Spiegel der unpolaren Retinoide im Gehirn weisen jeweils starke Schwankungen auf und es ist keine signifikante Änderung der Spiegel nach Exposition mit höheren Retinylpalmitat-Gehalten erkennbar.

### Diskussion

Da die Leber den wichtigsten Vitamin-A-Speicherort des Körpers darstellt, hat eine erhöhte Vitamin-A-Zufuhr erwartungsgemäß zu erhöhten hepatischen Spiegeln an Retinylestern und Retinol geführt. Extrahepatische Gewebe spielen eine wichtige Rolle in der Speicherung und Mobilisierung von Retinol. Es wird vermutet, daß diese lokalen Retinol-Speicher zur Vorbeugung von lokalen Mangelzuständen dienen und dazu beitragen, einen gesunden



Zustand der Gewebe sicherzustellen (9). Daher sind die erhöhten Gehalte an Retinylestern und Retinol in der Niere bei einer erhöhten Vitamin-A-Aufnahme nicht überraschend.

In der Literatur finden sich nur zwei Berichte über physiologische Retinsäure-Gehalte in Plasma und Geweben von Mäusen. *McPhillips et al.* schätzten die Gehalte an all-*trans*-Retinsäure im Plasma (B6D2F1 Mäuse) auf 2–6 ng/mL (261). *Satre et al.* fanden all-*trans*-Retinsäure-Gehalte von  $3,9 \pm 1,7$  ng/mL im Serum von ICR Mäusen (262). *Heyman et al.* beschrieben in der Leber 9-*cis*-Retinsäure-Gehalte von 4 ng/g und in der Niere von 30 ng/g. Die all-*trans*-Retinsäure-Gehalte in denselben Proben lagen im Bereich von 8-12 ng/g in der Leber und 60-90 ng/g in der Niere (36). Verglichen mit den publizierten Retinsäure-Spiegeln in der Maus liegen die Gehalte in der hier vorgestellten Fütterungsstudie deutlich niedriger (**Tab. 5-1.**). Insbesondere die publizierten renalen Gehalte an 9-*cis*-Retinsäure können nicht nachvollzogen werden, da sie 100mal höher liegen als die im Rahmen dieser Studie gemessenen Konzentrationen. Auch das Verhältnis von all-*trans*-Retinsäure- zu 9-*cis*-Retinsäure-Gehalten unterscheidet sich deutlich von den Ergebnissen nach *Heyman et al.* (36). Während bei *Heyman et al.* die all-*trans*-Retinsäure-Gehalte etwa zwei- bis dreimal höher lagen als diejenigen von 9-*cis*-Retinsäure, zeigt sich in der hier vorgestellten Fütterungsstudie für Mäuse, die mit dem Standard-Futter gefüttert wurden, ein im Vergleich mindestens 6-14mal höherer all-*trans*-Retinsäure-Gehalt.

Eine wichtige Erkenntnis dieser Fütterungsstudie ist die signifikante Reduktion der all-*trans*-Retinsäure-Gehalte in Niere, Gehirn und Serum nach erhöhter subchronischer Vitamin-A-Aufnahme. Frühere Studien, bei denen trächtige Mäuse einer einmaligen akuten oralen Exposition einer hohen (pharmakologischen) Dosis Retinol oder Retinylacetat ausgesetzt waren, zeigen grundsätzlich einen beträchtlichen Anstieg der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel im Plasma (163,169,263-265). Der in der Literatur beschriebene Dosisbereich liegt zwischen 33.300 IE und 666.000 IE Vitamin A pro kg Körpergewicht und liegt damit deutlich höher als die hier untersuchten Dosen.

*Eckhoff et al.* (163) zeigten, daß die Bildung von all-*trans*-Retinsäure nach einer all-*trans*-Retinol-Dosis von 33.300 IE/kg Körpergewicht ( $C_{\max}$ : 6 ng all-*trans*-Retinsäure/mL Plasma) deutlich niedriger als ein Zehntel derjenigen ist, die nach einer zehnfach höheren Dosis erhalten wird ( $C_{\max}$ : 600 ng/mL Plasma). Dieser Befund läßt bei hohen Dosierungen eine akute Sättigung des Systems vermuten, bei der einerseits über einen Mangel an freien Bindungsstellen an Retinoid-bindenden Proteinen der freie Anteil der Substanz erhöht und andererseits die Kapazität metabolisierender Enzyme begrenzt sein kann. Zudem kann es zu einer Sättigung aktiver Transportprozesse kommen. Aufgrund der deutlich geringeren akuten

Expositionen im Rahmen dieser Studie, bei denen die Mäuse *ad libitum* gefüttert wurden, ist eine Sättigung des Systems unwahrscheinlich. Daher ist im Rahmen dieser Studie ein deutlich geringerer Retinsäure-Anstieg als in den Experimenten nach Exposition mit einer hohen Dosis zu erwarten.

Die festgestellte Reduktion von all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln in Serum, Niere und Gehirn nach subchronischer Exposition mit Retinylpalmitat läßt sich über eine Autoinduktion durch all-*trans*-Retinsäure erklären. All-*trans*-Retinsäure induziert selbst ihre metabolischen Enzyme, was auf konstante all-*trans*-Retinsäure-Spiegel abzielt (8,20,22,27,31,48). Es ist möglich, daß nach einer ersten Exposition mit Retinylpalmitat größere Mengen an all-*trans*-Retinsäure gebildet werden, die dann bei mehrfacher Exposition über eine Autoinduktion des all-*trans*-Retinsäure-Metabolismus quasi ausgeglichen werden. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien an verschiedenen Spezies, in denen eine wiederholte Applikation von all-*trans*-Retinsäure im Vergleich zu einer einmaligen Dosis zu geringeren AUC-Plasma-Konzentrationen von all-*trans*-Retinsäure führt (266-275). *Leo et al.* zeigten, daß in Leber-Mikrosomen von Ratten, die für zwei bis drei Wochen mit einem 100fachen Überschuß Retinylacetat gefüttert wurden, der Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure zu polareren Metaboliten, wie 4-OH- und 4-oxo-Retinsäuren erhöht ist (276). Die Expression von CYP26, einem Enzym, das all-*trans*-Retinsäure in OH- und oxo-Metaboliten umwandeln kann, war in Lebern von Ratten nach längerer Applikation von Vitamin A induziert (20,277). Es ist daher denkbar, daß das entsprechende Enzymsystem im Rahmen einer subchronischen Exposition im sich einstellenden Fließgleichgewicht (*steady state*) etwas zu weit hochreguliert ist und zu geringfügig niedrigeren all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln führt. Subendogene all-*trans*-Retinsäure-Spiegel wurden zeitweise auch im Verlauf der Plasmakinetik beim Menschen nach Verzehr einer Lebermahlzeit beobachtet (24,278).

Neben all-*trans*-Retinsäure konnten im Rahmen dieser Fütterungsstudie folgende polare Retinoid-Metaboliten detektiert werden: 13-*cis*-Retinsäure (und/oder 9,13-di-*cis*-Retinsäure), und der in Abschnitt 4 behandelte neuentdeckte Metabolit (vermutlich 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure). Daneben sind geringe Mengen von 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure (im Serum) und eventuell von 9-*cis*-Retinsäure wahrnehmbar. Dieses Metaboliten-Muster nach subchronischer Exposition unterscheidet sich damit deutlich von demjenigen nach einer einmaligen Exposition mit einer pharmakologischen (hohen) Dosis von Vitamin A. Die in Mäusen dominierenden polaren Retinoid-Metaboliten nach einer hohen Dosierung mit Vitamin A sind -neben all-*trans*-Retinsäure- all-*trans*-4-oxo-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure (163). Ein Grund für diesen Unterschied mag die erwähnte Sättigung des Systems bei hohen Dosierungen sein. Im Falle einer Sättigung ist es möglich, daß neben der Metabolisierung von



Da Phytansäure aufgrund ihrer Methylgruppe in  $\beta$ -Stellung einer für Fettsäuren üblichen  $\beta$ -Oxidation nicht zugänglich ist, muß zunächst eine  $\alpha$ -Oxidation mit Kettenverkürzung zur Pristansäure vollzogen werden, bevor ein Abbau der Fettsäure durch  $\beta$ -Oxidation stattfinden kann (**Abb. 5-6.**) (279,280).

Oxidative Decarboxylierung und  $\beta$ -oxidative Kettenverkürzung sind metabolische Prozesse, die für all-*trans*-Retinoide seit langem bekannt sind (29). Bei Ratten, die mit [ $14\text{-}^{14}\text{C}$ ]-all-*trans*-Retinol behandelt wurden, wurden 5 % des  $^{14}\text{C}$  in der Atemluft festgestellt (281). Bei intravenöser Gabe von [ $15\text{-}^{14}\text{C}$ ]-all-*trans*-Retinsäure an Ratten, tauchten 35 % der Radioaktivität als ausgeatmetes  $^{14}\text{CO}_2$  innerhalb der ersten 48 Stunden in der Atemluft auf (282). Nach einer pharmakologischen Dosis von all-*trans*-Retinsäure wurden im Urin von Ratten Metaboliten mit einer verkürzten oder einer teilweise hydrierten Seitenkette identifiziert (vgl. **Abb. 2-3.**) (29). Interessanterweise zeigen alle diese Strukturen eine Keto-Gruppe am C4 des Cyclohexenyl-Rings. Der in Abschnitt 4 gemachte Strukturvorschlag von „9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure“ ist damit vor dem Hintergrund bisheriger Studien plausibel.

Zur Klärung der biologischen Aktivität einer 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure bedarf es genauerer Bindungs- und Transaktivierungs-Studien. Publierte Studien zeigen, daß 9-*cis*-4-oxo-Retinsäure ein Ligand für RARs und RXRs ist, wenn auch mit zum Teil geringeren Affinitäten als 9-*cis*-Retinsäure (47). Interessanterweise ist 9-*cis*-4-oxo-Retinsäure aber ein effektiver Retinoid-Metabolit hinsichtlich einer Störung der Achsenbildung in der Embryonalentwicklung des *Xenopus* (Krallenfrosch). Der Wirkmechanismus beruht vermutlich auf einer synergistischen Aktivierung von RARs und RXRs in RAR/RXR-Heterodimeren (47). Ohne genaueres Datenmaterial zu zeigen, berichteten Shirley *et al.* von Bindungs- und Transaktivierungs-Studien, nach denen 9-*cis*-13,14-dihydro-Retinsäure deutlich geringere biologische Aktivitäten aufweist als 9-*cis*-Retinsäure (< 1 %) (26). Sie vermuten, daß die Reduktion der Doppelbindung zwischen C13 und C14 einen wichtigen Mechanismus zur Inaktivierung von 9-*cis*-Retinsäure darstellt. Interessanterweise resultiert die Reduktion einer Doppelbindung in der Seitenkette von all-*trans*-Retinsäure ebenfalls in einer verminderten biologischen Aktivität (283,284). Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Erkenntnisse ist es wahrscheinlich, daß eine 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure das Resultat einer *in-vivo*-Inaktivierung von 9-*cis*-4-oxo-Retinsäure bzw. 9-*cis*-Retinsäure ist und einen ersten Teilschritt in Richtung  $\beta$ -Oxidation darstellt.

## 5.2 Untersuchungen des Retinoid-Metaboliten-Musters in humanen Lebern und humanem Plasma

Um Informationen über physiologische Retinoid-Spiegel im Menschen zu erhalten, wurden sechs Leber-Proben und einige Plasma-Proben (Abschnitt E-28) mit der in dieser Arbeit entwickelten Routine-Methodik vermessen (vgl. Abschnitt 3.7, Einfachbestimmung pro Probe). Zudem sollte anhand dieser Studie überprüft werden, ob der neuentdeckte Metabolit für den Humanbereich relevant ist. Die Ergebnisse sind in **Tab. 5-2.** und **Tab. 5-3.** dargestellt.

*Leber-Proben.* Der in den Mäusen neuentdeckte Metabolit konnte in einer von sechs humanen Lebern detektiert werden (**Abb. 5-7.**). Interessanterweise handelt es sich dabei um diejenige Probe, die den geringsten all-*trans*-Retinsäure- und vergleichsweise hohe Retinylester-Spiegel aufweist. Dieser Sachverhalt ist damit mit der oben beschriebenen Maus-Fütterungsstudie vergleichbar, in der bei niedrigeren all-*trans*-Retinsäure- und höheren Retinylester-Spiegeln höhere Gehalte des neuentdeckten Metaboliten gefunden werden (Abschnitt 5.1). Auffällig sind die hohen hepatischen all-*trans*-Retinsäure-Spiegel, wofür in der Literatur keine Referenz-Werte existieren. Die Gesamt-Vitamin-A-Gehalte (Retinylester und Retinol) in der Leber von erwachsenen Probanden liegen im Mittel bei  $83,0 \pm 46,9 \mu\text{g}$  Retinol/g Gewebe. Dieser Wert stimmt gut mit bereits von *Raica et al.* publizierten Konzentrationen überein, die Gehalte von  $149 \pm 132 \mu\text{g/g}$  Gewebe beschreiben (285).

**Tab. 5-2.** Retinoid-Gehalte in humanen Leber-Proben.

	Leber					
	I	II	III	IV	V	VI
Geschlecht <sup>§</sup>	m	m	m	w	w	w
Alter [Jahre]	61	11 Mt.*	50	55	54	51
Gewicht [kg]	68,5	11,8	59,3	68,0	81,2	59,0
Retinol [ $\mu\text{g/g}$ ]	0,98	0,99	1,11	1,38	1,35	0,45
Retinylester <sup>+</sup> [nmol/g]	500	812	352	331	88,8	160
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA [ng/g]	2,09	n.d.	überlagert	0,62	n.d.	n.d.
neuentdeckter Metabolit [ng/g]	10,3	n.d.	überlagert	n.d.	n.d.	n.d.
13- <i>cis</i> -RA <sup>#</sup> [ng/g]	1,02	1,29	1,22	1,97	1,52	1,33
9- <i>cis</i> -RA [ng/g]	0,59	0,59	0,61	0,51	0,42	0,94
all- <i>trans</i> -RA [ng/g]	7,51	22,5	28,7	18,1	9,95	14,8

<sup>§</sup> m: männlich; w: weiblich

\* Mt.: Monate

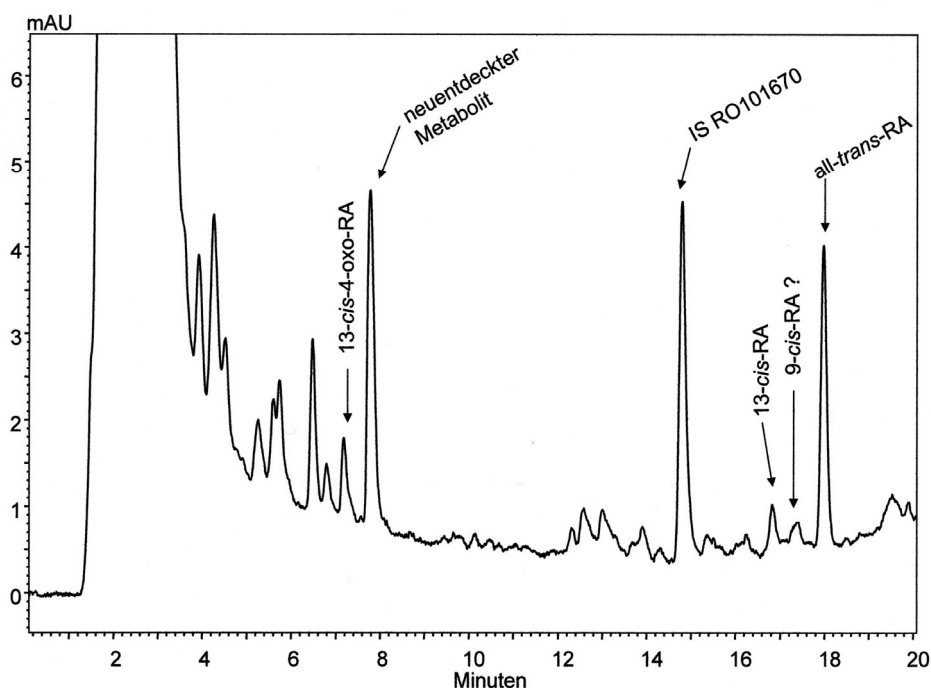
<sup>+</sup> Summe von Retinylinoleat, Retinyloleat, Retinylpalmitat und Retinylstearat

<sup>§</sup> n.d.: nicht detektierbar

<sup>#</sup> Koelution mit 9,13-di-*cis*-Retinsäure

In jeder Probe fand sich ein kleiner mit 9-*cis*-Retinsäure koelulierender Peak. Es stellt sich die Frage, ob die vergleichsweise kleinen Konzentrationen aus einer Isomerisierung von all-*trans*-

Retinsäure während der Analyse resultieren oder ob sie tatsächlich physiologischer Natur sind. Entsprechend den Validierungsergebnissen der Analyse-methode (Abschnitt 3.7.7) ist davon auszugehen, daß Gehalte an *cis*-Isomeren von mehr als 5 % der *all-trans*-Form endogenen Ursprungs sind. Die gemessenen 9-*cis*-Retinsäure-Spiegel liegen mit einem Gehalt von 2 bis 8 % der *all-trans*-Form im Entscheidungsgrenzbereich. Da zudem eine geringfügige Isomerisierung während Lagerung und Transport des Gewebes nicht ausgeschlossen werden kann, kann die Frage nach dem physiologischen Ursprung der gefundenen 9-*cis*-Retinsäure-Spiegel nicht abschließend beantwortet werden.

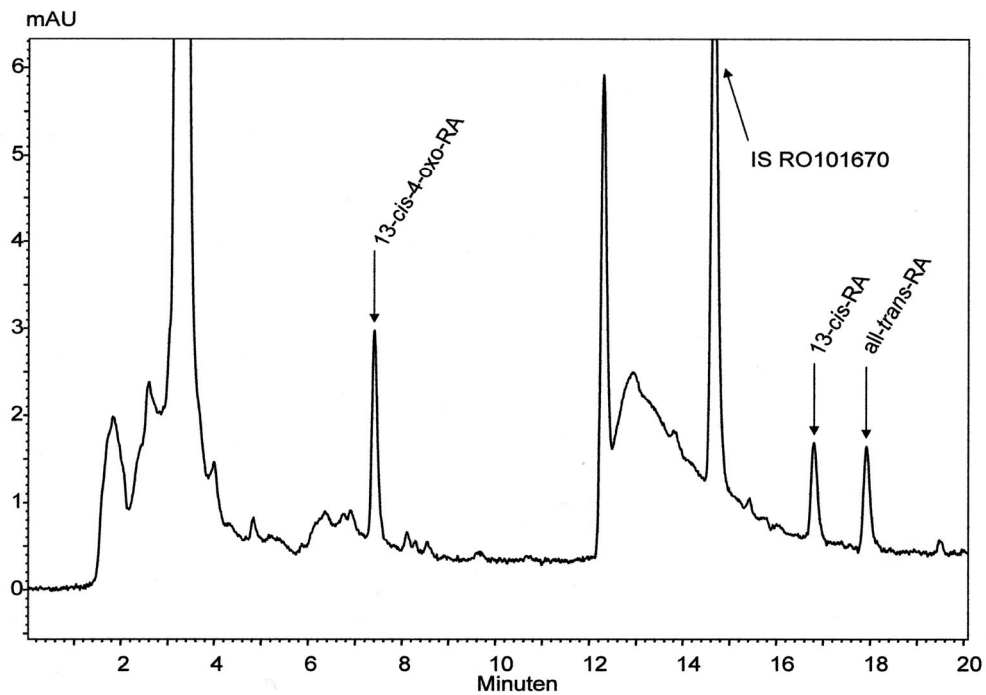


**Abb. 5-7.** Chromatogramm einer humanen Leber-Probe (Probe I, polare Retinoide). Die Messung erfolgte entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-14).

**Plasma-Proben.** Die analysierten humanen Plasma-Proben enthielten quantifizierbare Mengen an Retinol, Retinylestern sowie die polaren Metaboliten 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure und *all-trans*-Retinsäure (**Tab. 5-3.** und **Abb. 5-8.**). Der neuentdeckte Metabolit und 9-*cis*-Retinsäure konnten in keiner der Proben detektiert werden. Die Ergebnisse sind gut mit bereits publizierten Retinoid-Spiegeln in Humanplasma vergleichbar (108,118,286-288). Zwischen männlichen und weiblichen Probanden kann hinsichtlich der Retinoid-Spiegel kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (*t*-Test;  $P = 95\%$ ).

**Tab. 5-3.** Retinoid-Gehalte<sup>#</sup> in Humanplasma weiblicher und männlicher Probanden.

	Humanplasma (Alter: 40-60 Jahre)	
	männlich <sup>§</sup>	weiblich <sup>§§</sup>
Retinylester <sup>§</sup> [pmol/mL]	78,4 ± 22,3	61,3 ± 38,9
Retinol [ng/mL]	980 ± 108	857 ± 219
13- <i>cis</i> -4-oxo-Retinsäure [ng/mL]	2,44 ± 1,77	1,17 ± 0,58
13- <i>cis</i> -Retinsäure* [ng/mL]	1,80 ± 0,97	1,25 ± 0,57
all- <i>trans</i> -Retinsäure [ng/mL]	1,39 ± 0,30	1,24 ± 0,27

<sup>#</sup> Mittelwerte ± Standardabweichung<sup>§</sup> n = 9; <sup>§§</sup> n = 7<sup>§</sup> Summe von Retinylinoat, Retinyloleat, Retinylpalmitat und Retinylstearat\* Koelution mit 9,13-di-*cis*-Retinsäure, gemäß *Arnold et al.* in Humanplasma endogen nur 13-*cis*-Retinsäure (286)**Abb. 5-8.** Chromatogramm einer Humanplasma-Probe (männlich, polare Retinoide). Die Messung erfolgte entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-14).

### 5.3 Untersuchungen zum Einfluß von TCDD auf den Metabolismus von Vitamin A in der Ratte

Diese Studie wurde durchgeführt, um den Einfluß von TCDD auf die endogenen Retinoid-Spiegel in ausgewachsenen männlichen Ratten zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren dabei die Konzentrationen der polaren Retinoide. Es wurde ein kombiniertes Experiment zur Zeit- und Dosisabhängigkeit durchgeführt (Abschnitt E-29). In dem Experiment zur Zeitabhängigkeit erhielten männliche Sprague-Dawley-Ratten jeweils einmalig eine orale Dosis von 0 oder 10 µg TCDD/kg Körpergewicht. Sie wurden 1, 3 oder 28 Tage nach der Applikation getötet. Sprague-Dawley-Ratten in dem Experiment zur Dosisabhängigkeit wurden jeweils einmalig einer oralen Dosis von 0, 0.1, 1.0, 10 oder 100 µg/kg ausgesetzt und schließlich an Tag 3 nach der Exposition getötet. Entnommene Gewebe (Niere und Leber) und Serum wurden schließlich mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Routine-Methodik analysiert (Abschnitt 3.7, Einfachbestimmung pro Probe). Zur Unterscheidung von 13-*cis*-Retinsäure und 9,13-di-*cis*-Retinsäure im Serum wurden einige Proben mit den entwickelten 1-mm-HPLC-Methoden gemessen (Abschnitt 3.8.2). Informationen über Retinoid-Glukuronid-Spiegel in der Leber wurden mit der indirekten Bestimmungsmethode mit  $\beta$ -Glukuronidase erhalten (Abschnitt 3.8.1, Einfachbestimmung pro Probe).

#### Ergebnisse

Bei der Studie zur Zeitabhängigkeit zeigte sich bei TCDD-behandelten Ratten bis zum dritten Tag nach der Exposition eine signifikante Zunahme der all-*trans*-Retinsäure-Konzentrationen in Niere, Leber und Serum, die auch am Tag 28 nach Behandlung noch signifikant erhöht waren (**Tab. 5-5.**, **Abb. 5-9.**). Dieser Anstieg war dosisabhängig (**Tab. 5-4.**, **Abb. 5-9.**). Weiterhin wurden in den Studien zur Zeitabhängigkeit und Dosisabhängigkeit im Serum TCDD-belasteter Ratten verminderte 13-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Konzentrationen (Koelution) beobachtet (**Tab. 5-4.**, **Tab. 5-5.**, **Abb. 5-10.**). Da mit der Routine-Methodik nicht zwischen diesen beiden Stereoisomeren unterschieden werden kann, wurden Reste der Serum-Proben gruppenweise vereint und qualitativ mit den Ergänzungsmethoden nach Abschnitt 3.8.2 unter Verwendung von 1-mm-HPLC-Säulen untersucht. Die Proben wurden dabei mit drei verschiedenen chromatographischen Systemen untersucht, in denen verschiedene stationäre und mobile Phasen Verwendung fanden. Obwohl die Selektivität der Methoden gegenüber Matrixkomponenten nicht optimal ist, konnte nach einer TCDD-Exposition in allen drei Systemen die Abnahme eines mit 9,13-di-*cis*-Retinsäure koeludierenden Peaks beobachtet werden (**Abb. 5-11.**). Die Messungen zeigen zudem, daß es sich bei dem in der Routine-Methodik detektierten Peak fast ausschließlich um 9,13-di-*cis*-Retinsäure handelt.



**Tab. 5-4.** Retinoid-Spiegel in Serum, Leber und Niere männlicher Sprague-Dawley-Ratten 3 Tage nach der Exposition mit unterschiedlichen Dosen von TCDD (Studie zur Dosisabhängigkeit).<sup>a</sup>

	TCDD-Dosis (in µg/kg Körpergewicht)			
	0	0.1	1.0	10
<b>Retinylester<sup>c</sup> (nmol/g Gewebe, pmol/ml Serum)</b>				
Leber <sup>#</sup>	196 ± 16	222 ± 23	189 ± 17	152 ± 8*
Niere <sup>###</sup>	39.5 ± 6.8	41.4 ± 11.7	57.8 ± 15.5	58.2 ± 13.8
Serum	63.0 ± 10.9	§65.8 ± 11.0	§65.4 ± 3.9	54.6 ± 9.9
<b>Retinol (µg/g Gewebe, µg/ml Serum)</b>				
Leber	2.01 ± 0.14	2.02 ± 0.16	1.94 ± 0.17	1.83 ± 0.26
Niere	11.8 ± 1.3	11.3 ± 0.9	11.2 ± 0.7	12.9 ± 1.8
Serum <sup>##</sup>	0.57 ± 0.06	§0.57 ± 0.02	§0.62 ± 0.06	0.65 ± 0.09
<b>All-trans-Retinsäure (ng/g Gewebe, ng/ml Serum)</b>				
Leber <sup>#</sup>	5.33 ± 0.95	§5.56 ± 1.02	6.67 ± 0.94	12.9 ± 2.3*
Niere <sup>#</sup>	4.18 ± 0.63	5.66 ± 1.14	5.40 ± 1.46	11.1 ± 1.7**
Serum <sup>#</sup>	0.69 ± 0.06	§0.76 ± 0.03	§0.84 ± 0.13	1.37 ± 0.12*
<b>9,13-di-cis-Retinsäure/13-cis-Retinsäure (ng/ml Serum)</b>				
Serum <sup>#</sup>	0.47 ± 0.10	§0.20 ± 0.04*	§0.17 ± 0.03*	0.23 ± 0.06*
<b>neuentdeckter Metabolit; vermutlich: 9-cis-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure (ng/g Gewebe)</b>				
Leber <sup>#</sup>	3.30 ± 0.23	§2.50 ± 0.43*	0.71 ± 0.29*	n. d. <sup>b</sup>

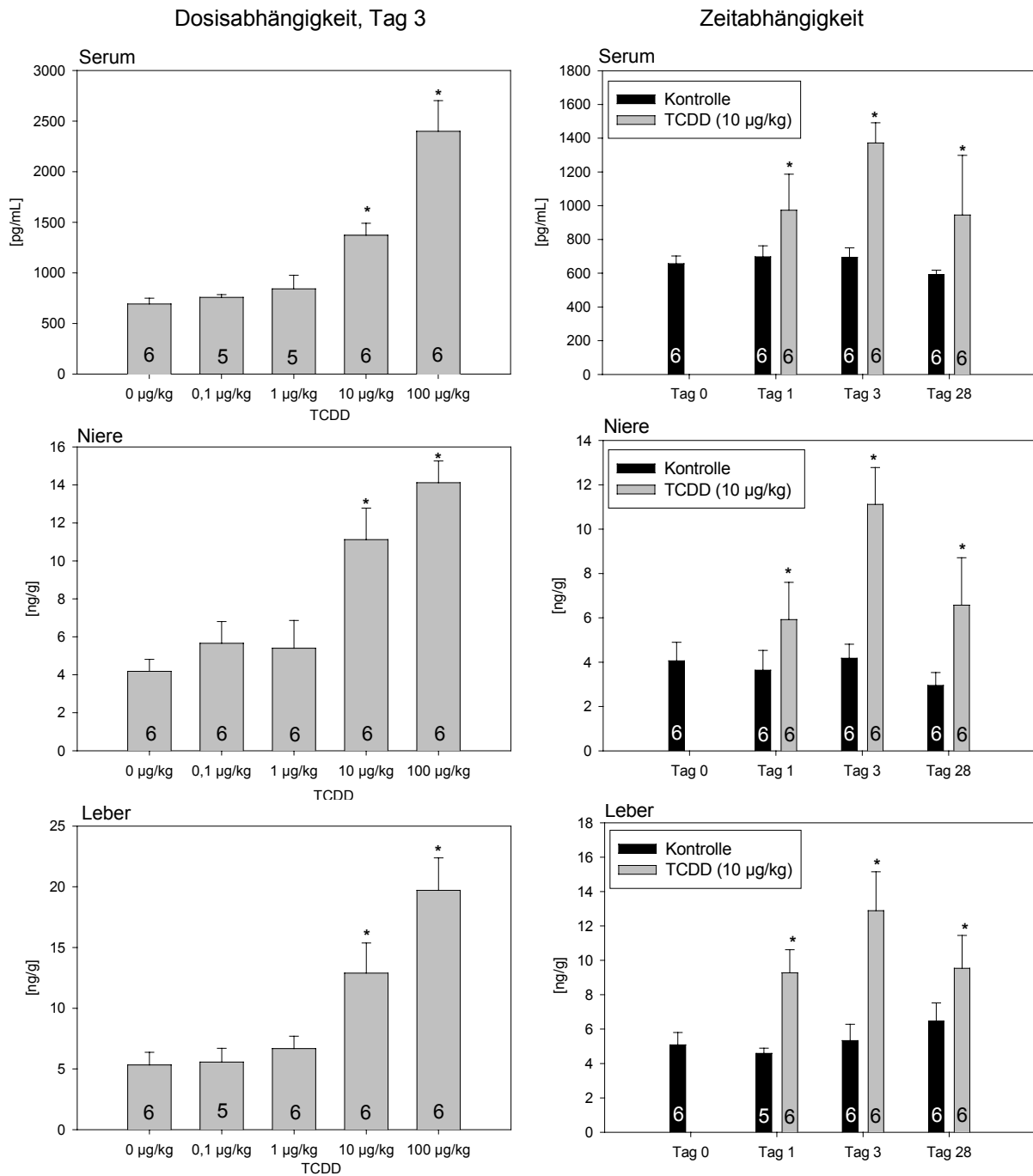
<sup>a</sup> Mittelwerte ± Standardabweichung ( $n = 6$ ); <sup>§</sup> ( $n = 5$ )

<sup>b</sup> n. d.: nicht detektierbar; <sup>c</sup> Summe von Retinylinoleat, Retinylpalmitat, Retinylstearat und Retinylstearat

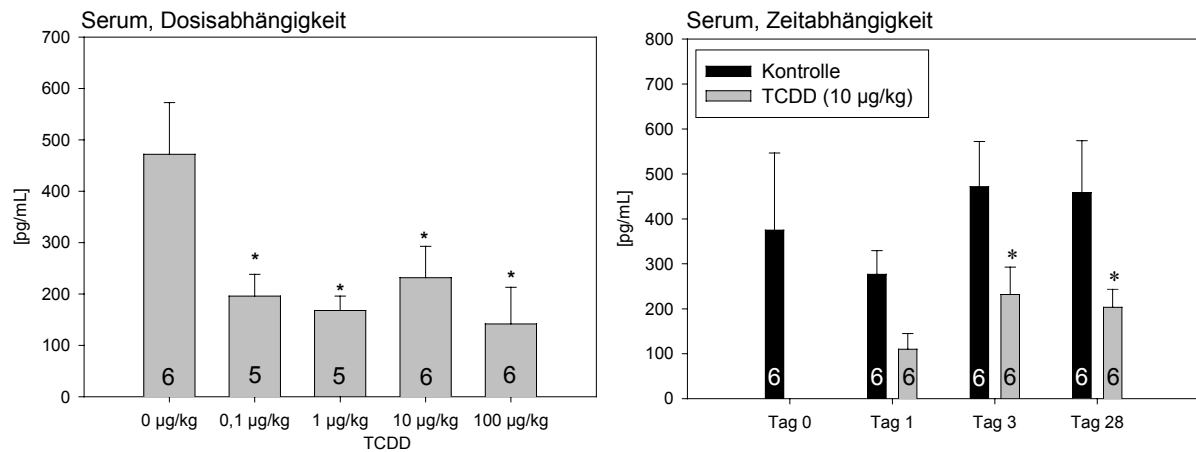
<sup>#</sup>  $p < 0.001$ , <sup>##</sup>  $p < 0.01$ , <sup>###</sup>  $p < 0.001$ ; gemäß ANOVA Test statistisch signifikanter Unterschied (siehe Abschnitt E-29)

\*  $p < 0.05$ ; signifikant unterschiedlich von der Kontrolle (Tukey oder Dunnett Test bzw. Dunn's Test, siehe Abschnitt E-29)

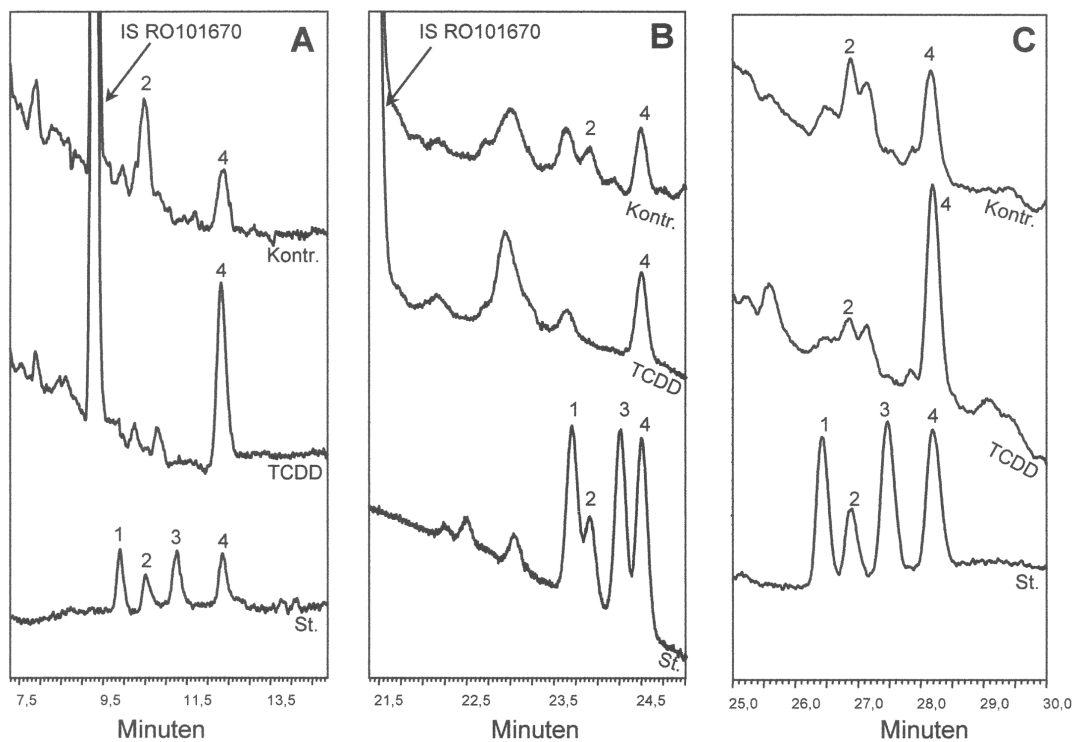




**Abb. 5-9.** Dosis- und Zeitabhängigkeit der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in Serum, Niere und Leber von männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach Exposition mit TCDD (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrolle mit  $p < 0.05$ , die Zahlen in den Balken entsprechen jeweils der Zahl  $n$  der gemessenen Proben).

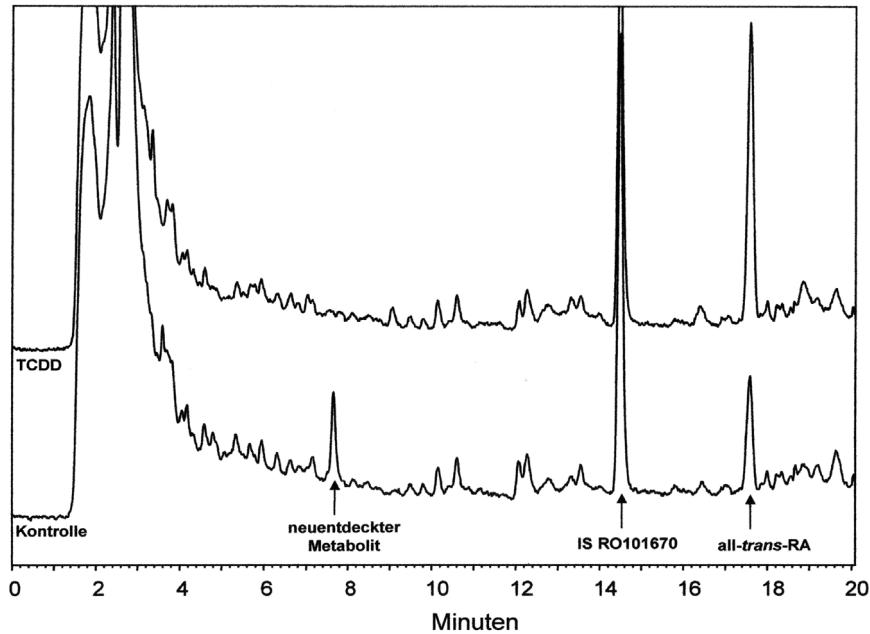


**Abb. 5-10.** Dosis- und Zeitabhängigkeit der 13-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Serum von männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach Exposition mit TCDD. Da 13-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinsäure innerhalb des verwendeten HPLC-Systems koeluiieren, stehen die Balken für die Summe beider Stereoisomere, abgeleitet aus der Kalibration mit 13-*cis*-Retinsäure. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrolle mit  $p < 0.05$ , die Zahlen in den Balken entsprechen jeweils der Zahl  $n$  der gemessenen Proben).

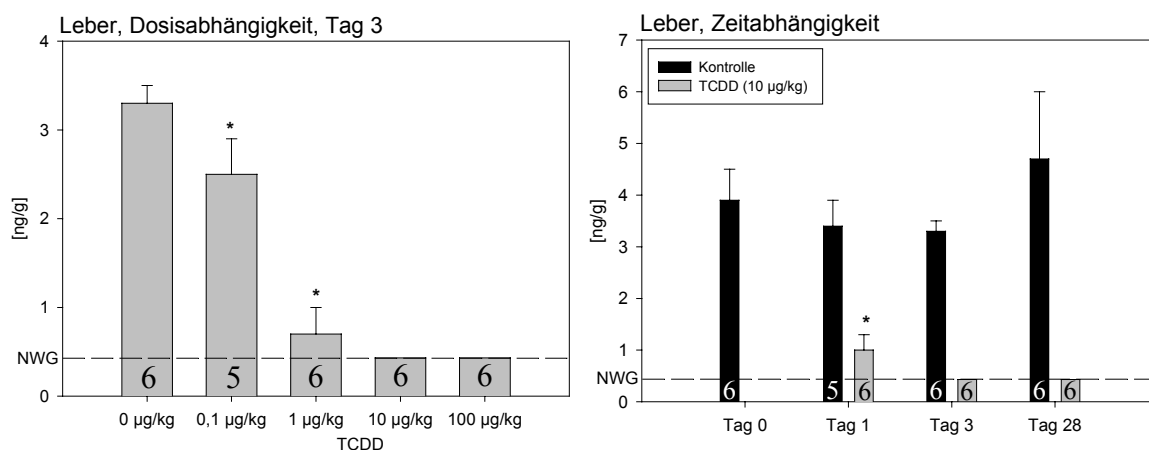


**Abb. 5-11.** Chromatogramme von Serum-Proben unter Verwendung von 1-mm-Säulen. Vergleich eines Standards (St.) von 13-*cis*-Retinsäure (1); 9,13-di-*cis*-Retinsäure (2); 9-*cis*-Retinsäure (3) und all-*trans*-Retinsäure (4) mit den den Extrakten von vereinten Serum-Proben am Tag 3 nach Exposition (Kontrolle (Kontr.) und TCDD). Die Chromatogramme wurden mit drei verschiedenen chromatographischen Systemen erhalten (vgl. Abschnitt E-17). **A:** Chromatogramme nach Methode A (Kontrolle 0 µg/kg TCDD; TCDD: 100 µg/kg); **B:** Chromatogramme nach Methode B (Kontrolle 0 µg/kg TCDD; TCDD: 1 µg/kg); **C:** Chromatogramme nach Methode C (Kontrolle 0 µg/kg TCDD; TCDD: 10 µg/kg).

In den Leber-Proben konnte der neuentdeckte Metabolit (Abschnitt 4) detektiert werden. Dieses Retinoid wurde stark durch die TCDD-Belastung beeinflusst (**Abb. 5-12.**). Schon die kleinste Dosierung von 0,1 µg/kg Körpergewicht führte zu signifikant niedrigeren hepatischen Spiegeln (**Abb. 5-13.**). Auch in der Studie zur Zeitabhängigkeit waren die entsprechenden Gehalte zu jedem Zeitpunkt signifikant verringert.



**Abb. 5-12.** Chromatogramme von Leber-Proben von Ratten, die oral mit TCDD (10 µg/kg Körpergewicht) oder Maiskeimöl (Kontrolle) behandelt wurden (Tag 3, polare Retinoide). Die Messungen erfolgten entsprechend der Routine-Methodik (Abschnitt E-14).



**Abb. 5-13.** Dosis- und Zeitabhängigkeit der Spiegel des neuentdeckten Metaboliten (vermutlich: 9-cis-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure) in der Leber von männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach Exposition mit TCDD. Da für den neuentdeckten Metaboliten kein Standard zur Verfügung stand, erfolgte die Berechnung der Konzentrationen näherungsweise über die Kalibrierung von 13-cis-4-OH-Retinsäure (Mittelwerte ± Standardabweichung, \* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrolle mit  $p < 0.05$ , die Zahlen in den Balken entsprechen jeweils der Zahl  $n$  der gemessenen Proben, NWG: Nachweisgrenze).

Untersuchungen an Lebern von Kontrolltieren und TCDD-behandelten Ratten mit und ohne  $\beta$ -Glukuronidase-Behandlung der Proben erbrachten keine nachweisbaren Konzentrationen eines glukuronidierten Retinoids (**Tab. 5-6.**).

**Tab. 5-6.** Hepatische Retinoid-Spiegel in männlichen Sprague-Dawley-Ratten 3 Tage nach Exposition mit TCDD mit und ohne Glukuronidase-Behandlung.<sup>a</sup>

	Kontrolle (0 $\mu\text{g/kg KG}^{\text{d}}$ )		TCDD (10 $\mu\text{g/kg KG}$ )	
	Kontrolle	$\beta$ -Glukuronidase	Kontrolle	$\beta$ -Glukuronidase
Retinylester <sup>c</sup> (nmol/g)	192 $\pm$ 15	188 $\pm$ 22	155 $\pm$ 13	153 $\pm$ 10
Retinol ( $\mu\text{g/g}$ )	1.84 $\pm$ 0.25	1.88 $\pm$ 0.16	2.04 $\pm$ 0.20	1.89 $\pm$ 0.29
All- <i>trans</i> -Retinsäure (ng/g)	5.43 $\pm$ 0.70	5.41 $\pm$ 0.84	12.4 $\pm$ 1.3	12.3 $\pm$ 1.3
neuentdeckter Metabolit <sup>e</sup> (ng/g)	3.12 $\pm$ 0.59	3.11 $\pm$ 0.56	n. d. <sup>b</sup>	n. d. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ); <sup>b</sup> n. d.: nicht detektierbar

<sup>c</sup> Summe von Retinylinoalat, Retinylpalmitat, Retinyloleat und Retinylstearat; <sup>d</sup> KG: Körpergewicht

<sup>e</sup> vermutlich: 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure

Hinsichtlich der Retinol- und Retinylester-Spiegel (Retinylinoalat, Retinylpalmitat, Retinyloleat und Retinylstearat) bestätigen die Studien zur Zeit- und Dosisabhängigkeit den bekannten Einfluß von TCDD (vgl. Abschnitt 2.3.2, **Tab. 5-4.**, **Tab. 5-5.**). Hepatische Retinylester-Spiegel waren nach einer TCDD-Exposition dosis- und zeitabhängig verringert, renale Spiegel dagegen in der Studie zur Zeitabhängigkeit an Tag 28 nach TCDD-Exposition signifikant erhöht. Retinylester-Spiegel im Serum blieben nach der TCDD-Exposition unverändert. In der Studie zur Dosisabhängigkeit blieben Retinol-Gehalte in Serum, Niere und Leber überwiegend unbeeinflusst mit einer Ausnahme: Retinol-Spiegel waren im Serum der Gruppe mit der höchsten Dosierung (100  $\mu\text{g/kg}$ ) signifikant erhöht. In der Studie zur Zeitabhängigkeit waren hepatische Retinol-Spiegel an Tag 28 infolge einer TCDD-Exposition signifikant verringert.

## Diskussion

Die gemessenen all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in Leber, Niere und Serum unbelasteter Ratten sind mit denen früherer Studien vergleichbar (46,88,107,289,290). Auch die Serum-Konzentrationen von 9,13-di-*cis*-Retinsäure sind mit Angaben in der Literatur vergleichbar, bei denen der gefundene Peak allerdings der koeluierten 13-*cis*-Retinsäure zugeordnet wurde (289). Die vorliegende Studie zeigt erstmals die Existenz endogener 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Serum von Ratten auf. Die von *Okuno et al.* beschriebenen hepatischen 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel von ca. 30 ng/g können nicht nachvollzogen werden (46). Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhaltenen Chromatogramme unbelasteter Tiere zeigen nur einen Peakansatz und liegen damit unterhalb der Nachweisgrenze von etwa 0,2 ng/g. Die Proben enthielten keine quantifizierbaren Mengen an 9-*cis*-Retinsäure, so daß eventuell vorhandene

Gehalte ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze lagen (0,4 ng/g Gewebe bzw. 0,2 ng/mL Serum).

TCDD verursacht eine dosisabhängige Zunahme der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in Leber, Niere und Serum. In der Studie zur Zeitabhängigkeit zeigen die renalen und hepatischen all-*trans*-Retinsäure-Gehalte sowie die Konzentrationen im Serum identische Verläufe (**Abb. 5-9**). Es stellt sich die Frage, wie TCDD in Leber, Niere und Serum erhöhte all-*trans*-Retinsäure-Spiegel hervorrufen kann, während die Retinylester-Vorräte in der Leber ab- und in der Niere zunehmen. Es ist bekannt, daß der Retinsäure-Bedarf in Leber und Niere aus einer Kombination von *in-situ*-Synthese und Extraktion aus dem Serum gedeckt wird (31). Untersuchungen des Eintrags von all-*trans*-Retinsäure aus dem Plasma in die Gewebe ergaben, daß Leber und Niere 78 % bzw. 33 % ihrer im Gewebe enthaltenen all-*trans*-Retinsäure aus der Zirkulation entnehmen (107). Deshalb spiegeln die ähnlichen Zeitverläufe nach TCDD-Exposition wahrscheinlich teilweise die Extraktion aus dem Plasma wieder und der eigentliche Ursprung des allgemeinen all-*trans*-Retinsäure-Anstiegs kann nicht lokalisiert werden.

#### *Enzym-Induktion durch TCDD und der Metabolismus von all-trans-Retinsäure*

TCDD induziert die Expression zahlreicher Gene, die Fremdstoff-metabolisierende Enzyme wie z. B. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, Aldehyd-3-Dehydrogenase und UDP-Glukuronosyltransferase (UGT1A1) kodieren (62,63). Eine solche Enzym-Induktion kann auch Konsequenzen für den Phase-I- und Phase-II-Metabolismus von Retinoiden haben und zu einem beschleunigten Abbau von Retinol führen. Diese Hypothese wird durch zahlreiche Studien unterstützt. In Ratten, die mit TCDD behandelt wurden, waren die Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Abnahme von hepatischen Retinylester-Spiegeln und für die CYP1A1/1A2-Induktion vergleichbar (84,291). In Knock-Out-Mäusen mit ausgeschaltetem Ah-Rezeptor waren die Gehalte an all-*trans*-Retinsäure, Retinol und Retinylestern zwei- bis dreifach erhöht (92). Wiederholt wurde infolge einer TCDD-Belastung eine erhöhte Ausscheidung von zuvor verabreichtem isopenmarkierten Vitamin A beobachtet (93,292). Endogene Konzentrationen von all-*trans*-Retinsäure werden über ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Biosynthese (I) und Metabolismus (II) reguliert (7). Eine Störung dieses Gleichgewichts könnte zu höheren all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln führen, wenn der Biosynthese-Weg (d. h. Retinol zu all-*trans*-Retinsäure) stärker induziert wäre als der Abbauweg (Oxidation, Isomerisierung oder Glukuronidierung von all-*trans*-Retinsäure).

*(I) Biosynthese von all-trans-Retinsäure.* Die Umwandlung von all-*trans*-Retinol in all-*trans*-Retinsäure umfaßt zwei aufeinanderfolgende Oxidationsreaktionen mit all-*trans*-Retinal als

Zwischenprodukt (7). Zahlreiche Studien (vornehmlich *in vitro*) haben die Existenz einer großen Anzahl unterschiedlicher Enzyme aufgezeigt, die eine Oxidation von Retinol katalysieren können. Dazu gehören Mitglieder der zytosolischen (ADHs) und/oder mikrosomalen Alkoholdehydrogenasen (ADHs bzw. SDRs) (20,30). Beide Enzymsysteme unterscheiden sich deutlich in ihren Substrateigenschaften. ADHs bevorzugen ungebundenes Retinol, während SDRs an CRBP-I gebundenes Retinol vorziehen (7,30). In der Literatur herrscht Uneinigkeit darüber, welche der möglichen Enzym-Familien *in vivo* relevant ist (8,22,27,30,31). Da CRBP-I-Konzentrationen diejenigen von all-*trans*-Retinol übertreffen, glaubt man, daß der größte Teil des im Gewebe enthaltenen Retinols an CRBP-I gebunden vorliegt (31). *Napoli et al.* vermuten, daß Retinol durch SDRs metabolisiert wird und daß es durch die Bindung an CRBP-I vor einem unkontrollierten Abbau durch verschiedene Leberenzyme wie ADHs und mikrosomale Cytochrom-P450s geschützt wird, die „freies“ Retinol in polare Metaboliten umwandeln können (8,22,27,31). *Duester et al.* favorisieren hingegen zytosolische Alkohol-dehydrogenasen (ADHs) und vermuten, daß der CRBP-I-Abschirmmechanismus die Metabolisierung durch ADHs oder andere Enzyme auf die geringen Gehalte an „freiem“ Retinol beschränkt. Dadurch wird eine übermäßige Retinol-Oxidation verhindert und es dennoch ermöglicht, daß ein gewisser Anteil Retinol für die Retinsäure-Synthese zu Retinal umgewandelt wird (30). Kürzlich wurde gezeigt, daß Cytochrom-P450-Enzyme in humanen Leber-Mikrosomen die oxidative Umwandlung von all-*trans*-Retinol in all-*trans*-Retinal katalysieren. Hohe Aktivitäten zeigten dabei CYP1A2, CYP3A4, CYP1A1 und CYP1B1 (293). Obwohl ihr Beitrag an der Retinol-Oxidation unter normalen Bedingungen gering zu sein scheint (293), können diese Enzyme einen Einfluß in TCDD-belasteten Organismen haben, da TCDD die Cytochrome CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 induziert. Andere Studien mit Cytochrom-P450-Isoenzymen von Mensch und Kaninchen zeigten *in vitro* die Umwandlung von all-*trans*-Retinal in all-*trans*-Retinsäure durch CYP1A2, CYP1A1 und CYP1B1 (294-296). Daher erscheint es möglich, daß an der Biosynthese von all-*trans*-Retinsäure in TCDD-belasteten Organismen neben dem üblichen Alkohol-Dehydrogenase-/Aldehyd-Dehydrogenase-abhängigen noch ein Cytochrom-P450-gesteuerter Mechanismus beteiligt ist .

(II) *Metabolismus der all-trans-Retinsäure.* All-*trans*-Retinsäure kann den eigenen Metabolismus induzieren und über eine Feedback-Hemmung die eigene Biosynthese beeinflussen, ein Mechanismus über den eine Steigerung einer all-*trans*-Retinsäure-Biosynthese ausgeglichen werden kann (8,20,22). Der Nettoeffekt einer TCDD-Belastung könnte ein erhöhter Retinol-Umsatz mit einer Verringerung der hepatischen Retinylester-Spiegel sein, bei dem die all-*trans*-Retinsäure-Spiegel im Fließgleichgewicht nur leicht erhöht sind.



Zwei Beweislinien unterstützen die Hypothese, daß der Abbaustoffwechsel von all-*trans*-Retinsäure wenigstens teilweise über AhR-abhängige Cytochrom-P450-Aktivitäten abläuft. *Van Wauwe et al.* zeigten (297), daß eine orale Gabe von Liarozol (einer Imidazol-enthaltenden Verbindung, die die Cytochrom-P450-Aktivität hemmt) im Plasma endogene all-*trans*-Retinsäure-Spiegel erhöht. Andererseits zeigten AhR-*Knock-Out*-Mäuse erhöhte hepatische all-*trans*-Retinsäure-Konzentrationen (92). Zwei kürzlich entdeckte, durch all-*trans*-Retinsäure induzierbare Cytochrom-P450-Isoformen, CYP26A und CYP26B, können geringe Konzentrationen von all-*trans*-Retinsäure in 4-OH-Retinsäure, 4-oxo-Retinsäure, 18-OH-Retinsäure und weitere nicht identifizierte polare Metaboliten umwandeln (31,277,298-300). Die Beteiligung anderer Cytochrom-P450-Isoenzyme im Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure wurde *in vitro* demonstriert (276,295,301-303). Einige *in-vitro*-Studien zeigten für CYP1A1 und CYP1A2 beträchtliche Umsatzraten (Kaninchen, Ratte) (31,276,295,304). Neben der Selbstinduktion des Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure ist daher eine Steigerung des Abbaustoffwechsels durch TCDD-induzierbare Cytochrom-P450-Enzyme möglich. *Vecchini et al.* fanden, daß sich in der Promotor-Region des CYP1A1-Gens ein Retinsäure-Response-Element befindet und daß all-*trans*-Retinsäure die Expression dieses Gens induzieren kann (305,306). Es ist daher gut möglich, daß bestimmte Enzyme gleichzeitig sowohl durch TCDD als auch durch erhöhte all-*trans*-Retinsäure-Konzentrationen induziert werden können.

*Fiorella et al.* stellten eine Induktion des all-*trans*-Retinsäure-Metabolismus bei der Inkubation von Leber-Mikrosomen TCDD-belasteter Sprague-Dawley-Ratten mit all-*trans*-Retinsäure fest (97). Mittels Mikrosomen fanden *Bank et al.*, daß TCDD in Ratten sowohl die renale als auch die hepatische Glukuronidierung von all-*trans*-Retinsäure steigert (96). Beide Gruppen gingen davon aus, daß durch TCDD induzierte Enzyme all-*trans*-Retinsäure oxidieren bzw. glukuronidieren können. Angesichts der in dieser Studie aufgezeigten erhöhten all-*trans*-Retinsäure-Spiegel und unter der Berücksichtigung einer Autoinduktion des Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure, können ihre Ergebnisse auch auf Enzyme zurückgeführt werden, die nicht direkt durch TCDD sondern indirekt durch erhöhte all-*trans*-Retinsäure-Spiegel induziert werden.

Die Glukuronidierung von all-*trans*-Retinsäure wird durch UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs) katalysiert. In der Leber wurde eine besonders hohe spezifische Aktivität gefunden, was darauf hindeutet, daß die Leber ein Hauptort für die Umwandlung von all-*trans*-Retinsäure in Retinoyl- $\beta$ -Glukuronid ist (307). In der hier vorgestellten Studie wurden in den Lebern von Kontrollen und TCDD-belasteten Ratten jedoch keine meßbaren Mengen von Retinoid- $\beta$ -Glukuroniden gefunden. Bei einer schnellen Exkretion über Galle oder Urin,

wären in der Leber nur sehr niedrige Retinoid- $\beta$ -Glukuronid-Gehalte zu erwarten, die wegen der indirekten Bestimmung mit  $\beta$ -Glukuronidase neben vergleichsweise hohen Gehalten an all-*trans*-Retinsäure unerkant bleiben würden.

Hinsichtlich des oxidativen Metabolismus konnte der im Rahmen dieser Arbeit neuentdeckte Metabolit identifiziert werden, bei dem es sich wahrscheinlich um 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure handelt (Abschnitt 4). Die *in-vivo*-Gehalte dieses Retinoids sind in TCDD-belasteten Tieren dosisabhängig reduziert. Dieses Ergebnis kann darauf zurückzuführen sein, daß der Abbaustoffwechsel in TCDD-belasteten Ratten ausgeprägter ist als die Biosynthese. Eine andere Erklärung könnte eine TCDD-induzierte Verringerung des Vorläufer-Retinoids sein. Ein aussichtsreicher Kandidat dafür ist 9,13-di-*cis*-Retinsäure, die in verringerten Konzentrationen im Serum gefunden wird.

*Verminderte Konzentrationen von cis-Retinsäuren.* Mehrere *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien demonstrierten die sterische Umwandlung von Retinsäure-Stereoisomeren untereinander (238,254,301,308-312). Wie diese Reaktionen ablaufen und gesteuert werden, ist nicht genau bekannt. *In vitro* können diese Reaktionen von verschiedenen Sulfhydryl-Verbindungen katalysiert werden. Derartige Umwandlungen wurden daher als nicht-enzymatische, Thiol-abhängige Isomerisierungsvorgänge betrachtet (313-316). Da es wenig wahrscheinlich ist, daß Isomerisierungsreaktionen wichtiger Retinsäure-Liganden nicht-enzymatisch ablaufen sollen (8), untersuchten Juchau und Mitarbeiter den Einfluß von Glutathion-S-Transferasen (GST) (317-319). Ihre Arbeiten zeigen, daß die Umwandlung von 13-*cis*-Retinsäure in all-*trans*-Retinsäure wirksam durch GST-Isoenzyme katalysiert wird. Die GST-katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung erwies sich als Glutathion-unabhängig, so daß Glutathion-S-Transferasen eher der Charakter eines Isomerase-Enzyms zukommt als der eines nicht-enzymatischen, Thiol-abhängigen Katalysators. TCDD ruft in Nagetieren oxidativen Streß hervor. Neben anderen Endpunkten bewirkt TCDD eine Abnahme der Leber-Spiegel von Glutathion und proteinfreien Sulfhydryl-Verbindungen (320-322). Andererseits induzieren TCDD und verwandte Substanzen GST-Aktivitäten und -Genexpression (63,323,324). Die Reduktion der beobachteten 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Serum von TCDD-belasteten Ratten kann durch beide Mechanismen hervorgerufen werden. Einerseits können induzierte GST-Aktivitäten eine *cis/trans*-Isomerisierung fördern, andererseits kann ein verminderter Gehalt an Glutathion und proteinfreien Sulfhydryl-Verbindungen zu einer reduzierten *trans/cis*-Isomerisierung führen. Dies könnte zu einem Netto-Anstieg der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel beitragen. Über die Metabolisierung ist noch eine andere Erklärung für den Rückgang von 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegeln im Serum von TCDD-belasteten Ratten denkbar. In Leber-Mikrosomen von weiblichen und männlichen Ratten zweier Stämme konnte gezeigt werden,

daß die Oxidation von *cis*-Retinsäuren effektiver abläuft als die von *all-trans*-Retinsäure (301). *Genchi et al.* stellten fest, daß das Ausmaß der Glukuronidierung von Retinoiden (Retinol und Retinsäure) von ihrer Konfiguration abhängt (325). Es wurde vermutet, daß unterschiedliche UDP-Glukuronosyltransferasen verschiedene Stereoisomere von Retinoiden metabolisieren. Interessanterweise zeigten UDP-Glukuronosyltransferasen in Leber-Mikrosomen von Ratten höhere Glukuronidierungsraten für *cis*-Isomere als für *all-trans*-Formen (325). Induzierte Oxidations- und/oder Glukuronidierungsaktivitäten könnten so zu verringerten 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegeln in TCDD-belasteten Ratten beitragen.

*Biologische Aktivität.* Der Netto-Anstieg der *all-trans*-Retinsäure-Spiegel in wichtigen Organen wie Leber und Niere sowie im Blutkreislauf läßt vermuten, daß TCDD verschiedene *all-trans*-Retinsäure-abhängige Prozesse wie Differenzierung, Morphogenese, Zellproliferation und Apoptose verändern kann. Der sichere Konzentrationsbereich für endogen gebildete *all-trans*-Retinsäure ist noch weitestgehend unbekannt (22,326). Nach Gabe teratogener Vitamin-A-Dosen konnte in Kaninchen aber gezeigt werden, daß bereits eine geringe 1,4fache Steigerung der *all-trans*-Retinsäure-Spiegel im maternalen Plasma und eine Verdoppelung der embryonalen Spiegel embryotoxisch wirken (AUC-Werte) (4,239,327). In einigen *in-vitro*-Studien wurde gezeigt, daß TCDD die übliche Retinsäure-induzierte Genexpression in verschiedenen Zellsystemen hemmt (99-101,328). *Lorick et al.* vermuten, daß über eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem Ah-Rezeptor bzw. seinem AhR/Arnt-Komplex und der Ligand-Bindungsdomäne der RARs die Bindung der *all-trans*-Retinsäure und damit die nachfolgende Aktivierung der RAR-Funktion verhindert wird (99). *Ashida et al.* zeigten auf, daß nach einer *in-vivo*-Exposition von Meerschweinchen mit TCDD in einem Bindungsassay die Bindung der hepatischen nukleären Protein-Fraktion (inklusive RARs und RXRs) an ein synthetisches Retinsäure-Response-Element (RARE) signifikant vermindert war (98). Da sich TCDD entsprechend seiner Affinität vornehmlich im Fettgewebe und der Leber anreichert, ist seine Verteilung innerhalb des Körpers nicht gleichmäßig (329). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache könnte es möglich sein, daß die durch *all-trans*-Retinsäure induzierte Genexpression von Gewebe zu Gewebe oder sogar von Zelltyp zu Zelltyp in Abhängigkeit von der lokal vorliegenden TCDD-Konzentration schwankt, auch wenn die *all-trans*-Retinsäure-Spiegel vergleichbar sind.

Die in dieser Studie gefundene Abnahme der 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Serum von TCDD-belasteten Ratten kann ebenfalls funktionale Folgen haben. Kürzlich zeigten *Okuno et al.*, daß 9,13-di-*cis*-Retinsäure RAR- $\alpha$  transaktiviert und die zelluläre Fibrogenese über eine Bildung von TGF- $\beta$  steigert (46).

#### 5.4 Retinoid-Bindeprotein-*Knock-Out*-Mäuse: Endogener Retinoid-Status und Auswirkung einer TCDD-Exposition in der Leber

Diese Studie wurde durchgeführt, um die Rolle Retinoid-spezifischer Bindeproteine (CRBP-I, CRABP-I und CRABP-II) in der normalen und der durch TCDD gestörten Vitamin-A-Homöostase in der Leber zu untersuchen. Dazu wurden männliche *Knock-Out*-Mäuse, denen CRBP-I bzw. CRABP I und II bzw. alle drei Bindeproteine CRBP-I, CRABP-I und CRABP-II fehlten, und ihre entsprechenden Wildtyp-Kontrollen einer einmaligen oralen Dosis von 0 oder 50 µg TCDD/kg Körpergewicht ausgesetzt (Abschnitt E-30). Ihre hepatischen Retinoid-Gehalte wurden am Tag der Exposition (Tag 0) und an Tag 7 und 28 nach der Exposition mit der Routine-Methodik (Abschnitt 3.7) bestimmt (Einfachbestimmung pro Probe). Wegen Aufzucht-Problemen bei dem CRBP-I-*Knock-Out*-Stamm stand nur eine begrenzte Anzahl von Versuchstieren dieses Stammes zur Verfügung, so daß nur eine Gruppe untersucht werden konnte (TCDD-Belastung, Tag 7).

**Tab. 5-7.** Hepatische Retinoid-Spiegel in männlichen Retinoid-Bindeprotein-*Knock-Out*-Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen nach einmaliger TCDD-Exposition (i. p.) von 0 oder 50 µg/kg Körpergewicht.<sup>©</sup>

	Retinol [µg/g]	Retinylester <sup>§</sup> [nmol/g]	neuentdeckter Metabolit <sup>Ⓞ</sup> [ng/g]	all-trans-RA [ng/g]
<b>Tag 0</b>				
Wildtyp <sup>§</sup>	2,13 ± 0,93	518 ± 90	20,1 ± 2,7	6,80 ± 1,35
CRABP-I/CRABP-II (-/-) <sup>§</sup>	2,07 ± 0,23	665 ± 70*	24,7 ± 5,8	6,01 ± 0,53
CRBP-I/CRABP-I/CRABP-II (-/-) <sup>§</sup>	1,10 ± 0,09*	314 ± 104*	32,0 ± 2,2*	2,24 ± 0,06*
<b>Tag 7</b>				
Wildtyp – Kontrolle	2,07 ± 0,70	640 ± 99	12,7 ± 3,4	4,99 ± 1,52
Wildtyp – TCDD	2,32 ± 0,42	376 ± 45 <sup>#</sup>	0,83 ± 0,39 <sup>#</sup>	3,73 ± 1,33
CRABP-I/CRABP-II (-/-) – Kontrolle	1,66 ± 0,05	808 ± 51*	13,5 ± 4,4	4,19 ± 0,38
CRABP-I/CRABP-II (-/-) – TCDD	1,75 ± 0,27	527 ± 39 <sup>Ⓞ</sup>	0,50 ± 0,26 <sup>#</sup>	5,69 ± 1,91
CRBP-I/CRABP-I/CRABP-II (-/-) – Kontrolle	1,09 ± 0,18*	335 ± 33*	33,2 ± 11,8*	2,56 ± 0,61*
CRBP-I/CRABP-I/CRABP-II (-/-) – TCDD	1,03 ± 0,22 <sup>Ⓞ</sup>	113 ± 30 <sup>Ⓞ</sup>	1,00 ± 0,29 <sup>#</sup>	2,93 ± 0,73
CRBP-I (-/-) – TCDD	2,52 ± 0,23	140 ± 38 <sup>Ⓞ</sup>	0,72 ± 0,16 <sup>§</sup>	4,02 ± 0,73 <sup>§</sup>
<b>Tag 28</b>				
Wildtyp – Kontrolle	2,72 ± 0,19	1118 ± 164	13,4 ± 2,6	6,40 ± 1,08
Wildtyp – TCDD	3,00 ± 1,71	630 ± 183 <sup>#</sup>	0,85 ± 0,20 <sup>#</sup>	6,16 ± 1,56
CRABP-I/CRABP-II (-/-) – Kontrolle	1,76 ± 0,24*	844 ± 145*	12,0 ± 1,0	7,16 ± 0,21
CRABP-I/CRABP-II (-/-) – TCDD	1,84 ± 0,23 <sup>Ⓞ</sup>	531 ± 124 <sup>#</sup>	1,42 ± 0,70 <sup>#</sup>	6,76 ± 0,98
CRBP-I/CRABP-I/CRABP-II (-/-) – Kontrolle	1,10 ± 0,09*	455 ± 14*	27,7 ± 1,8*	2,63 ± 0,31*
CRBP-I/CRABP-I/CRABP-II (-/-) – TCDD	0,71 ± 0,25 <sup>Ⓞ</sup>	35,0 ± 9,1 <sup>Ⓞ</sup>	0,89 ± 0,17 <sup>#</sup>	3,16 ± 0,44 <sup>Ⓞ</sup>

<sup>©</sup> Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 5), bis auf <sup>§</sup> n = 4

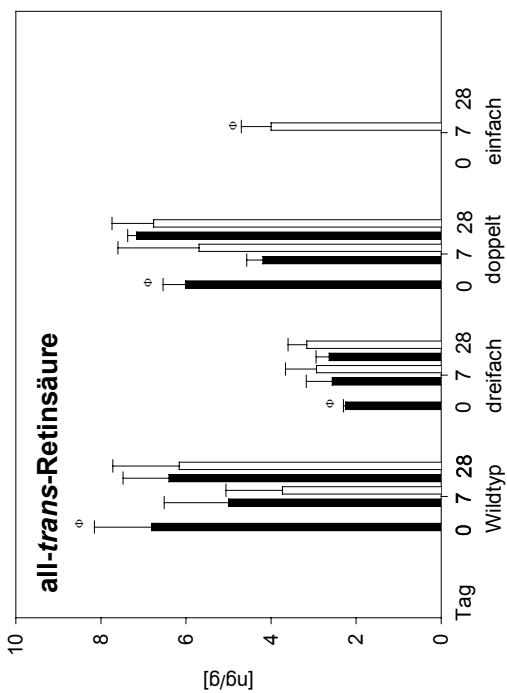
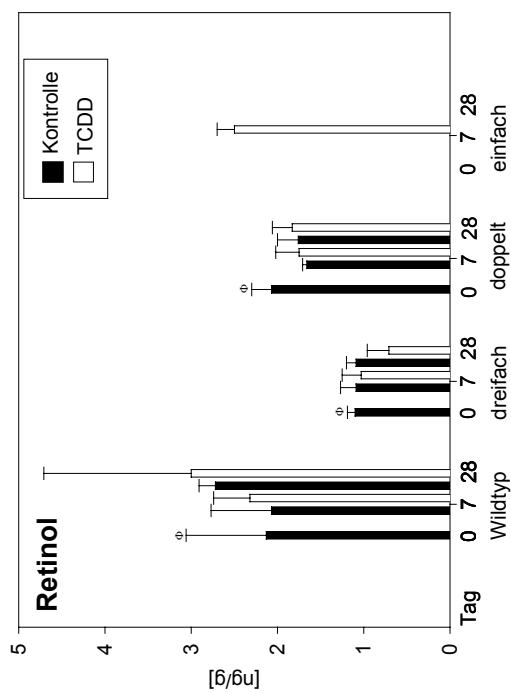
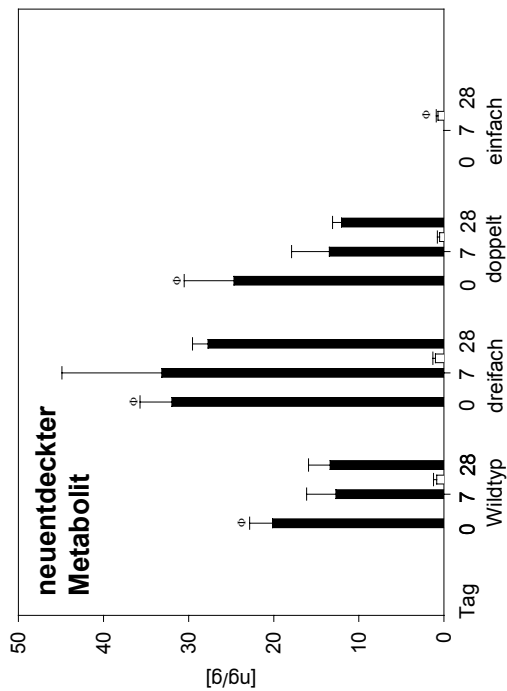
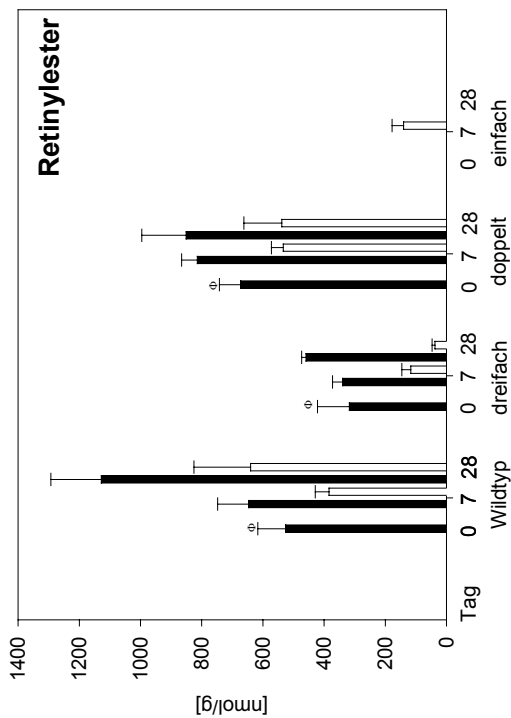
<sup>Ⓞ</sup> vermutlich: 9-cis-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure

\* p < 0,05, signifikant unterschiedlich von unbehandeltem Wildtyp (siehe Abschnitt E-30)

<sup>#</sup> p < 0,05, signifikant unterschiedlich von entsprechender Kontrolle (siehe Abschnitt E-30)

<sup>Ⓞ</sup> p < 0,05, signifikant unterschiedlich von TCDD-behandeltem Wildtyp (siehe Abschnitt E-30)

<sup>§</sup> Summe von Retinylinoleat, Retinyloleat, Retinylpalmitat und Retinylstearat



**Abb. 5-14.** Hepatische Retinoid-Spiegel in männlichen Retinoid-Bindeprotein-Knock-Out-Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen nach einmaliger TCDD-Exposition (i. p.) von 0 µg/kg (Kontrolle) oder 50 µg/kg Körpergewicht (TCDD) (CRBP-I (-/-): einfach; CRBP-I/CRBP-II (-/-): doppelt und CRBP-I/CRBP-II (-/-): dreifach; n = 5 bis auf φ n = 4).

## Ergebnisse

Die Ergebnisse (**Tab. 5-7.** und **Abb. 5-14.**) zeigen, daß *Knock-Out*-Mäuse ohne CRBP-I, CRABP-I und CRABP-II-Bindeproteine (Dreifach-*Knock-Outs*) drastische Änderungen der hepatischen Retinoid-Spiegel aufweisen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hatte dieser Stamm signifikant niedrigere *all-trans*-Retinsäure-, Retinol- und Retinylester-Spiegel, während Gehalte des neuentdeckten Metaboliten (vermutlich 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure) signifikant erhöht waren. *Knock-Out*-Mäuse ohne CRABP-I und CRABP-II (Doppel-*Knock-Outs*) waren mit Wildtyp-Mäusen vergleichbar, auch wenn dort zum Teil geringe aber signifikante Unterschiede bezüglich der Retinol- bzw. Retinylester-Gehalte bestanden, die aber bei Betrachtung der unterschiedlichen Zeitpunkte keine Kontinuität aufwiesen. Bei TCDD-Belastung wurden in allen Stämmen generell deutlich niedrigere Gehalte des neuentdeckten Metaboliten gefunden. Gehalte an Retinol und *all-trans*-Retinsäure waren nach der TCDD-Belastung unverändert. Der Verlust an hepatischen Retinylestern war in TCDD-belasteten Dreifach-*Knock-Outs* (-92 %, Tag 28) deutlich ausgeprägter als in TCDD-belasteten Wildtyp-Mäusen (-44 %, Tag 28). TCDD-belastete CRBP-I-*Knock-Out*-Mäuse zeigten im Vergleich mit TCDD-belasteten Dreifach-*Knock-Out*-Mäusen vergleichbare Gehalte an Retinylestern, *all-trans*-Retinsäure und dem neuentdeckten Metaboliten. Retinol-Spiegel waren hingegen eher mit den Gehalten der entsprechenden Wildtyp-Mäuse vergleichbar.

## Diskussion

Die zellulären Retinsäure- (CRABP-I und CRABP-II) und Retinol-Bindeproteine (CRBP-I und CRBP-II) lösen und stabilisieren ihre hydrophoben und labilen Liganden in der wäßrigen Umgebung (19). Sie besitzen untereinander ein hohes Maß an Ähnlichkeit und sind im Laufe der Evolution zu einem hohem Maß konserviert geblieben, was darauf hindeutet, daß sie eine wichtige spezifische Funktion ausüben (330). CRBP-I und CRBP-II können *all-trans*-Retinol, 13-*cis*-Retinol und *all-trans*-Retinal binden (331). CRBP-I ist ubiquitär im Organismus verteilt und kommt in höchsten Konzentrationen in Leber, Niere und Nebenhoden vor. Im Gegensatz dazu wird CRBP-II fast ausschließlich im Dünndarm exprimiert (19). CRABP-I und CRABP-II können intrazellulär Retinsäuren binden. CRABP-II bindet *all-trans*-Retinsäure mit einer signifikant geringeren Affinität als CRABP-I und beide Proteine binden 13-*cis*- oder 9-*cis*-Retinsäure mit einer wesentlich geringeren Affinität als *all-trans*-Retinsäure (41,332-336). CRABP-I wird nahezu ubiquitär exprimiert, CRABP-II hingegen fast ausschließlich in Haut, Uterus und Ovarien (19,330,337). Da die molaren Bindeprotein-Gehalte im Zytoplasma die der endogenen Liganden übertreffen, wird davon ausgegangen, daß der größte Anteil des jeweiligen Liganden in der Zelle an das Bindeprotein gebunden vorliegt (27,31,338).

Die biologische Funktion der **CRABPs** wird gegenwärtig nicht vollständig verstanden. In der Literatur werden mögliche Aspekte der biologischen Funktion dieser Bindeproteine diskutiert: CRABPs könnten (I) all-*trans*-Retinsäure zu ihren nukleären Rezeptoren transportieren (339,340), (II) als Puffer für „freie“ Retinsäure wirken und so die Signalübertragung der freien Retinsäure dirigieren (341-343) und/oder (III) als Modulatoren im Abbaustoffwechsel von all-*trans*-Retinsäure agieren und dabei intrazelluläre Konzentrationen kontrollieren (19,31,344,345). Doppel-*Knock-Out*-Mäuse ohne CRABP-I und CRABP-II erscheinen hinsichtlich ihrer Entwicklung, Fruchtbarkeit, Lebensspanne und des allgemeinen Verhaltens normal und zeigen nur kleinere Gliedmaßen-Defekte (346), was darauf hindeutet, daß die Bindeproteine CRABP-I und CRABP-II nicht zwingend erforderlich sind. Es wurde vermutet, daß die entscheidenden Reaktionen bei Abwesenheit des Bindeproteins noch hinreichend aber nur sub-optimal ablaufen können (347). Ihre Wichtigkeit würde daher eher unter ungünstigen Bedingungen wie einer unzureichenden Vitamin-A-Versorgung offensichtlich werden (346). Ebenso könnten alternative Bindeproteine existieren (347).

In bisherigen Studien wurden noch nie endogene Retinoid-Spiegel dieser Doppel-*Knock-Out*-Mäuse untersucht. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Doppel-*Knock-Out*-Mäuse auch hinsichtlich ihrer hepatischen Retinoid-Spiegel nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheidbar sind. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß auch bei den ungünstigen Bedingungen einer TCDD-Belastung keinerlei Unterschiede zum Wildtyp nachweisbar sind. CRABP-I und CRABP-II erscheinen damit zumindest im ausgewachsenen Organismus entbehrlich und für die Retinsäure-Signalübertragung von untergeordneter Bedeutung. Die physiologische Aufgabe dieser Proteine bleibt damit weiterhin unbekannt.

Die in der Literatur diskutierten physiologischen Funktionen von **CRBP-I** lassen sich in zwei Bereiche einteilen: (I) die Regulation der Vitamin-A-Speicherung und (II) die Regulation der Synthese von all-*trans*-Retinsäure (19,22,27,31).

(I) *Regulation der Vitamin-A-Speicherung*. Die Leber spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Retinoid-Haushaltes, indem sie einerseits Retinol im Falle eines Nahrungsüberschusses in Form von Retinylestern speichert und andererseits Retinol freisetzt, wenn die Vitamin-A-Aufnahme sinkt. Die Veresterung von Retinol, das an CRBP-I gebunden ist (holo-CRBP-I), wird durch das Enzym Lecithin:Retinol-Acyltransferase (LRAT) katalysiert (31,337,348). Während holo-CRBP-I Retinol direkt an LRAT weiterleitet, hemmt „freies“ CRBP-I (apo-CRBP-I) diese Reaktion (31,337,348). Auf der anderen Seite stimuliert apo-CRBP-I Retinylester-Hydrolase-Aktivitäten (31,337,349). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, daß bei ausreichender Vitamin-A-Versorgung

CRBP-I *in vivo* zu einem beträchtlichen Teil mit Retinol gesättigt ist und folglich Retinol zur Speicherung in Richtung LRAT dirigiert. Andererseits nimmt die Retinol-Konzentration bei Vitamin-A-Mangel ab, die Sättigung des CRBP-I sinkt und apo-CRBP-I-Gehalte steigen. Apo-CRBP-I hemmt dann einerseits die Retinol-Veresterung, stimuliert andererseits aber auch die Retinol-Freisetzung aus gespeicherten Retinylestern in den Blutkreislauf (19,22,27,31). CRBP-I-*Knock-Out*-Mäuse zeigen, daß eine Defizienz an CRBP-I in einer 50 %igen Abnahme der hepatischen Retinylester-Vorräte resultiert, wobei die Abnahme von einer höheren Umsatz-Rate gespeicherter Retinylester begleitet wird (21). Das Bindeprotein CRBP-I ist daher für eine effiziente Vitamin-A-Speicherung erforderlich (21). Auftretende hepatische Retinylester-Gehalte in Mäusen ohne CRBP-I-Bindeprotein entstehen vermutlich über Acyl-CoA:Retinol-Acyltransferase (ARAT) und LRAT, Enzyme, die auch „freies“ Retinol verestern können (21,22).

(II) *Regulation der Synthese von all-trans-Retinsäure*. Ergebnisse bisheriger *in-vitro*-Studien und CRBP-I-Expressionsmuster lassen vermuten, daß CRBP-I eine regulierende Rolle im Metabolismus von *all-trans*-Retinol und *all-trans*-Retinal zu *all-trans*-Retinsäure zukommt (19). Vermutlich begrenzt CRBP-I die Oxidation von Retinol (19,30,31). Freies „ungeschütztes“ Retinol kann durch eine Vielzahl von Alkohol-Dehydrogenasen und Cytochrom-P450-Enzyme mit einer breiten Substrat-Spezifität oxidiert werden, aber nur bestimmte Enzyme können an CRBP-I gebundenes Retinol metabolisieren (19,30,31). Ob letztendlich das an CRBP-I gebundene Retinol oder die geringen Mengen des nicht-gebundenen Retinols metabolisiert werden, ist derzeit Diskussionsgegenstand. Einig ist man sich jedoch dahingehend, daß CRBP-I Retinol vor einer übermäßigen enzymatischen Oxidation schützt (27,30,31). Wird an CRBP-I gebundenes Retinol metabolisiert, ist davon auszugehen, daß auch an CRBP-I gebundenes Retinal als Substrat für eine Aldehyd-Dehydrogenase dient (19,27,31).

Die in dieser Studie gefundenen Änderungen der Retinoid-Spiegel in Dreifach-*Knock-Out*-Mäusen können einerseits auf den CRBP-I-Mangel allein, andererseits aber auch auf ein Zusammenspiel des Fehlens aller drei Bindeproteine zurückzuführen sein. Entsprechend Untersuchungen von *Ghyselinck et al.* sind in unbelasteten CRBP-I-*Knock-Out*-Mäusen Retinol- und Retinylester-Spiegel im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen um ca. 50 % reduziert (21). Ein entsprechendes Ergebnis zeigt sich innerhalb dieser Studie für Dreifach-*Knock-Out*-Mäuse, denen die Bindeproteine CRBP-I, CRABP-I und CRABP-II fehlen. Da Doppel-*Knock-Out*-Mäuse ohne CRABP-I und CRABP-II quasi nicht von Wildtyp-Kontrollen unterscheidbar sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß die gefundenen Effekte in Dreifach-*Knock-Out*-Mäusen einzig auf das fehlende CRBP-I-Bindeprotein zurückzuführen sind.



Vergleichbare Gehalte an Retinylestern, *all-trans*-Retinsäure und dem neuentdeckten Metaboliten in TCDD-belasteten CRBP-I- und Dreifach-*Knock-Out*-Mäusen unterstützen diese Vermutung.

Mäuse, denen das CRBP-I-Bindeprotein fehlt, zeigen deutlich niedrigere hepatische Retinylester- und Retinol-Spiegel. Eine Erklärung hierfür ist eine gesteigerte Zugriffsmöglichkeit metabolisierender Enzyme auf das ungeschützte Retinol. Ein höherer Retinol-Umsatz in Leber und extrahepatischen Geweben könnte in der Folge die Mobilisierung der Retinylester steigern.

TCDD-belastete Dreifach-*Knock-Out*-Mäuse zeigen in der hier vorgestellten Studie deutlich niedrigere hepatische Retinylester-Spiegel als entsprechend belastete Wildtyp-Mäuse. Dieser Befund unterstützt die verbreitete Meinung einer schützenden Funktion des CRBP-I-Bindeproteins im oxidativen Metabolismus von Retinol bzw. Retinal. Retinol ist in Mäusen mit CRBP-I-Mangel den TCDD-induzierten Enzymen in einem größeren Umfang ausgesetzt als in Wildtyp-Mäusen, in denen es durch CRBP-I vor einer Oxidation geschützt wird.

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen Dreifach-*Knock-Out*-Mäuse signifikant niedrigere *all-trans*-Retinsäure-Spiegel, während die Gehalte des neuentdeckten Metaboliten (vermutlich 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure) signifikant erhöht sind. Dieser Sachverhalt zeigt Parallelen zu den in der Fütterungsstudie gemachten Beobachtungen (Abschnitt 5.1). Infolge einer höheren Vitamin-A-Aufnahme wurden auch dort niedrigere *all-trans*-Retinsäure-Spiegel und höhere Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten gefunden. Auch wenn beide Studien aufgrund der unterschiedlichen Ausgangssituationen zunächst nicht miteinander vergleichbar erscheinen, kommt es -wenn auch mit unterschiedlichen Ursachen- in beiden Studien sehr wahrscheinlich zu einem erhöhten Retinol-Umsatz: in der Fütterungsstudie durch die erhöhte Vitamin-A-Aufnahme und in der *Knock-Out*-Studie durch das Fehlen des CRBP-I-Bindeproteins. Stromabwärts im Metabolismus könnten sich für die polaren Retinoide daher vergleichbare Resultate ergeben und die in dieser Studie gefundenen niedrigeren *all-trans*-Retinsäure-Spiegel können wieder mit einer leicht überproportionalen Autoinduktion des *all-trans*-Retinsäure-Abbaustoffwechsels erklärt werden.

TCDD-belastete Mäuse aller Stämme zeigen neben den schon erwähnten Änderungen der hepatischen Retinylester-Gehalte generell drastisch reduzierte Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten. *All-trans*-Retinsäure-Spiegel sind nach einer TCDD-Belastung hingegen im Vergleich zu unbelasteten Mäusen unverändert. Hinsichtlich der Gehalte des neuentdeckten Metaboliten entsprechen die hier gemachten Beobachtungen in der Maus

denjenigen, die bereits in der Ratte (Abschnitt 5.3) gemacht wurden. Die Senkung der hepatischen Spiegel des neuentdeckten Metaboliten ist damit ein empfindliches Retinoid-abhängiges Merkmal einer TCDD-Belastung in Mäusen und Ratten.

Im Vergleich zu der Rattenstudie in Abschnitt 5.3 treten in der hier vorgestellten Studie in Mäusen jedoch keine erhöhten *all-trans*-Retinsäure-Spiegel auf. Da der Metabolismus von Retinol und Retinsäure in Wechselbeziehung zueinander abläuft, hängt die Netto-Änderung der *all-trans*-Retinsäure-Spiegel empfindlich von der lokalen Verteilung von Retinol bzw. Retinsäure relativ zu den verschiedenen metabolisierenden Enzymen ab und zudem von deren Aktivitäten und katalytischer Effizienz. Erhebliche Spezies-Unterschiede sind für die Metabolisierung von pharmakologischen Dosen von 13-*cis*- und *all-trans*-Retinsäure beschrieben worden (350). Auch Cytochrom-P450-Enzyme weisen gewisse Spezies-Unterschiede in ihren Enzymaktivitäten und –spezifitäten auf. Die festgestellten Unterschiede in hepatischen *all-trans*-Retinsäure-Spiegeln bei TCDD-belasteten Ratten und Mäusen können daher über Spezies-Unterschiede erklärt werden.

## 5.5 Effekt einer TCDD-Exposition auf die Vitamin-A-Homöostase in trächtigen Ratten

Diese Studie wurde durchgeführt, um den Einfluß einer TCDD-Exposition auf die endogenen Retinoid-Spiegel während der Trächtigkeit bzw. der Embryonal- und Fetalperiode in der Ratte zu untersuchen. Trächtige Wistar-Ratten erhielten an Tag 10 der Trächtigkeit (GD10) eine orale Dosis von 0 oder 15 µg TCDD/kg Körpergewicht und Autopsien erfolgten an GD14 und GD20 (Abschnitt E-31). Entnommene Embryonen (GD14), Gewebe und Plasma (maternal: GD14 und GD20; fetal: GD20) wurden schließlich mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Routine-Methodik analysiert (Abschnitt 3.7, Einfachbestimmung pro Probe). Embryonen, fetale Gewebe und Plasma wurden für die Messung jeweils pro Wurf vereint.

### Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in **Tab. 5-8.** und **Abb. 5-15.** dargestellt.

Leber. In der maternalen Leber (GD14, GD20) waren *all-trans*-Retinsäure-Spiegel nach TCDD-Belastung ungefähr doppelt so hoch wie in unbelasteten Tieren. Die Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten waren hingegen bei TCDD-belasteten Ratten signifikant niedriger. Der neuentdeckte Metabolit konnte in fetalen Lebern (GD20) nicht detektiert werden. Nach TCDD-Belastung waren Retinylester-Spiegel in maternalen Lebern an Tag 14 unverändert, an Tag 20 der Trächtigkeit aber signifikant verringert. In fetalen Lebern (GD20) waren nach TCDD-Belastung keine signifikanten Veränderungen von Retinoid-Spiegeln feststellbar.

Plasma. In maternalen Plasma-Proben (GD14 und GD20) führte die TCDD-Belastung zu signifikant niedrigeren 9,13-di-*cis*-/13-*cis*-Retinsäure-Spiegeln (Koelution). *All-trans*-Retinsäure-Spiegel zeigten in den Muttertieren nach TCDD-Belastung keine signifikanten Veränderungen (GD14 und GD20), waren aber in fetalem Plasma leicht erhöht (GD20). Fetale Retinylester-Plasma-Spiegel (GD20) waren nach einer TCDD-Belastung signifikant niedriger. In belasteten Muttertieren waren Retinylester-Spiegel an Tag 14 der Trächtigkeit verringert, an Tag 20 aber unverändert. Keine Veränderungen waren nach TCDD-Belastung für maternale und fetale Retinol-Spiegel feststellbar.

Niere. In Nieren der Muttertiere resultierte eine TCDD-Belastung in erhöhten *all-trans*-Retinsäure- und Retinylester-Spiegeln (GD14 und GD20). In fetalen Nieren (GD20) zeigten sich infolge der TCDD-Belastung verringerte Retinol und Retinylester-Spiegel. Im Vergleich zu den Nieren der Muttertiere zeigten fetale Nieren vierfach höhere *all-trans*-Retinsäure-Spiegel, die aber nach TCDD-Exposition keinerlei feststellbare Veränderungen aufwiesen.

**Tab. 5-8.** Retinoid-Spiegel während der Trächtigkeit, der Embryonal- und Fetalperiode nach einmaliger oraler TCDD-Exposition von 0 oder 15 µg/kg Körpergewicht an Tag 10 der Trächtigkeit in Wistar-Ratten.<sup>#</sup>

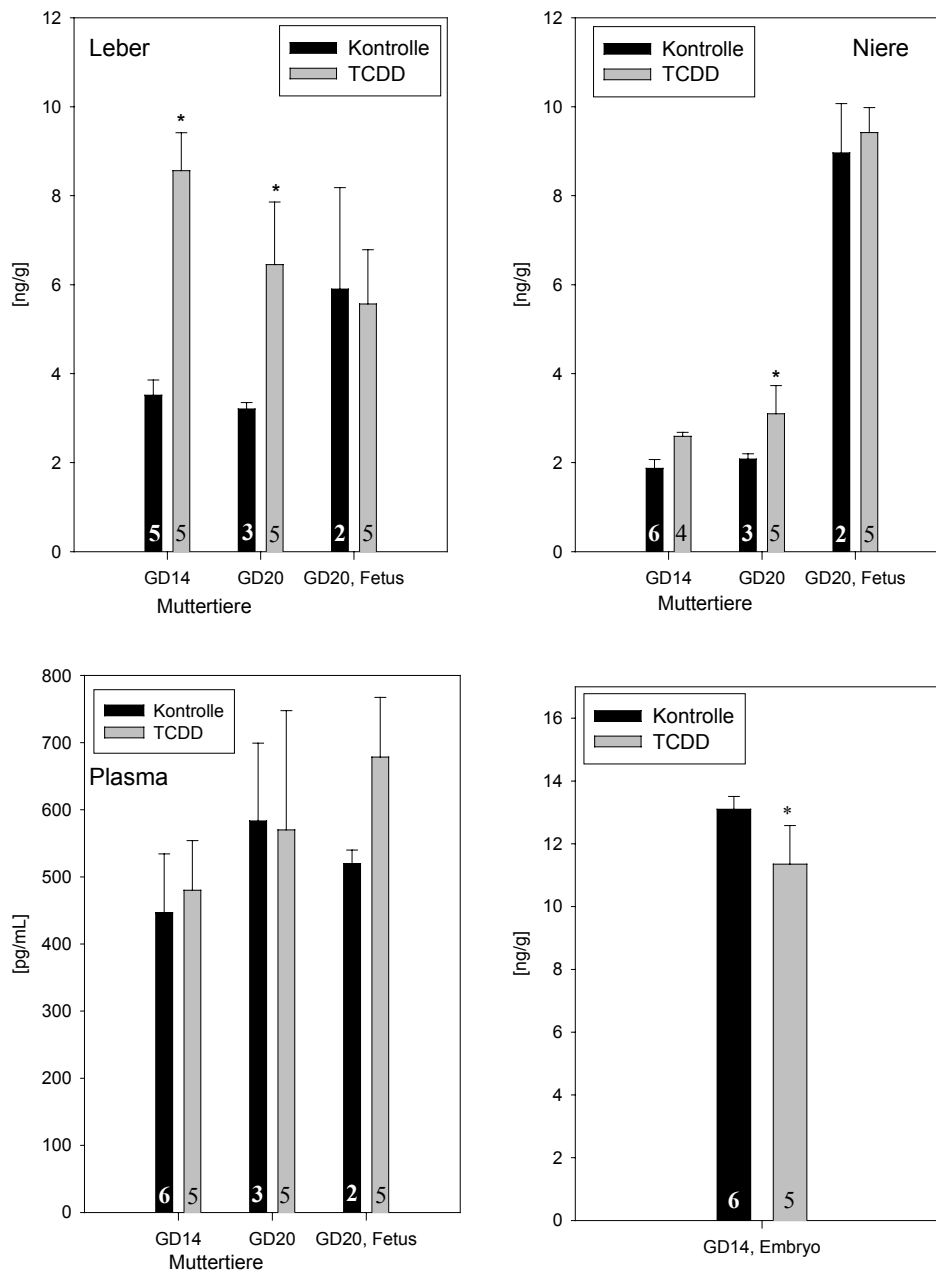
	Muttertiere - GD14			Muttertiere – GD20			Feten – GD20			Embryonen – GD14		
	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD
<b>Retinylester<sup>§</sup></b> (nmol/g Gewebe, pmol/mL Plasma)												
Leber <sup>°</sup>	2088 ± 150	1904 ± 191	2340 ± 62 <sup>c</sup>	1689 ± 114 <sup>*</sup>	26,7 ± 0,9 <sup>d</sup>	21,6 ± 3,5 <sup>a</sup>	6,13 ± 1,16 <sup>d</sup>	4,14 ± 0,32 <sup>*</sup>				
Niere <sup>°°</sup> , <sup>*</sup>	8,01 ± 4,40 <sup>a</sup>	14,4 ± 1,1 <sup>b*</sup>	0,57 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,70 ± 1,08	232 ± 60 <sup>d</sup>	131 ± 39 <sup>*</sup>						
Plasma <sup>**</sup>	227 ± 77 <sup>a</sup>	48,4 ± 10,4	559 ± 252 <sup>c</sup>	476 ± 295								
Plazenta	0,57 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,18	0,63 ± 0,14 <sup>c</sup>	0,54 ± 0,03 <sup>a</sup>								
Embryo					0,62 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,17						
<b>Retinol</b> (µg/g Gewebe, µg/mL Plasma, ng/g Plazenta)												
Leber	2,24 ± 0,69	2,55 ± 0,73	3,09 ± 1,14 <sup>c</sup>	2,33 ± 1,16	0,45 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,54 ± 0,12 <sup>a</sup>						
Niere	1,38 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,20 <sup>b</sup>	1,22 ± 0,31 <sup>c</sup>	1,36 ± 0,39	0,57 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>*</sup>						
Plasma <sup>**</sup> , <sup>**</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,05	0,26 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,30 ± 0,03						
Plazenta <sup>*</sup>	88,5 ± 4,8 <sup>a</sup>	85,8 ± 7,2	139 ± 26 <sup>c</sup>	146 ± 21 <sup>a</sup>								
Embryo					0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>*</sup>						
<b>All-trans-Retinsäure</b> (ng/g Gewebe, ng/mL Plasma)												
Leber <sup>°</sup> , <sup>**</sup> , <sup>**</sup>	3,51 ± 0,34	8,56 ± 0,85 <sup>*</sup>	3,21 ± 0,14 <sup>c</sup>	6,45 ± 1,41 <sup>*</sup>	5,90 ± 2,28 <sup>d</sup>	5,57 ± 1,22						
Niere <sup>°</sup>	1,87 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,59 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,08 ± 0,12 <sup>c</sup>	3,10 ± 0,63 <sup>*</sup>	8,96 ± 1,11 <sup>d</sup>	9,42 ± 0,56						
Plasma	0,45 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,07	0,56 ± 0,12 <sup>c</sup>	0,57 ± 0,18	0,52 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,68 ± 0,09						
Plazenta	1,28 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,67 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,39 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,18								
Embryo					13,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	11,4 ± 1,2 <sup>*</sup>						
<b>9,13-di-cis-Retinsäure/13-cis-Retinsäure</b> (ng/mL Plasma)												
Plasma <sup>°</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>*</sup>	0,44 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>*</sup>	n. d. <sup>§</sup>	n. d. <sup>§</sup>						
Embryo												
<b>neuentdeckter Metabolit; vermutlich: 9-cis-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure</b> (ng/g Gewebe)												
Leber <sup>°</sup> , <sup>**</sup> , <sup>**</sup>	5,69 ± 1,07	0,32 ± 0,02 <sup>*</sup>	7,44 ± 0,46 <sup>c</sup>	1,18 ± 1,51 <sup>*</sup>	n. d. <sup>§</sup>	n. d. <sup>§</sup>						

<sup>#</sup> Mittelwerte ± Standardabweichung ( $n = 5$ ), bis auf <sup>a</sup>  $n = 6$ , <sup>b</sup>  $n = 4$ , <sup>c</sup>  $n = 3$  und <sup>d</sup>  $n = 2$ ; <sup>§</sup> n. d.: nicht detektierbar; <sup>§</sup> Summe von Retinylinooleat, Retinyloleat, Retinylpalmitat und Retinylstearat

<sup>\*</sup>  $p < 0,05$ , signifikant unterschiedlich von unbelasteter Kontrolle (*Tukey Test* oder *t-Test*, siehe Abschnitt E-31)

<sup>°</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>°°</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>°°°</sup>  $p < 0,05$  signifikant unterschiedlich im Faktor Behandlung für Muttertiere (*Two Way ANOVA Test*)

<sup>\*</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,05$  signifikant unterschiedlich im Faktor Zeit für Muttertiere (*Two Way ANOVA Test*)



**Abb. 5-15.** All-*trans*-Retinsäure-Spiegel während der Trächtigkeit, der Embryonal- und Fetalperiode nach einmaliger oraler TCDD-Exposition von 0 oder 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht an Tag 10 der Trächtigkeit in Wistar-Ratten (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zur unbelasteten Kontrolle mit  $p < 0,05$ , die Zahlen in den Balken entsprechen jeweils der Zahl  $n$  der gemessenen Proben).

Plazenta. Sowohl an Tag 14 als auch an Tag 20 der Trächtigkeit konnten infolge einer TCDD-Exposition keine Veränderungen der Retinoid-Spiegel in der Plazenta festgestellt werden.

Fetus, GD14. In TCDD-belasteten Feten zeigten sich signifikant niedrigere all-*trans*-Retinsäure-Spiegel. Retinol-, Retinylester- und 9,13-di-*cis*-/13-*cis*-Retinsäure-Spiegel (Koelution) zeigten keine Veränderungen infolge einer TCDD-Exposition.

## Diskussion

Bei der Mannigfaltigkeit der biologischen Wirkungen von all-*trans*-Retinsäure kann man sich leicht vorstellen, daß beim Vorliegen unphysiologischer Konzentrationen auch Fehlregulationen eintreten können. Ein Überschuß oder ein Mangel von all-*trans*-Retinsäure oder ihren biosynthetischen Vorläufersubstanzen führt zu Veränderungen in der Embryonalentwicklung. Ein breites Spektrum von Mißbildungen wird durch exogene all-*trans*-Retinsäure induziert, wie z. B. Gaumenspalten, Herz- und Gefäßanomalien, Thymusdefekte und ZNS-Anomalien (4,5,55,351). Eine Exposition von trächtigen Versuchstieren mit einem Überschuß an Vitamin A (Retinylacetat oder Retinylpalmitat), all-*trans*-Retinsäure oder 13-*cis*-Retinsäure resultiert in einer erhöhten Zahl von fetalen Resorptionen und Totgeburten (54). Retinoide vermitteln einen Teil ihrer teratogenen Effekte über eine Störung der anterior-posterioren Achsenbildung (A/P-Achse) (49,54,55). Die A/P-Achse wird schon sehr früh im Embryo angelegt. Zwei wichtige embryonale Bestandteile kennzeichnen den Verlauf der A/P-Achse: einerseits das Neuralrohr, aus dem sich das Gehirn und das Rückenmark entwickeln, und andererseits die Somiten, die zunächst paarig beidseitig des Neuralrohrs angeordnet sind und später die Wirbel bilden (49).

Während der Embryonal- und Fetalperiode wird der Austausch von Nährstoffen, Blutgasen und Stoffwechselprodukten zwischen maternalen und fetalem Blut über die Plazenta sichergestellt (352). Der Plazenta-Transfer von Retinoiden wurde in Mensch, Maus, Ratte und Affe untersucht (162,264,268,353-356). Eine Akkumulation von all-*trans*-Retinsäure innerhalb des Embryos geschieht schnell. Maximalkonzentrationen erscheinen 2 bis 4 Stunden nach maternaler Gabe. Der Umfang des Plazenta-Transfers ist Retinoid-spezifisch (357,358). Retinol und all-*trans*-Retinsäure können effizient die Plazenta passieren. 9-*cis*- und 13-*cis*-Retinsäure werden nur zu einem geringen Anteil transferiert, aber noch in einem größeren Umfang als 9,13-di-*cis*-Retinsäure oder die Glukuronide der Retinsäure-Isomere (359). Retinylester können die Plazenta nicht überwinden (360). Die Plazenta kann einige Retinoide metabolisieren oder aus Vorläufersubstanzen synthetisieren (361). Dioxine und dioxinartige Verbindungen überwinden die Plazenta, ihr Transfer ist aber sehr begrenzt (58,362-364). Obwohl daher nur sehr geringe Mengen Dioxine oder dioxinartige Verbindungen im Embryo auftreten, sind die Konzentrationen ausreichend, um eine Störung der Embryonalentwicklung zu verursachen. Im Ratten-Fetus gemessene TCDD-Spiegel korrelieren gut mit dem Umfang entsprechender Reproduktions- und Entwicklungsanomalien (364). Größere Mengen an Dioxinen finden sich hingegen in der Plazenta (363).

Der Einfluß von TCDD auf den Vitamin-A-Stoffwechsel, wie ihn die Studie für männliche Sprague-Dawley-Ratten in Abschnitt 5.3 gezeigt hat, hat das Potential, signifikant zur

Gesamttoxizität von TCDD beizutragen. Da *all-trans*-Retinsäure insbesondere ein wichtiger Regulator für Wachstum und Differenzierung von Zellen und Geweben in der Embryonalperiode ist, könnten infolge einer pränatalen TCDD-Exposition erhöhte maternale *all-trans*-Retinsäure-Plasma-Spiegel durch den leichten Plazenta-Transfer die räumlich und zeitlich geregelten *all-trans*-Retinsäure-Verteilungsmuster im sich entwickelnden Embryo verändern und schließlich zu schwerwiegenden Veränderungen der Embryonalentwicklung führen.

All-*trans*-Retinsäure-Spiegel im Embryo stammen sowohl aus dem Plazenta-Transfer von *all-trans*-Retinsäure aus dem maternalen Plasma als auch aus lokal im Embryo synthetisierten Mengen. Gegenwärtig ist nicht bekannt, wieviel *all-trans*-Retinsäure der Embryo aus maternalen Quellen erhält und wieviel im Embryo selbst synthetisiert wird (56,350). Prinzipiell ist es möglich, daß die im ausgewachsenen Organismus aufgezeigte Möglichkeit einer Oxidation von Retinoiden durch TCDD-induzierte Enzyme auch im Embryo oder Fetus gegeben ist. Studien haben gezeigt, daß sowohl der Ah-Rezeptor als auch sein Dimersierungspartner Arnt in Embryo und Fetus exprimiert sind (365-368). TCDD und dioxinähnliche Verbindungen überwinden die Plazenta und führen auch im Embryo und Fetus zu einer TCDD-abhängigen Enzyminduktion (368-370). Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus den Dioxin-Gehalten, die infolge einer Exposition in der Plazenta auftreten (363,371) und dort eine Induktion der Enzyme der AhR-Genbatterie verursachen (372-374), die wiederum eine lokale Veränderung des Metabolismus von Retinoiden nach sich ziehen kann. Eine maternale Dioxin-Belastung stellt demnach direkt (über den TCDD-Plazenta-Transfer) oder mittelbar (über veränderte maternale und/oder plazentale Retinoid-Spiegel) ein potentielles Risiko für Veränderungen in der embryonalen Retinoid-Homöostase dar.

Unterschiedliche Retinoide können für eine Vitamin-A-induzierte Teratogenität verantwortlich sein. Studien zur Teratogenität von Retinoiden in Mäusen nach Retinol-Gabe haben gezeigt, daß *all-trans*-Retinsäure nur anteilig für die teratogenen Effekte in Mäusen ausschlaggebend ist (163,169,354). Es wird vermutet, daß auch Retinol *per se* einen teratogenen Effekt verursachen kann (4). Andere Studien zeigen, daß in der Ratte sowohl nach einer einmaligen als auch nach einer subchronischen teratogen wirkenden Dosierung mit Retinylpalmitat die Änderung der maternalen *all-trans*-Retinsäure-Plasma-Spiegel und eine entsprechende embryonale Exposition vernachlässigbar sind. Der Embryo ist aber hohen Konzentrationen von Retinol, Retinylestern und 14-HRR ausgesetzt (4,265,289). Daher ist es gut möglich, daß auch Veränderungen embryonaler und fetaler Konzentrationen anderer Retinoide als *all-trans*-Retinsäure zu einer abnormalen embryonalen Entwicklung führen können.

*Morse et al.* zeigten, daß eine perinatale PCB-Exposition (subchronisch, GD10-16) von Wistar-Ratten in Feten (GD20), Muttertieren (GD20), Neugeborenen und im ausgewachsenen Nachwuchs (90 Tage alt) zu einer Änderung des Retinoid-Status führt (85). Charakteristische Merkmale waren verringerte Retinol-Spiegel im Plasma und niedrigere hepatische Retinylester-Gehalte. Die Senkung der Retinol-Spiegel im Plasma ist dabei PCB-spezifisch und resultiert aus der Bindung eines PCB-Hydroxy-Metaboliten an Transthyretin (vgl. Abschnitt 2.3.2). Die Untersuchungen beweisen, daß eine Belastung mit Organohalogen-Verbindungen auch tatsächlich zu einer Veränderung fetaler Retinoid-Spiegel führen kann, zeigen aber nicht den Einfluß auf polare Retinoide.

Die hier vorgestellte Studie ist die erste ihrer Art, in der der Einfluß einer pränatalen TCDD-Exposition auf Retinoid-Spiegel polarer und unpolarer Retinoide im Embryo und in fetalem Plasma und Gewebe untersucht wurde. Die TCDD-Exposition erfolgte über eine einmalige orale Gabe von TCDD in Maiskeimöl an Tag 10 der Trächtigkeit (GD10). Nach den Ergebnissen der Studie in Abschnitt 5.3 waren an GD13 und GD14 deutlich erhöhte maternale *all-trans*-Retinsäure-Spiegel zu erwarten, vernachlässigbare Geschlechter- und Stamm-Unterschiede zwischen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten vorausgesetzt. Die beobachteten Anomalien infolge einer Vitamin-A-Exposition sind abhängig vom Zeitpunkt der Exposition (54). Eine Exposition an GD12-14 resultiert bei Ratten zumeist in Mißbildungen der Extremitäten (375).

Die pränatale TCDD-Exposition führte in den Muttertieren zu den bereits aus der Studie mit nicht-trächtigen männlichen Sprague-Dawley-Ratten bekannten Veränderungen der Retinoid-Spiegel (**Tab. 5-8.**). TCDD-belastete Muttertiere zeigen niedrigere hepatische und höhere renale Retinylester-Spiegel als unbelastete Ratten. Die Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten in der maternalen Leber sind infolge der TCDD-Exposition verringert, ebenso wie die 9,13-di-*cis*-/13-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Plasma. *All-trans*-Retinsäure-Spiegel sind in der Leber und Niere von belasteten Tieren erhöht (**Abb. 5-15.**). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie in Abschnitt 5.3 weisen die Muttertiere in dieser Studie aber keine erhöhten *all-trans*-Retinsäure-Spiegel im Plasma auf. Ursache hierfür könnten das erhöhte Verteilungsvolumen in trächtigen Tieren, aber auch Stamm- oder Geschlechterunterschiede sein. Ein Anhaltspunkt dafür, daß in trächtigen Tieren nach TCDD-Exposition ein erhöhter Plazenta-Transfer von *all-trans*-Retinsäure auftritt, kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Retinoid-Spiegel in der Plazenta sind nach TCDD-Belastung jeweils unverändert. *All-trans*-Retinsäure-Spiegel in GD14-Embryonen sind bei maternaler TCDD-Belastung sogar leicht, aber signifikant verringert. Fetales Plasma und Gewebe an GD20 zeigen nach TCDD-Belastung keine signifikante Änderung der *all-trans*-Retinsäure-Spiegel. Fetale



Plasma-Werte sind zwar im Mittel um 30 % erhöht, aufgrund der geringen Anzahl der Proben in der Kontrollgruppe ist es aber nicht möglich, einen statistisch signifikanten Effekt zu finden (**Abb. 5-15.**). Feten TCDD-belasteter Muttertiere weisen an GD20 signifikant niedrigere renale Retinylester- und Retinol-Spiegel und verringerte Retinylester-Gehalte im Plasma auf. GD14-Embryonen zeigen infolge einer TCDD-Exposition der Mütter verringerte Retinol-Spiegel.

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Studie sind die hohen fetalen *all-trans*-Retinsäure-Konzentrationen in der Niere in Vergleich zu Muttertieren an GD20 (4,5fach höher). Hepatische *all-trans*-Retinsäure-Spiegel im Fetus sind hingegen nur 1,8fach höher als maternale Konzentrationen. Bei den *all-trans*-Retinsäure-Plasma-Werten zeigen sich so gut wie keine Unterschiede. Da die fetale Niere auch relativ große Gehalte an Retinylestern aufweist, ist es denkbar, daß sie während der Fetalperiode einen wichtigen Ort im Rahmen der lokalen fetalen *all-trans*-Retinsäure-Synthese darstellt.

Die Studie demonstriert erstmals den Einfluß einer maternalen TCDD-Exposition auf embryonale und fetale Retinoid-Spiegel in der Ratte. Mehrere Retinoide in Embryo und Fetus zeigen infolge einer TCDD-Belastung leichte, aber signifikante Veränderungen ihrer Konzentrationen, die relevant für Störungen in der Embryonalentwicklung sein können. Die Effekte könnten lokal sogar wesentlich deutlicher ausfallen als sie hier mit der Untersuchung ganzer Embryos oder fetaler Gewebe meßtechnisch erfaßt werden konnten. Retinoide sind im sich entwickelnden Embryo oder Fetus nicht einheitlich verteilt (54). Beispielsweise akkumuliert isotopenmarkierte *all-trans*-Retinsäure, die trächtigen Mäusen nach der Implantation (GD8-11) gegeben wird, im Embryo in einem begrenzten Bereich entlang des Neuralrohrs (376,377). Das tatsächliche Ausmaß einer lokal begrenzten TCDD-induzierten Veränderung von Retinoid-Konzentrationen im Embryo oder fetalen Geweben ist bei der Messung ganzer Embryos oder fetaler Gewebe nicht erkennbar, da diese Vorgehensweise zu einer relativen Verdünnung führt.

## 5.6 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgearbeiteten Methoden zur Analytik ermöglichten die Bestimmung einer Vielzahl endogener Retinoid-Gehalte in Plasma (bzw. Serum) und unterschiedlichen Geweben von Maus, Ratte und Mensch. Vor allem die endogenen Spiegel der polaren Retinoide *all-trans*-Retinsäure, 9-13-di-*cis*-Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure und des im Rahmen dieser Arbeit neuentdeckten Metaboliten, wurden zumeist erstmalig bestimmt. Einige in der Literatur beschriebenen Retinoid-Spiegel, wie beispielsweise hohe renale und hepatische 9-*cis*-Retinsäure-Gehalte in der Maus, konnten nicht bestätigt werden (Abschnitt 5.1). Während hinsichtlich der endogenen Retinoid-Muster und –Spiegel zwischen Ratten und Mäusen kaum ein Unterschied feststellbar ist, zeigen humane Plasma-Proben ein deutlich anderes Retinoid-Muster. In Mäusen und Ratten finden sich primär *all-trans*-Retinsäure und geringere Mengen an 9,13-di-*cis*-/13-*cis*-Retinsäure, während human neben beträchtlichen Mengen an *all-trans*- und 13-*cis*-Retinsäure auch 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure dominiert. Hepatische *all-trans*-Retinsäure-Spiegel liegen im Menschen deutlich höher als in Maus und Ratte. Leber-Proben von Mäusen und Ratten weisen beträchtliche Mengen des neuentdeckten Metaboliten, bei dem es sich vermutlich um 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure handelt, auf. In Humanlebern konnte dieser Metabolit dagegen nur in einer von sechs Proben detektiert werden (Abschnitt 5.2). Dieser Befund deutet aber darauf hin, daß es sich um ein auch für den Humanbereich relevantes Retinoid handelt.

Die durchgeführte Fütterungsstudie in Mäusen (Abschnitt 5.1) zeigt, daß eine subchronische Exposition mit Retinylpalmitat nicht, wie bisher angenommen, zu einer Steigerung von endogenen *all-trans*-Retinsäure-Spiegeln führt, sondern diese vielmehr senkt (Abschnitt 5.1). Der neuentdeckte Metabolit zeigt bei einer höheren Vitamin-A-Zufuhr deutlich höhere Gehalte (Abschnitt 5.1). Auch Dreifach-*Knock-Out*-Mäuse ohne CRABP-I, CRABP-II und CRBP-I zeigen gegenüber Wildtyp-Mäusen niedrigere *all-trans*-Retinsäure-Spiegel und höhere Gehalte des neuentdeckten Metaboliten. Retinylester- und Retinol-Spiegel sind in diesen Mäusen deutlich verringert (Abschnitt 5.4). Doppel-*Knock-Out*-Mäuse ohne CRABP-I und CRABP-II zeigen gegenüber Wildtyp-Mäusen hingegen keine veränderten Retinoid-Spiegel, was darauf schließen läßt, das die Bindeproteine CRABP-I und CRABP-II im ausgewachsenen Organismus der Maus entbehrlich sind, CRBP-I aber eine physiologisch wichtige Rolle spielt (Abschnitt 5.4). Die verringerten *all-trans*-Retinsäure-Spiegel lassen sich jeweils, im Rahmen eines höheren Retinol-Umsatzes, über eine Autoinduktion *all-trans*-Retinsäure-metabolisierender Enzyme erklären (Abschnitt 5.4).

TCDD zeigt einen beachtlichen Einfluß auf den Stoffwechsel von polaren und unpolaren Retinoiden in Ratte (Abschnitt 5.3 und 5.5) und Maus (Abschnitt 5.4). In beiden Spezies weisen TCDD-belastete Tiere in der Leber niedrigere Retinylester-Spiegel und drastisch verringerte Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten auf. Ratten zeigen nach TCDD-Exposition erhöhte renale Retinylester-Spiegel und niedrigere 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Konzentrationen im Plasma (Abschnitt 5.3 und 5.5). In Ratten, aber nicht in Mäusen, kann eine schwerwiegende Störung der all-*trans*-Retinsäure-Homöostase beobachtet werden, die in höheren all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln resultiert (Abschnitt 5.3 und 5.5).

Die Ergebnisse unterstreichen insgesamt die mögliche Rolle von TCDD-induzierten Enzymen bei der Oxidation hepatischer Vitamin-A-Speicher. Steigende all-*trans*-Retinsäure-Spiegel können teilweise durch Selbstinduktion ihres Abbaus oder durch TCDD-induzierte Enzyme ausgeglichen werden. Als Netto-Effekt ergibt sich Spezies-abhängig eine erhöhte Ausscheidung von Retinoid-Metaboliten bei etwas höheren (Ratte) oder unveränderten (Maus) all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln. Die Studie mit den Bindeprotein-*Knock-Out*-Mäusen unterstreicht dabei die Eigenschaft von CRBP-I, Retinol vor einer übermäßigen Oxidation durch TCDD-induzierte Enzyme zu schützen. Der Verlust an hepatischen Retinylestern ist in TCDD-belasteten Dreifach-*Knock-Out*-Mäusen deutlich ausgeprägter als in TCDD-belasteten Wildtyp-Mäusen (Abschnitt 5.4).

Die schwerwiegende Störung des Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure, die sich in TCDD-belasteten Ratten zeigt, hat das Potential über eine veränderte all-*trans*-Retinsäure-Signalübertragung signifikant zur Gesamtoxizität von TCDD beizutragen. Der Anstieg der all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in wichtigen Organen wie Leber und Niere sowie im Blutkreislauf von Ratten läßt vermuten, daß TCDD verschiedene all-*trans*-Retinsäure-abhängige Prozesse wie Differenzierung, Morphogenese, Zellproliferation und Apoptose verändern kann. Eine pränatale TCDD-Exposition in trächtigen Ratten bewirkt leichte, aber signifikante Veränderungen fetaler und embryonaler Konzentrationen von polaren und unpolaren Retinoiden (Abschnitt 5.5).

Signifikante Änderungen der Retinoid-Homöostase können bei Ratten schon bei der niedrigsten gestesteten oralen Dosis von 100 ng TCDD/kg Körpergewicht (KG) nachgewiesen werden (Abschnitt 5.3). Eine Einzeldosis TCDD, gelöst in Maiskeimöl, wird von Ratten nach oraler Gabe zu etwa 70-80 % resorbiert (378,379). Näherungsweise beträgt die Körperlast (*body burden*) einer Ratte demnach kurz nach der Exposition mit 100 ng TCDD/kg KG etwa 70-80 ng TCDD/kg KG. Im Menschen treten typischerweise Körperlasten an PCDFs und PCDDs von 2-6 ng TCDD-Äquivalenten/kg KG auf (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Aufgrund der hohen Belastung der Muttermilch liegt die Körperlast des Säuglings vor allem in der frühen Entwicklungsphase kurz nach der Geburt durchschnittlich bei etwa 10 ng TCDD-Äquivalenten/kg KG (380). Humane Körperlasten liegen damit nur geringfügig unter der Körperlast, bei der im Tierversuch bereits Änderungen des Metabolismus von Vitamin A gefunden werden. Die gefundenen Auswirkungen einer TCDD-Belastung könnten daher auch im Humanbereich relevant sein (insbesondere für Säuglinge und Bevölkerungsgruppen, die viel kontaminierten Fisch essen).

Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die hier festgestellten Effekte biologische, Retinoid-abhängige Wirkungen signifikant ändern und damit mittelbar die Symptome einer TCDD-Belastung verursachen.

## 6 Zusammenfassung

Vitamin A und seine Derivate (Retinoide) sind für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Mensch und Tier von grundlegender Bedeutung. Dazu gehören Wachstum, Reproduktion, Differenzierung von Zellen, embryonale Entwicklung, Sehzyklus und Immunfunktion. Toxische Umweltchemikalien aus der Gruppe der Organohalogen-Verbindungen, wie polychlorierte Dibenzodioxine, können die Homöostase von Retinoiden beeinflussen. Bisherige Untersuchungen zeigten aber nur die Änderungen unpolarer Retinoid-Spiegel (Retinol bzw. die Speicherform von Vitamin A, die Retinylester). Der Einfluß von Dioxinen auf die Homöostase des aktiven Metaboliten *all-trans*-Retinsäure und anderer polarer Retinoide, die endogen in deutlich geringeren Konzentrationen auftreten und daher analytisch nur schwer faßbar sind, wurde bisher nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, durch die Entwicklung einer praktikablen Analysenmethode zur simultanen Bestimmung von endogenen polaren und unpolaren Retinoid-Spiegeln neue Erkenntnisse über Art und Mechanismus der Störung des Vitamin-A-Metabolismus durch Dioxine zu gewinnen.

Ausgehend von methodischen Ansätzen aus der Literatur und deren Anpassung und Optimierung mit Hilfe von theoretischen Betrachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine empfindliche neue Methodik zur Messung von polaren und unpolaren Retinoiden in unterschiedlichen biologischen Matrices ausgearbeitet. Nach einer einfachen Flüssig-Extraktion von polaren und unpolaren Retinoiden aus der Matrix, werden polare Retinoide über eine automatisierte Festphasenextraktion von unpolaren Retinoiden und einem Großteil der Matrix abgetrennt. Die beiden entstehenden Retinoid-Fractionen werden anschließend getrennt voneinander über zwei HPLC-UV-Systeme vermessen. Für die unpolaren Retinoide wurde ein *Normalbore-Reversed-Phase*-System mit einem nicht-wässrigen Eluenten etabliert. Dieses System ermöglicht eine schnelle Trennung von Retinol, Retinal und allen wichtigen Retinylestern. Im Bereich der polaren Retinoide wird zur Steigerung der Empfindlichkeit eine *Reversed-Phase*-Trennung mit einer *Microbore*-Säule (2 mm) eingesetzt. Die Injektion der Probenlösung erfolgt dabei nach dem Prinzip der Säulenkopf-Fokussierung. Die Methodik wurde validiert und ist routinetauglich. Ausgehend von einer Probenmenge von 200 mg können innerhalb desselben Analysengangs sowohl polare als auch unpolare Retinoide bestimmt werden. Die Nachweisgrenze für *all-trans*-Retinsäure liegt bei ca. 0,3 ng/g Gewebe. Die Methodik wurde auf ein großes Spektrum biologischer Proben verschiedener Spezies angewandt. Endogene Gehalte polarer und unpolarer Retinoide wurden in Plasma, Niere, Leber, Gehirn, Plazenta, fetalen Geweben und Embryonen von Nagern (Mäuse und Ratten) und in humanen Leber- und Plasma-Proben bestimmt. Vielfach wurden die endogenen Spiegel der polaren Retinoide im Rahmen dieser Arbeit erstmalig bestimmt.

Im Rahmen der Messungen konnte insbesondere in Lebern von Mäusen und Ratten ein neuer Vitamin-A-Metabolit detektiert werden. Untersuchungsergebnisse zum Isomerisierungs- und chromatographischen Retentions-Verhalten, sowie aufgenommene UV-, ESI-MS<sup>n</sup>- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren deuten auf 9-*cis*-4-oxo-13,14-dihydro-Retinsäure hin. Dieser neuentdeckte Metabolit konnte auch in einer humanen Leber detektiert werden. In einer Fütterungsstudie in Mäusen konnte gezeigt werden, daß dieser Metabolit bei einer gesteigerten Vitamin-A-Zufuhr in Serum, Leber und Niere deutlich erhöhte Konzentrationen aufweist. Interessanterweise führte die subchronische Exposition mit erhöhten Mengen Retinylpalmitat aber auch zu verringerten all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln in Serum und Niere.

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) zeigt einen beachtlichen Einfluß auf den Stoffwechsel von unpolaren und –wie hier erstmals gezeigt- polaren Retinoiden in Ratte und Maus. TCDD-belastete Ratten und Mäuse wiesen drastisch verringerte hepatische Konzentrationen des neuentdeckten Metaboliten auf. Ratten zeigten niedrigere 9,13-di-*cis*-Retinsäure-Spiegel im Serum und höhere all-*trans*-Retinsäure-Spiegel in Niere, Leber und Serum. Untersuchungen mit verschiedenen Retinoid-Bindeprotein-*Knock-Out*-Mäusen haben gezeigt, daß das zelluläre Retinol-bindende Protein CRBP-I Retinol vor einer übermäßigen Oxidation durch TCDD-induzierte Enzyme schützen kann. Eine pränatale TCDD-Exposition in trächtigen Ratten bewirkte leichte, aber signifikante Änderungen fetaler und embryonaler Retinoid-Spiegel. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnte unter Berücksichtigung relevanter Erkenntnisse aus der Literatur eine Hypothese aufgestellt werden, die den Mechanismus einer Störung des Vitamin-A-Metabolismus durch TCDD erklärt. Demnach führt die Induktion TCDD-abhängiger Enzyme zu einem gesteigerten Metabolismus von Retinol. Steigende all-*trans*-Retinsäure-Spiegel können ihrerseits sowohl durch eine Autoinduktion ihres Abbaus als auch durch TCDD-induzierte Enzyme teilweise ausgeglichen werden. Im Netto ergibt sich eine erhöhte Oxidation und Ausscheidung von Retinoiden bei höheren (Ratte) oder unveränderten (Maus) all-*trans*-Retinsäure-Spiegeln. Die einschneidende Störung des Metabolismus von all-*trans*-Retinsäure in TCDD-belasteten Ratten weist darauf hin, daß eine TCDD-Belastung über veränderte all-*trans*-Retinsäure-Spiegel möglicherweise die Transkription einer Vielzahl von Genen verändern kann. Die Beeinflussung der Homöostase von Vitamin A durch TCDD kann damit signifikant zur Gesamtoxizität von TCDD beitragen.

In zukünftigen Studien muß gezeigt werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Einflüsse einer TCDD-Exposition auf endogene Retinoid-Spiegel auch zu einer Veränderung biologischer Retinoid-abhängiger Regulationsvorgänge führen und ob bestimmte Effekte einer TCDD-Exposition auch wirklich auf einen veränderten Vitamin-A-Stoffwechsel

zurückgeführt werden können. Die entwickelte Methodik stellt dabei für folgende Studien das notwendige Handwerkszeug zur sensitiven Bestimmung von polaren und unpolaren Retinoiden in den unterschiedlichsten biologischen Matrices zur Verfügung.

## 7 Experimentelles

### E-1 Synthese von 9-*cis*-4-OH-Retinsäure (nach *Evans et al.* (165))

#### Geräte:

Waage: MC 210 P, Sartorius

#### Chemikalien:

9-*cis*-Retinsäure (Geschenk von Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz)

1,4-Dioxan, puriss., absolut, Fluka

Selendioxid, purum, Fluka

Diethylether, Uvasol, Merck

Petrolether, puriss. p.a. ACS, Fluka

Kieselgel 60, 230-400 mesh (Merck)

DC-Platte: Kieselgel auf Aluminiumfolie PF<sub>254</sub> (Merck)

#### Arbeitsvorschrift:

Zu einer Lösung aus 9-*cis*-Retinsäure (51 mg) in 1,4-Dioxan (2 mL) wird bei 60 °C (Heizbad) SeO<sub>2</sub> (19 mg) gegeben. Die Lösung wird bei dieser Temperatur 3 Stunden gerührt. Im Anschluß wird die Reaktionsmischung über ein Kieselgelbett gefiltert. Das Filtrat wird konzentriert und der Rückstand einer *Flash*-Säulen-Chromatographie (5 g Kieselgel, 75 % Diethylether in Petrolether) zugeführt. Die erhaltenen Fraktionen (1 mL) werden mittels Dünnschichtchromatographie überprüft (Kieselgel, 75 % Diethylether in Petrolether, R<sub>f</sub> = 0,25) und entsprechende Fraktionen werden vereinigt. Nach einer Vakuumkonzentration wird der Rückstand in einer Mischung aus Methanol und Wasser (1:1) aufgenommen und mit dem in Abschnitt E-14 beschriebenen HPLC-System weiter aufgereinigt.

### E-2 Gehaltsbestimmung der Retinoide im UV-Bereich

#### Geräte:

Waage: MC 210 P, Sartorius

Spektrometer: UV/vis-Spektrometer Lambda Bio 20 (Perkin Elmer)

Küvetten: Quarzglas Suprasil mit 1 cm Schichtdicke

spektrale Breite: 1 nm; Bereich des Absorptionsspektrums: 250-400 nm

#### Chemikalien:

Ethanol, Uvasol (Merck)

all-*trans*-Retinsäure; 13-*cis*-Retinsäure, 9-*cis*-Retinsäure, all-*trans*-Retinol, all-*trans*-Retinal, all-*trans*-Retinylpalmitat, all-*trans*-Retinylacetat (alle Sigma), andere Retinoide (vgl. Abschnitt 3.3)



Arbeitsvorschrift:

Zur Gehaltsbestimmung im UV-Bereich werden ausgehend von der jeweiligen Festsubstanz zunächst Stammlösungen in Ethanol mit einer ungefähren Konzentration von 0,1 mg/mL für die polaren und von 1 mg/mL für die unpolaren Retinoide hergestellt. Diese Lösungen werden anschließend jeweils dreimal im Verhältnis 1:50 (polare Retinoide) bzw. 1:500 (unpolare Retinoide) mit Ethanol verdünnt und dann mit dem UV/vis-Spektrometer vermessen.

**E-3 Umgang mit Retinoiden und Proben**Geräte:

Gefrierschrank GS 5203-10, Liebherr (-30 °C)

Gefrierschrank 500 I GFL 6485-85C, GFL (-80 °C)

Arbeitsweise und Lagerung:

Aufgrund der Labilität der Retinoide wird mit Standardsubstanzen und Proben nur in abgedunkelten Räumen und unter Gelblicht gearbeitet. Retinoid-Standardlösungen und Standardsubstanzen werden bei -30 °C gelagert. Biologische Proben werden nach Erhalt unverzüglich bei -80 °C in einer Argon- oder Stickstoff-Atmosphäre gelagert und kurz vor der Analyse bei -30 °C aufbewahrt.

**E-4 Reinigung von Glasgeräten**Geräte:

MilliQ PF Plus Reinstwasseranlage mit Elix 3 Elektroionisierungssystem, Waters

MIELABOR G7783 MULTITRONIC mit AQUA PURIFIKATOR G7795, Miele

Ofen: Competence mit Pyrolysefunktion, AEG

Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Spülmittel RBS Solid Konzentrat, Carl Roth GmbH & Co.

Arbeitsvorschrift:

Zu reinigende Glasgeräte werden in der Spülmaschine (Miele) unter Verwendung des Spülmittel-Konzentrats bei 93 °C gespült. Im Anschluß werden alle Glasgeräte dann noch jeweils zweimal mit Wasser und Methanol ausgespült und schließlich unter Pyrolyse im Ofen für 2,5 Stunden ausgeheizt.

**E-5 Flüssig-Extraktion: Chloroform/Methanol-System**Geräte:

Vortexer: REAX 2000 Heidolph

Schüttler: KS 125 basic mit Reagenzglasaufnahme (Einsätze für Gefäße mit einem Innendurchmesser von 12 oder 16 mm, IKA Labortechnik

Waage:	Sartorius handy, Sartorius
Zentrifuge:	CS 15R Centrifuge mit Festwinkelrotor FO850 in Verbindung mit COREX-Gläsern (15 mL), Beckman
Homogenisator:	Potter S, Homogenisatorgefäß 5 mL, Teflonkolben, B. Braun Biotech
Pipetten:	Eppendorf Reference 1000 µL und 2500 µL, Eppendorf Microman Classic M250, Gilson

Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Chloroform (stab. mit 1 % Ethanol), Uvasol, Merck

Ethanol, ROTIPURAN, Carl Roth GmbH & Co.

Interne Standard-Lösung: 20 ng/mL RO 101670, 1000 ng/mL Retinylnonanoat in EtOH  
bzw. für Leber-Proben: 20 ng/mL RO 101670, 10<sup>5</sup> ng/mL Retinylnonanoat in EtOH

Verbrauchsmaterial:

Rotilabo-Lamellen-Griffstopfen, 16 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Fiolax-Reagenzgläser, 12 x 100 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Pasteurpipetten, Carl Roth GmbH & Co.

Arbeitsvorschrift:

Etwa 300 mg Gewebe werden mit etwa 300 µL Wasser homogenisiert. Steht für eine Analyse weniger Gewebe zur Verfügung kann die Homogenisierung mit einem größeren Wasseranteil erfolgen. 400 µL des Homogenats (oder 400 µL Plasma) werden dann mit der Microman-Classic-Pipette (speziell für viskose Lösungen konzipiert) in ein COREX-Glas überführt, in welchem 2 mL Methanol, 1 mL Chloroform, 400 µL Wasser und 100 µL des internen Standards vorgelegt sind. Nach Verschließen mit einem Lamellen-Griffstopfen und kurzem Vortexen wird das Gemisch für 5 Minuten geschüttelt. Im Anschluß werden zu dem Gemisch 1 mL Chloroform und dann 1 mL Wasser pipettiert und das Gemisch wird nach erneutem Verschließen mit einem Lamellen-Griffstopfen und kurzem Vortexen, weitere 5 Minuten geschüttelt. Danach wird das COREX-Glas in die Zentrifuge gestellt und bei 10000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die untere Chloroform-Phase wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Fiolax-Reagenzglas überführt.

## **E-6 Flüssig-Extraktion: 2-Propanol/Chloroform-System**

Geräte:

Vortexer: REAX 2000 Heidolph

Schüttler: KS 125 basic mit Reagenzglasaufnahme (Einsätze für Gefäße mit einem Innendurchmesser von 12 oder 16 mm, IKA Labortechnik

Waage: Sartorius handy, Sartorius

---

Zentrifuge:	CS 15R Centrifuge mit Festwinkelrotor FO850 in Verbindung mit COREX-Gläsern (15 mL), Beckman
Homogenisator:	Potter S, Homogenisatorgefäß 5 mL, Teflonkolben, B. Braun Biotech
Pipetten:	Eppendorf Reference 1000 $\mu$ L und 2500 $\mu$ L, Eppendorf Microman Classic M250, Gilson
Dispenser:	EM-Dispenser 0,4-2 mL, Hirschmann

Chemikalien:

2-Propanol, Uvasol, Merck

Chloroform (stab. mit 1 % Ethanol), Uvasol, Merck

Ethanol, ROTIPURAN, Carl Roth GmbH & Co.

Interne Standard-Lösung: 20 ng/mL RO 101670, 1000 ng/mL Retinylnonanoat in EtOH  
bzw. für Leber-Proben: 20 ng/mL RO 101670, 10<sup>5</sup> ng/mL Retinylnonanoat in EtOH

Verbrauchsmaterial:

Rotilabo-Lamellen-Griffstopfen, 12 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Rotilabo-Lamellen-Griffstopfen, 16 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Fiolax-Reagenzgläser, 12 x 100 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Pasteurpipetten, Carl Roth GmbH & Co.

Arbeitsvorschrift:

Etwa 300 mg Gewebe werden mit etwa 300  $\mu$ L Wasser homogenisiert. Steht für eine Analyse weniger Gewebe zur Verfügung kann die Homogenisierung mit einem größeren Wasseranteil erfolgen. 400  $\mu$ L des Homogenats (oder 400  $\mu$ L Plasma) werden dann mit der Microman-Classic-Pipette (speziell für viskose Lösungen konzipiert) in ein COREX-Glas überführt, in welchem 1,6 mL 2-Propanol und 100  $\mu$ L des internen Standards vorgelegt sind. Nach Verschließen mit einem Lamellen-Griffstopfen und kurzem Vortexen wird das Gemisch für 5 Minuten geschüttelt. Danach wird das COREX-Glas in die Zentrifuge gestellt und bei 10000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Fiolax-Reagenzglas überführt. Im Anschluß werden zu dem Gemisch 3,2 mL Chloroform pipettiert und das Gemisch wird nach Verschließen mit einem Lamellen-Griffstopfen und kurzem Vortexen, weitere 5 Minuten geschüttelt. Die entstehende Emulsion wird über einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 g und 4 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Zur weiteren Abarbeitung mit dem ASPEC XLi ist es nicht nötig, die wässrige Phase abzunehmen, da die organische Phase mit der ASPEC-Nadel automatisch unter der wässrigen Phase abgesaugt wird.

**E-7 Festphasenextraktion mit Aminopropyl-Säulen (ASPEC XLi)**Geräte:

ASPEC XLi mit Dilutor 402 dual (10-mL- und 1-mL-Spritze) und Extraktionsset für 3-mL-Säulen, Steuereinheit mit M721-Software

Magnetrührer IKAMAG RH, Omnilab

Chemikalien:

n-Hexan, Uvasol, Merck

Chloroform (stab. mit 1 % Ethanol), Uvasol, Merck

2-Propanol, Uvasol, Merck

Essigsäure, für die Spurenanalyse, Mallinckrodt-Baker

Verbrauchsmaterial:

Fiolax-Reagenzgläser, 12 x 75 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Bakerbond spe Säulen NH<sub>2</sub>, 3 mL, 500 mg, Mallinckrodt-Baker

Dichtscheiben für 3 mL DEC, Gilson

Arbeitsvorschrift:

Die Lösungsmittel werden in ein Becherglas gegeben und durch Rühren mit dem Magnet- rührer gemischt. Eine Mischung in den Flaschen des ASPEC empfiehlt sich nicht, da über die Dichtungen der Flaschen Kontaminationen eingetragen werden.

Je nach vorangehender Flüssigextraktion (E-5 und E-6) unterscheiden sich die Arbeits- vorschritten der automatischen Festphasenextraktion leicht:

*Chloroform/Methanol-System*

1. Konditionieren mit 2 mL n-Hexan, Flußrate: 6 mL/min
2. Probenaufgabe von 2 mL und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas), Flußrate: 3 mL/min
3. 1. Elution mit 4 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas), Flußrate: 2 mL/min
4. 2. Elution mit 3 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) mit 3 % Essigsäure (v/v) und Sammeln des Eluats (2. Fiolax-Reagenzglas), Flußrate 2 mL/min

*2-Propanol/Chloroform-System*

1. Konditionieren mit 2 mL n-Hexan, Flußrate: 6 mL/min
2. Probenaufgabe von 4,6 mL und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas), Flußrate: 3 mL/min
3. 1. Elution mit 1 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas), Flußrate: 2 mL/min
4. 2. Elution mit 3 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) mit 3 % Essigsäure (v/v) und Sammeln des Eluats (2. Fiolax-Reagenzglas), Flußrate 2 mL/min

Zwischen jedem Schritt wird die Nadel mit Hexan gespült. Das genaue Programm-Schema des ASPEC für den Fall des 2-Propanol/Chloroform-Systems zeigt die nächste Seite.

```

*****
Gilson Sampler Controller Software
721 v2.11
*****
NAME : FILE15.LST 2-11-1997 8:16a
CONFIGURATION sampler
  Model : ASPECi
  Arm : 183mm
  Rinsing station depth(mm) : 80
  Rinsing station positions : A and B
  R. inject. loop vol. (ul) : 100
  Calib. tubing volume(ul) : 7
  Transfer ports : No
  ID number : 10
CONFIGURATION dilutor 402 dual
  L. syr. volume (ul) : 10000
  R. syr. volume (ul) : 1000
  Transfer tubing (ul) : 10000
  ID number : 0
CONFIGURATION default parameters
  Air gap volume (ul) : 38
  Air gap asp. flow. (ml/min) : 1.00
  Reservoir asp. flow. (ml/min): 20.00
  Prime disp. flow. (ml/min) : 60.00
  Injection flush volume(ul) : 20
  Inside rinsing volume (ul) : 1000
  Inside rinsing flow. (ml/min): 20.00
  Outside rinsing volume (ul) : 1000
  Outside rinsing flow.(ml/min): 20.00
  Immersion rinse(mm) : 80
  Level detecting sensitivity : 5
  Analog input range (mV) : 100
OPTIONS
  Audit trail : Off
DEVICES
  606 GSIOC/RS232 : NO
CALIBRATION
  Calibrate : NO
TRAY racks
  Rack | 21 | 61 |103 |103 |103 |
  Pattern| Z | I | Z | Z | Z |
TRAY zones
ZONE FIRST LAST LLD
SAMPLE_A 1 4 Off
SAMPLE_B 5 8 Off
SAMPLE_C 9 12 Off
SOLVENT_A 61 61 Off
SOLVENT_B 62 62 Off
SOLVENT_C 63 63 Off
SOLVENT_D 64 64 Off
COLLECT1_A 65 68 Off
COLLECT1_B 69 72 Off
DEC1 65 68 None
COLLECT2_A 85 88 Off
COLLECT2_B 89 92 Off
DEC2 85 88 None
COLLECT3_A 105 108 Off
COLLECT3_B 109 112 Off
DEC3 105 108 None

ZONE VIAL I.D. TOTAL VOL
SAMPLE_A 11.3mm 9000ul
SAMPLE_B 11.3mm 9000ul
SAMPLE_C 11.3mm 9000ul
SOLVENT_A 57.7mm 250000ul
SOLVENT_B 57.7mm 250000ul
SOLVENT_C 57.7mm 250000ul
SOLVENT_D 57.7mm 250000ul
COLLECT1_A 9.5mm 5000ul
COLLECT1_B 9.5mm 5000ul
DEC1 9.5mm 5000ul
COLLECT2_A 9.5mm 5000ul
COLLECT2_B 9.5mm 5000ul
DEC2 9.5mm 5000ul
COLLECT3_A 9.5mm 5000ul
COLLECT3_B 9.5mm 5000ul
DEC3 9.5mm 5000ul

```

```

ZONE DEPTH HEIGHT
SAMPLE_A - -2.8mm
SAMPLE_B - -2.8mm
SAMPLE_C - -2.8mm
SOLVENT_A - 0.0mm
SOLVENT_B - 0.0mm
SOLVENT_C - 0.0mm
SOLVENT_D - 0.0mm
COLLECT1_A - 0.0mm
COLLECT1_B - 0.0mm
COLLECT2_A - 0.0mm
COLLECT2_B - 0.0mm
COLLECT3_A - 0.0mm
COLLECT3_B - 0.0mm
1-Begin loop
2-CONDITION
----- Dec zone -----
Zone name : DEC1
Press. equilib. time (min): 0.10
----- Solvent zone -----
Zone name : SOLVENT_A
Volume (ml) : 2.00
Disp. flow. (ml/min): 6.00
Asp. flow. (ml/min) : 6.00
Extra. Vol. (ul) : 0
----- Air Push Volume -----
Air push volume (ml): 0.00
Asp. flow (ml/min) : 6.00
Disp. flow (ml/min) : 3.00
Press. equilib. time (min): 0.10
3-LOAD & COLLECT
----- Dec zone -----
Zone name : DEC1
Press. equilib. time (min): 0.10
----- Sample zone -----
Zone name : SAMPLE_A
Volume (ml) : 4.60
Disp. flow. (ml/min): 2.00
Asp. flow. (ml/min) : 6.00
Extra. Vol. (ul) : 0
----- Air Push Volume -----
Air push volume (ml): 0.00
Asp. flow (ml/min) : 6.00
Disp. flow (ml/min) : 6.00
Press. equilib. time (min): 0.10
4-ELUTE
----- Collect zone -----
Zone name : COLLECT1_A
Press. equilib. time (min): 0.10
----- Solvent zone -----
Zone name : SOLVENT_B
Volume (ml) : 1.00
Disp. flow. (ml/min): 2.00
Asp. flow. (ml/min) : 6.00
Extra. Vol. (ul) : 0
----- Air Push Volume -----
Air push volume (ml): 0.00
Asp. flow (ml/min) : 6.00
Disp. flow (ml/min) : 6.00
Press. equilib. time (min): 0.10
5-ELUTE
----- Collect zone -----
Zone name : COLLECT1_B
Press. equilib. time (min): 0.10
----- Solvent zone -----
Zone name : SOLVENT_C
Volume (ml) : 3.00
Disp. flow. (ml/min): 2.00
Asp. flow. (ml/min) : 6.00
Extra. Vol. (ul) : 0
----- Air Push Volume -----
Air push volume (ml): 0.25
Asp. flow (ml/min) : 6.00
Disp. flow (ml/min) : 3.00
Press. equilib. time (min): 0.10
6-End loop

```

**E-8 Festphasenextraktion mit PLMs**Geräte:

Pipetten: Eppendorf Reference 1000  $\mu\text{L}$  und 2500  $\mu\text{L}$ , Eppendorf

Chemikalien:

n-Hexan, Uvasol, Merck

Chloroform (stab. mit 1 % Ethanol), Uvasol, Merck

2-Propanol, Uvasol, Merck

Essigsäure, für die Spurenanalyse, Mallinckrodt-Baker

Verbrauchsmaterial:

Fiolax-Reagenzgläser, 12 x 100 mm, Carl Roth GmbH & Co.

SPEC, NH<sub>2</sub> – Aminopropyl, 3 mL, 15 mg, ANSYS Diagnostics, Inc.

Arbeitsvorschrift:

Die SPEC-Säulen werden in die Fiolax-Reagenzgläser gehängt und die Lösungsmittel laufen über die Schwerkraft durch das Säulenbett.

*Chloroform/Methanol-System*

1. Konditionieren mit 4 mL n-Hexan
2. Probenaufgabe von 2 mL und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas),
3. 1. Elution mit 0,5 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas)
4. 2. Elution mit 0,5 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) mit 3 % Essigsäure (v/v) und Sammeln des Eluats (2. Fiolax-Reagenzglas)

*2-Propanol/Chloroform-System*

1. Konditionieren mit 4 mL n-Hexan
2. Probenaufgabe von 4,6 mL und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas),
3. 1. Elution mit 0,5 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) und Sammeln des Eluats (1. Fiolax-Reagenzglas)
4. 2. Elution mit 0,5 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) mit 3 % Essigsäure (v/v) und Sammeln des Eluats (2. Fiolax-Reagenzglas)

**E-9 Vakuumkonzentration der Eluate aus der Festphasenextraktion**Geräte:

Rotations-Vakuum-Konzentrator Alpha RVC mit Rotor für Gefäße mit 12 mm ID, Kühlfalle Alpha 1-4, Vakuumpumpe RF2, Christ

Vortexer REAX 2000, Heidolph

Chemikalien:

Stickstoff 5.0, Linde AG

Verbrauchsmaterial:

Rotilabo-Lamellen-Griffstopfen, 12 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Fiolax-Reagenzgläser 12 x 75 mm, Carl Roth GmbH & Co.

Arbeitsvorschrift:

Die Fiolax-Reagenzgläser mit den Eluaten der Festphasenextraktion werden in den Rotor gestellt, der in den Vakuum-Konzentrator Alpha RVC eingesetzt wird. Im Falle von Leber-Proben wird das Fiolax-Reagenzglas mit dem Eluat der unpolaren Retinoide zunächst gevortext. 1 mL dieses Eluats werden in ein neues Fiolax-Reagenzglas pipettiert. Anschließend erfolgt eine Vakuumkonzentration bei 30 °C und 1 mbar bis zur Trockene. Je nach Matrix beträgt die Dauer dieses Schrittes bei Verwendung der unter Abschnitt E-7 (2-Propanol/Chloroform-System) beschriebenen Festphasenextraktion 35-75 Minuten. Der Vakuumkonzentrator wird dann mit Stickstoff belüftet. Bei fortdauerndem Stickstoffstrom werden die Fiolax-Reagenzgläser mit den Griffstopfen verschlossen.

**E-10 Wiederaufnahme der Rückstände nach der Vakuumkonzentration**Geräte:

- Vortexer: REAX 2000 Heidolph  
Schüttler: KS 125 basic mit Reagenzglasaufnahme (Einsätze für Gefäße mit einem Innendurchmesser von 12 oder 16 mm, IKA Labortechnik  
Ultraschall: Sonorex Super RK 100 SH, Bandelin  
Pipetten: Pipetman P100 und P200, F 100 und F200, Gilson

Chemikalien:

- Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Biochemica MikroSelect, Fluka

Verbrauchsmaterial:

- Mikroeinsatz G30s, CS-Chromatographie Service GmbH  
Flasche R1, braun – 3 mm, k. Hals, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH  
Schraubkappe G8-L, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH  
Dichtscheibe G8-Sil/gs, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH  
Flasche G1, braun, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH  
Bördelkappe R11-1,3, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Arbeitsvorschrift:

Nach der Vakuumkonzentration werden die Rückstände im Falle der polaren Retinoide zunächst in 100 µL Methanol, für die unpolaren Retinoide in 20 µL Chloroform gelöst. Nach Zugabe der Lösungsmittel werden die Fiolax-Reagenzgläser sofort wieder mit den Griffstopfen verschlossen und zunächst einige Zeit im Schüttler bewegt. Im Anschluß werden die Gläser gevortext, einen kurzen Moment in ein Ultraschallbad gehalten und wieder in den Schüttler gestellt. Es folgt bei den polaren Retinoiden eine Zugabe von 100 µL PBS-Lösung, bei den unpolaren Retinoiden werden 180 µL Acetonitril zugesetzt. Die Gläser werden nach

erneutem Verschließen gevortext. In einem letzten Schritt werden die Proben in braune Probengläser mit Mikroglaseinsätzen pipettiert und in den jeweiligen Autosampler gestellt.

### **E-11 HPLC-Methode zur Bestimmung der unpolaren Retinoide (binäres Eluentengemisch)**

#### Geräte:

Autosampler:	Triathlon, Spark, Holland, Probenschleife 500 µL, Spritze: 250 µL
System-Controller:	HPLC-Programmer 50, Knauer
Pumpen:	HPLC Pump K-500, Knauer
Säulenofen:	CTO-10ASvp, Shimadzu
Degaser:	Gastorr 152 Online Degassing Device
Detektor:	UV-Detektor, SPD-10A, Shimadzu
Rückdruckregler:	SSI Durchfluß-Rückdruckregler, Supelco
Mischkammer:	Dynamic Mixing Chamber, Knauer
Integrator:	CR4A Chromatopac, Shimadzu
Auswertung:	Class LC-10-Software nach Daten-Konvertierung mit CR4AMON, Shimadzu

#### Chemikalien:

Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Chloroform (enthält 1 % Ethanol), ROTISOLV HPLC, Carl Roth GmbH & Co.

Helium 5.0, Linde

Ethanol, ROTIPURAN, Carl Roth GmbH & Co.

Kontaktlinsen-Reiniger, Total Care, Allergan

#### Verbrauchsmaterial:

Säule: 4.6 mm x 150 mm YMC J'sphere ODS-H80, 4 µm Partikel, YMC

Vorsäule: Security Guard, C18 ODS, 4 mm L x 3 mm ID, Phenomenex

#### Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Acetonitril

Eluent B: Chloroform/Acetonitril (1:1, v/v)

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 5 °C

Detektion: 325 nm (Kontrollwellenlänge: 340 nm), 0.0050 AUFS, AuxRange 1

Injektion: µL Pick-Up, 120 µL Injektionsvolumen (bei Leber-Proben 10 µL),  
Programmdauer 35,5 min, Waschschrift zwischen den Vials 500 µL,



Waschlösung Ethanol; Rack-Temperatur 10 °C, Kapillarverbindung Nadel-Ventil: 15 µL, mit Luftsegmenten

Flußrate: 1,5 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	0
2,5	0
5	15
10	45
16	75
22	80
25	99
26	99
27	0

Bei den Verbindungskapillaren (0,17 mm ID) sollte auf das Material Polyetheretherketon (PEEK) verzichtet werden, da dieses Material bei der Verwendung mit Chloroform spröde wird (381). Nach der Injektion einer Vielzahl von Proben kann es in der UV-Detektorzelle zu Ablagerungen kommen, die im Chromatogramm eine beträchtliche Drift bewirken. Diese Ablagerungen können nach dem Ausbau der Linsen sehr einfach mit einem Kontaktlinsen-Reiniger entfernt werden.

## **E-12 HPLC-Methode zur Bestimmung der unpolaren Retinoide (ternäres Eluentengemisch) – Routine-Methode**

### Geräte:

Autosampler: Triathlon, Spark, Holland, Probenschleife 500 µL, Spritze: 250 µL  
 System-Controller: HPLC-Programmer 50, Knauer  
 Pumpen: HPLC Pump K-500, Knauer  
 Säulenofen: CTO-10ASvp, Shimadzu  
 Degaser: Gastorr 152 Online Degassing Device  
 Detektor: UV-Detektor, SPD-10A, Shimadzu  
 Rückdruckregler: SSI Durchfluß-Rückdruckregler, Supelco  
 Mischkammer: Dynamic Mixing Chamber, Knauer  
 Integrator: CR4A Chromatopac, Shimadzu  
 Auswertung: Class LC-10-Software nach Daten-Konvertierung mit CR4AMON, Shimadzu

### Chemikalien:

Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
 Chloroform (enthält 1 % Ethanol), ROTISOLV HPLC, Carl Roth GmbH & Co.  
 Helium 5.0, Linde AG

Ethanol, ROTIPURAN, Carl Roth GmbH & Co.

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Rinderserumalbumin (BSA), Sigma

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), BioChemica Microselect, Fluka

Kontaktlinsen-Reiniger, Total Care, Allergan

Verbrauchsmaterial:

Säule: 4.6 mm x 150 mm YMC J'sphere ODS-H80, 4 µm Partikel, YMC

Vorsäule: Security Guard, C18 ODS, 4 mm L x 3 mm ID, Phenomenex

Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Methanol/Acetonitril (85:15 v/v)

Eluent B: Chloroform/Acetonitril (1:1, v/v)

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 5 °C

Detektion: 325 nm (Kontrollwellenlänge: 340 nm), 0.0050 AUFS, AuxRange 1

Injektion: µL Pick-Up, 120 µL Injektionsvolumen (bei Leber-Proben 10 µL),  
 Programmdauer 35,5 min, Waschschrift zwischen den Vials 500 µL,  
 Waschlösung Ethanol; Rack-Temperatur 10 °C, Kapillarverbindung Nadel-  
 Ventil: 15 µL, mit Luftsegmenten, Transport-Flüssigkeit: Acetonitril

Flußrate: 1,5 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	0
2,5	0
5	15
10	45
16	75
22	80
25	99
26	99
27	0

Bei den Verbindungskapillaren (0,17 mm ID, Edelstahl) sollte auf das Material Polyetheretherketon (PEEK) verzichtet werden, da dieses Material bei der Verwendung mit Chloroform spröde wird (381). Nach der Injektion einer Vielzahl von Proben kann es in der UV-Detektorzelle zu Ablagerungen kommen, die im Chromatogramm eine beträchtliche Drift hervorrufen. Diese Ablagerungen können nach dem Ausbau der Linsen sehr einfach mit einem Kontaktlinsen-Reiniger entfernt werden. Um die Säule zu schützen wird eine Vorsäule

verwendet (Security Guard System, Phenomenex). Die entsprechende Kartusche wird alle 48 Injektionen gewechselt. Das Verweilvolumen beträgt 1690  $\mu\text{L}$ .

### **E-13 Vergleich unterschiedlicher Säulen-Innendurchmesser bei der Analytik von polaren Retinoiden**

#### Geräte:

Injektionsventil:	Cheminert Model C1, Valco Instruments Co. Inc. mit 1- $\mu\text{L}$ -Probenschleife (FMS-VL-01), LC Packings
System-Controller:	SCL-10A <sup>VP</sup> , Shimadzu
Pumpen:	LC-10AD, Shimadzu
Säulenofen:	CTO-10A <sup>VP</sup> , Shimadzu
Degaser:	Degasys DG-1200, Uniflows, VDSoptilab
Detektor:	UV-Detektor, SPD-10AV <sup>VP</sup> , Shimadzu
Flußzellen:	I Standard-Flußzelle (10 mm, 8 $\mu\text{L}$ ), Shimadzu II Semi-micro-Flußzelle (5 mm, 2,5 $\mu\text{L}$ ), Shimadzu III Mikroflußzelle UZ-SH-MIC (8 mm, 140 nL), LC Packings Zelle I in Verbindung mit der 4-mm-Säule Zelle II in Verbindung mit der 2-mm- und 3-mm-Säule Zelle III in Verbindung mit der 1-mm-Säule
Flow-Splitter:	Acurate <sup>TM</sup> IC-400-VAR mit Calibrator CAL-400-1.0, LC Packings (nur bei Verwendung der 1-mm-Säule)
Rückdruckregler:	SSI Durchfluß-Rückdruckregler, Supelco
Mischkammer:	SUS Mixer, Shimadzu, 0,5 mL
Auswertung:	CLASS-VP 5.0 Software, Shimadzu

#### Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Ammoniumacetat, zur Analyse, Merck

Helium 5.0, Linde AG

#### Verbrauchsmaterial:

Säulen:	4 mm x 125 mm, Spherisorb ODS2, 3 $\mu\text{m}$ Partikel, CS-Chromatographie Service GmbH
	3 mm x 125 mm, Spherisorb ODS2, 3 $\mu\text{m}$ Partikel, CS-Chromatographie Service GmbH
	2.1 mm x 125 mm, Spherisorb ODS2, 3 $\mu\text{m}$ Partikel, Macherey-Nagel
	1 mm x 150 mm, Spherisorb ODS2, 3 $\mu\text{m}$ Partikel, Waters

Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Methanol/60 mM Ammoniumacetat in Wasser (1:1, v/v)

Eluent B: Methanol

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 60 °C

Detektion: 340 nm, Response 1, Sampling Frequency 2 Hz

Injektion: 1 µL, manuell

Flußrate: 4-mm-Säule: 0,7 mL/min

3-mm-Säule: 0,39 mL/min

2.1-mm-Säule: 0,2 mL/min

1-mm-Säule: 45 µL/min (Flow-Splitter)

Gradientenprogramm für 2,1-mm-, 3-mm- und 4-mm-Säulen:

Zeit [min]	% B
0	15
11	90
11,2	99
15	99
16	15

Gradientenprogramm für die 1-mm-Säule:

Zeit [min]	% B
0	15
12,8	90
13	99
16	99
17	15

Für die Verbindungskapillaren wird durchgehend Polyetheretherketon-Material (PEEK) verwendet (vor der Säule: 0,17 mm ID, nach der Säule 0,1 mm ID).

#### **E-14 HPLC-Methode zur Bestimmung der polaren Retinoide - Routine-Methode**

Geräte:

Autosampler: AS-4000, Intelligent Auto Sampler, Probenschleife 200 µL,

Dilutor-Spritze: 0,5 mL, Merck-Hitachi

System-Controller: SCL-10A<sup>VP</sup>, Shimadzu

Pumpen: LC-10AD, Shimadzu

Säulenofen: CTO-10A<sup>VP</sup>, Shimadzu

---

Degaser:	Degasys DG-1200, Uniflows, VDSoptilab
Detektor:	UV-Detektor, SPD-10AVVP, Shimadzu mit Semi-micro-Flußzelle (5 mm, 2,5 µL), Shimadzu
Rückdruckregler:	SSI Durchfluß-Rückdruckregler, Supelco
Mischkammer:	SUS Mixer, Shimadzu, 0,5 mL
Auswertung:	CLASS-VP 5.0 Software, Shimadzu
pH-Meter:	pH 538 WTW mit Elektrode Typ E56 WTW
Magnetrührer:	IKAMAG RH, Omnilab

Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Ammoniumacetat, zur Analyse, Merck

Helium 5.0, Linde AG

Essigsäure, für die Spurenanalyse, Mallinckrodt-Baker

Rinderserumalbumin (BSA), Sigma

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), BioChemica Microselect, Fluka

Kontaktlinsen-Reiniger, Total Care, Allergan

Verbrauchsmaterial:

Säule: 2.1 mm x 150 mm, Spherisorb ODS2, 3 µm Partikel, Waters

Vorsäule: Security Guard, C18 ODS, 4 mm L x 2 mm ID, Phenomenex

Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Methanol/60 mM Ammoniumacetat in Wasser, pH 5,7 (1:1, v/v)

Eluent B: Methanol

Dabei wird der pH-Wert der Ammoniumacetat-Lösung (60 mM) vor der Zugabe von Methanol mit Eisessig auf pH 5,7 eingestellt.

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 60 °C

Detektion: 340 nm (Kontrollwellenlänge: 356 nm), Response 3, Sampling Frequency 2 Hz

Injektion: *All-Volume*-Technik, Feed Volume: 25 µL, Luftsegmente

1. Injektion von 120 µL Probe (Cycle time: 30 Minuten)

2. Injektion von 300 µL Methanol (Cycle time: 11 Minuten)

Spüllösung im Autosampler: Wasser; Needle Wash Strokes: 2;

Injection Port Wash Strokes 2, Needle Down Speed: 2 (Fast)

Flußrate: 0,25 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	20
21	80
22,5	100
27,5	100
30,5	20
40	20

Für die Verbindungskapillaren wird durchgehend Polyetheretherketon-Material (PEEK) verwendet (vor der Säule: 0,17 mm ID, nach der Säule 0,13 mm ID). Nach der Injektion einer Vielzahl von Proben kann es in der Detektorzelle zu Ablagerungen kommen, die im Chromatogramm in einer beträchtlichen Drift resultieren. Diese Ablagerungen können nach dem Ausbau der Linsen sehr einfach mit einem Kontaktlinsen-Reiniger entfernt werden. Um die Säule zu schützen wird eine Vorsäule verwendet (Security Guard System, Phenomenex). Die entsprechende Kartusche wird alle 48 Injektionen ausgetauscht. Das Verweilvolumen beträgt 625  $\mu$ L.

### E-15 Bestimmung des Verweilvolumens

#### Geräte:

analog Abschnitt E-12 und E-14

#### Chemikalien:

Aceton, für HPLC, Fluka

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

#### Arbeitsvorschrift:

Das Verweilvolumen wird nach *Kromidas* (201) wie folgt bestimmt:

Es wird eine direkte Verbindung zwischen dem Injektionsventil und dem Detektor hergestellt und es werden zwei Eluenten an die jeweilige Gradientenanlage angeschlossen:

Eluent A: Methanol

Eluent B: Methanol mit 1 % Aceton (v/v), um das Gradientenprofil im UV-Detektor sichtbar zu machen.

Als Fluß wird jeweils 0,5 mL/min gewählt.

Es wird der folgende Gradient gefahren:

Zeit [min]	% B
0	0
2,49	0
2,5	100

Die Zeit, die ab Minute 2,5 verstreicht, bis die UV-aktive Substanz (Detektion bei 254 nm) detektiert wird, beschreibt die Verzögerung durch das Verweilvolumen. Aufgrund des vorhandenen Verweilvolumens hat man am Anfang einen isokratischen Lauf, bevor der Gradient wirksam wird. Für das Verweilvolumen gilt dann:

$$\text{Verweilvolumen} = \text{Verzögerungszeit [min]} \cdot \text{Fluß [mL/min]}.$$

## E-16 Bestimmung von Retinoid-Glukuroniden mit $\beta$ -Glukuronidase

### Geräte:

Mixer:	Thermomixer comfort, Eppendorf
Waage:	MC 210 P, Sartorius
pH-Meter:	pH 538 WTW mit Elektrode Typ E56 WTW
Magnetrührer:	IKAMAG RH, Omnilab

### Chemikalien:

$\beta$ -Glukuronidase (isoliert aus *Escherichia coli* K12; Lösung in 50 % Glycerin, pH ca. 6,0), Boehringer Mannheim GmbH

Kaliumdihydrogenphosphat, für die Molekularbiologie, Merck

Di-Natriumhydrogenphosphat, für die Molekularbiologie, Merck

*ortho*-Phosphorsäure, zur Analyse, Merck

Rinderserumalbumin (BSA), Sigma

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), BioChemica Microselect, Fluka

all-*trans*-Retinoyl- $\beta$ -D-Glukuronid (vgl. Abschnitt 3.3)

### Verbrauchsmaterial:

Reaktionsgefäß 1,5 mL aus Polypropylen mit „Safety Cap“, braun, Sarstedt

### Arbeitsvorschrift:

Darstellung Sörensen-Puffer pH 6,5: Es wird eine Mischung aus 38,8 mL einer 1/15 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - und 61,2 mL einer 1/15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wird anschließend mit Phosphorsäure auf pH = 6,5 eingestellt.

450  $\mu\text{L}$  Leberhomogenat (Leber homogenisiert in Sörensen-Puffer, pH 6,5 (1:1)) werden für eine Stunde mit 30  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Glukuronidase-Lösung oder mit Wasser (Kontrolle) bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation wird gestoppt, indem 400  $\mu\text{L}$  dieser Mischung in ein COREX-Glas überführt werden, in welchem 1,6 mL 2-Propanol und 100  $\mu\text{L}$  des internen Standards vorgelegt sind (analog Abschnitt E-6). Die weitere Vorgehensweise entspricht der Routine-Methodik (vgl. Abschnitt 3.7).

### Überprüfung des Assays:

Der Assay wird zweifach überprüft:

a) 225  $\mu\text{L}$  eines 40 ng/mL Standards von all-*trans*-Retinoyl- $\beta$ -D-Glukuronid in BSA (5 % BSA in PBS, vgl. Abschnitt 3.7.5) werden mit 225  $\mu\text{L}$  Sörensen-Puffer (pH 6,5) gemischt.

Diese werden mit  $\beta$ -Glukuronidase, wie oben beschrieben, inkubiert. Nach Stoppen der Inkubation in 2-Propanol und Zentrifugation, wird der Überstand abgenommen und nach Vakuumkonzentration bis zur Trockene (Abschnitt E-9) wieder aufgenommen (Abschnitt E-10). Die anschließende HPLC-Messung erfolgt entsprechend Abschnitt E-14.

b) Ein Leberhomogenat wird mit all-*trans*-Retinoyl- $\beta$ -D-Glukuronid aufgestockt (Endkonzentration 20 ng/mL). Aliquots (450  $\mu$ L) werden anschließend mit  $\beta$ -Glukuronidase oder Wasser (Kontrolle) inkubiert und entsprechend der obigen Arbeitsvorschrift aufgearbeitet. Die Auswertung erfolgt über einen Vergleich der all-*trans*-Retinsäure-Konzentrationen in der Enzym-behandelten Probe und der Kontrolle (unter Berücksichtigung der eingesetzten Glukuronid-Menge).

### **E-17 Methoden zur Trennung von 9,13-di-*cis*-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure**

#### Geräte:

Autosampler:	AS-4000, Intelligent Auto Sampler, Probenschleife 200 $\mu$ L, Dilutor-Spritze: 0,5 mL, Merck-Hitachi
System-Controller:	SCL-10A <sup>VP</sup> , Shimadzu
Pumpen:	LC-10AD, Shimadzu
Säulenofen:	CTO-10A <sup>VP</sup> , Shimadzu
Degaser:	Degasy DG-1200, Uniflows, VDSoptilab
Detektor:	UV-Detektor, SPD-10AV <sup>VP</sup> , Shimadzu mit Mikroflußzelle UZ-SH-MIC (8 mm, 140 nL), LC Packings
Flow-Splitter:	Acurate <sup>TM</sup> IC-400-VAR mit Calibrator CAL-400-1.0, LC Packings
Rückdruckregler:	SSI Durchfluß-Rückdruckregler, Supelco
Mischkammer:	SUS Mixer, Shimadzu, 0,5 mL
Auswertung:	CLASS-VP 5.0 Software, Shimadzu

#### Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
1-Butanol, für die Chromatographie, Merck  
Ammoniumacetat, zur Analyse, Merck  
Essigsäure, für die Spurenanalyse, Mallinckrodt-Baker  
Trifluoressigsäure, Uvasol, für die Spektroskopie, Merck  
Helium 5.0, Linde AG

#### Arbeitsvorschrift:

Alle Eluenten werden für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült.



**Methode A:**

Eluent: Acetonitril/1-Butanol/Methanol/2 % Ammoniumacetat in Wasser/Eisessig  
(67,5:4:10:15,5:3)

Säule: Supelcosil™ ABZ<sup>+</sup>Plus (150 x 1 mm, 3 µm), Supelco, custom packed

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 40 °C

Detektion: 350 nm, Response 3, Sampling Frequency 2 Hz

Flußrate: 100 µL/min

**Methode B:**

Eluent A: Wasser mit 0,2 % Trifluoressigsäure (v/v)

Eluent B: Acetonitril mit 0,2 % Trifluoressigsäure (v/v)

Säule: Hypersil BDS C18 (3 µm, 150 mm x 1 mm), ThermoQuest

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 60 °C

Detektion: 340 nm, Response 3, Sampling Frequency 2 Hz

Flußrate: 40 µL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	60
15	95
21	100
40	100
41	60

**Methode C:**

Eluent A: Acetonitril/Wasser (1:1) mit 0,2 % Trifluoressigsäure (v/v)

Eluent B: Acetonitril mit 0,2 % Trifluoressigsäure (v/v)

Säule: Spherisorb ODS II (3 µm, 150 mm x 1 mm), Waters

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 30 °C

Detektion: 340 nm, Response 3, Sampling Frequency 2 Hz

Flußrate: 40 µL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	0
15	75
20,5	75
21	100
40	100
41	0

Injektion für Methode A bis C:

*All-Volume*-Technik, Feed Volume: 25 µL

Injektion von 120 µL Probe (Cycle time: 30 Minuten)

Injektion von 300 µL Methanol (Cycle time: 11 Minuten)

Spüllösung im Autosampler: Wasser

Für die Verbindungskapillaren wird durchgehend Polyetheretherketon-Material (PEEK) verwendet (vor der Säule: 0,13 mm ID, nach der Säule 0,1 mm ID (LC Packings)).

## **E-18 Untersuchung der optimalen Eluenten-Zusammensetzung für die LC-ESI-MS-Kopplung**

### Geräte:

Pumpe:	L6200-A Intelligent Pump (Merck-Hitachi)
Massenspektrometer:	LCQ mit ESI-Ionenquelle (Finnigan Mat)
Stickstoff-Generator:	Econinert 2 ESP, DWT-GmbH
Waage:	MC 210 P, Sartorius
Glasgeräte:	Probenflaschen 100 mL, Meßkolben 100 mL, Meßzylinder 100 mL

### Chemikalien:

Ammoniumformiat, zur Analyse, Fischer Scientific

Ammoniumacetat, zur Analyse, Merck

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Ameisensäure, 96 %, A.C.S. Reagenz, Aldrich

all-*trans*-Retinsäure, Sigma

Helium 5.0, Linde AG

### Verbrauchsmaterial:

Flasche G4, braun, 4 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Schraubkappe G13, 4 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Dichtscheibe G13, 4 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Aluminiumfolie, Jürgens

### Arbeitsvorschrift:

In einem Probengläschen (4 mL) wird eine 10 mg/mL Stammlösung von all-*trans*-Retinsäure in Methanol angesetzt (Endvolumen 3 mL). In den 100-mL-Probenflaschen werden dann 50-ng/mL-Standards in Lösungsmitteln verschiedener Zusammensetzung hergestellt (vgl. **Abb. 3-16.**, Endvolumen jeweils 100 mL). Die Probenflaschen werden zum Schutz vor Lichteinstrahlung jeweils in Aluminiumfolie eingewickelt und als Eluent an die HPLC-Pumpe

gehängt (Fluß: 0,25 mL/min). Der Pumpenausgang wird über eine Kapillare direkt mit der ESI-Quelle des LCQ-Massenspektrometers gekoppelt. Das Massenspektrometer wird mit der all-*trans*-Retinsäure-Lösung in 30 mM Ammoniumacetat in Methanol/Wasser (50/50) im positiven Modus automatisch auf maximale Empfindlichkeit ( $m/z = 301$ ) getunt. Die Einstellparameter des Massenspektrometers sind wie folgt: Temperatur der Kapillare: 150 °C, Nebulizergas (N<sub>2</sub>): 100 Einheiten, Vorhanggas (N<sub>2</sub>): 60 Einheiten, Spannung an der ESI-Nadel: 4 kV, Kapillar-Spannung: 31 V, Tube Lens Offset: 10 V. Im Anschluß werden die all-*trans*-Retinsäure-Standards in den Lösungsmitteln verschiedener Zusammensetzung nacheinander jeweils über die HPLC-Pumpe in einem Fluß von 0,25 ml/min in das Massenspektrometer eingeführt. Es wird jeweils abgewartet, bis sich konstante Signalintensitäten einstellen und der jeweilige Wert notiert.

### **E-19 Optimierte HPLC-Methode für die LC-ESI-MS-Kopplung**

#### Geräte:

analog E-14

#### Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Ammoniumformiat, zur Analyse, Fischer Scientific

Helium 5.0, Linde AG

#### Verbrauchsmaterial:

Säule: 2.1 mm x 150 mm, Spherisorb ODS2, 3 µm Partikel, Waters

Vorsäule: Security Guard, C18 ODS, 4 mm L x 2 mm ID, Phenomenex

#### Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Methanol/Wasser (50/50), 5 mM Ammoniumformiat

Eluent B: Methanol/Wasser (85/15), 5 mM Ammoniumformiat

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 60 °C

Detektion: 340 nm, Response 3, Sampling Frequency 2 Hz

Injektion: *All-Volume*-Technik, Feed Volume: 25 µL, Luftsegmente

1. Injektion von 120 µL Probe (Cycle time: 30 Minuten)

2. Injektion von 300 µL Methanol (Cycle time: 11 Minuten)

Spüllösung im Autosampler: Wasser; Needle Wash Strokes: 2;

Injection Port Wash Strokes 2, Needle Down Speed: 2 (Fast)

Flußrate: 0,22 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	25
16	100
27,5	100
30	25
40	25

Für die Verbindungskapillaren wird durchgehend Polyetheretherketon-Material (PEEK) verwendet (vor der Säule: 0,17 mm ID, nach der Säule 0,1 mm ID). Um die Säule zu schützen, wird eine Vorsäule verwendet (Security Guard System, Phenomenex).

## E-20 LC-ESI-MS-Kopplung

### Geräte:

Autosampler: AS3000 mit integriertem Säulenofen und 200- $\mu$ L-Probenschleife, Thermoquest  
 Controller: SN4000, Thermoquest  
 Pumpe: P4000, Thermoquest  
 Degaser: Vacuum, Thermoquest  
 Massenspektrometer: LCQ mit ESI-Ionenquelle (Finnigan Mat)  
 Stickstoff-Generator: Ecoinert 2 ESP, DWT-GmbH  
 Auswertung: Xcalibur<sup>TM</sup>, Finnigan

### Chemikalien:

Ammoniumformiat, zur Analyse, Fischer Scientific  
 Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
 Helium 5.0, Linde AG

### Verbrauchsmaterial:

Säule: 2.1 mm x 150 mm, Spherisorb ODS2, 3  $\mu$ m Partikel, Waters  
 Vorsäule: Security Guard, C18 ODS, 4 mm L x 2 mm ID, Phenomenex

### Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Methanol/Wasser (50/50), 5 mM Ammoniumformiat

Eluent B: Methanol/Wasser (85/15), 5 mM Ammoniumformiat

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 60 °C

Injektion: „Pull-loop“-Injektion, 120  $\mu$ L

Waschlösung: Wasser; Waschschrift: 3 mL

Flußrate: 0,22 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	25
16	100
27,5	100
30	25
40	25

Für die Verbindungskapillaren wird durchgehend Polyetheretherketon-Material (PEEK) verwendet (vor der Säule: 0,17 mm ID, nach der Säule 0,13 mm ID). Um die Säule zu schützen, wird eine Vorsäule verwendet (Security Guard System, Phenomenex).

Massenspektrometer: ESI, positiver Modus, *Full Scan*

Die Einstellparameter des Massenspektrometers sind wie folgt: Temperatur der Kapillare: 150 °C, Nebulizergas (N<sub>2</sub>): 100 Einheiten, Vorhanggas (N<sub>2</sub>): 60 Einheiten, Spannung an der ESI-Nadel: 4 kV, Kapillar-Spannung: 31 V, Max Ion Time: 200 ms, Micro Scans: 3, AGC: on, Injection Waveforms: Off

## **E-21 Methode zur Messung von MS<sup>n</sup>-Spektren unter Verwendung der Spritzenpumpe**

Geräte:

Massenspektrometer: LCQ mit ESI-Ionenquelle (Finnigan Mat)

Stickstoff-Generator: Econinert 2 ESP, DWT-GmbH

Chemikalien:

Ammoniumformiat, zur Analyse, Fischer Scientific

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Helium 5.0, Linde AG

Arbeitsvorschrift:

Das zu untersuchende Retinoid wird jeweils in einer Methanol/Wasser-Mischung (80/20), die 1 mM Ammoniumformiat enthält, angesetzt und über die integrierte Spritzenpumpe des LCQ-Massenspektrometers in die ESI-Quelle überführt. Der Fluß beträgt dabei 80 µL/min. Das Massenspektrometer wird mit *all-trans*-4-OH-Retinsäure im positiven Modus automatisch auf maximale Empfindlichkeit ( $m/z$  299;  $(M+H-H_2O)^+$ ) getunt. Die Einstellparameter des Massenspektrometers sind wie folgt: Temperatur der Kapillare: 150 °C, Nebulizergas (N<sub>2</sub>): 100 Einheiten, Vorhanggas (N<sub>2</sub>): 60 Einheiten, Spannung an der ESI-Nadel: 4 kV, Kapillar-Spannung: 31 V, Tube Lens Offset: 10 V. Das Primär-Ion wird mit einer Kollisionsenergie von 34 % zu Produkt-Ionen fragmentiert (MS/MS-Modus). Im Falle des unbekanntes Retinoids und 3-OH-Retinsäuren, die ein stabiles Primär-Ion von  $m/z$  317  $(M+H)^+$  aufweisen, wird ein MS<sup>3</sup>-Fragmentspektrum ( $m/z$  317 →  $m/z$  299 → ....) erzeugt, um vergleichbare

Produkt-Ionen-Spektren zu erhalten. Die Kollisionsenergie beträgt für den ersten Fragmentierungsschritt 25 %, für den zweiten Schritt 34 %. Für alle Retinoide mit einer Molekülmasse von 316 wird dabei derselbe Tune-File wie für all-*trans*-4-OH-Retinsäure verwendet.

## **E-22 LC-DAD-APCI-MS-Kopplung (positiver Modus)**

### Geräte:

Autosampler:	AS3000 mit integriertem Säulenofen und 200- $\mu$ L-Probenschleife, Thermoquest
Controller:	SN4000, Thermoquest
Pumpe:	P4000, Thermoquest
Degaser:	Vacuum, Thermoquest
DAD-Detektor:	UV6000LP (Detektorzelle: 50 mm, 10 $\mu$ L)
Massenspektrometer:	LCQ mit APCI-Ionenquelle (Finnigan Mat)
Stickstoff-Generator:	Ecoinert 2 ESP, DWT-GmbH
Auswertung:	Xcalibur <sup>TM</sup> , Finnigan
pH-Meter:	pH 538 WTW mit Elektrode Typ E56 WTW
Magnetrührer:	IKAMAG RH, Omnilab

### Chemikalien:

Methanol, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker  
Ammoniumacetat, zur Analyse, Merck  
Helium 5.0, Linde AG  
Essigsäure, für die Spurenanalyse, Mallinckrodt-Baker

### Verbrauchsmaterial:

Säule: 2.1 mm x 150 mm, Spherisorb ODS2, 3  $\mu$ m Partikel, Waters  
Vorsäule: Security Guard, C18 ODS, 4 mm L x 2 mm ID, Phenomenex

### Arbeitsvorschrift:

Es werden zwei Eluenten vorbereitet, die beide für ca. 15 Minuten zum Entgasen mit Helium durchspült werden.

Eluent A: Methanol/60 mM Ammoniumacetat in Wasser, pH 5,7 (1:1, v/v)

Eluent B: Methanol

Dabei wird der pH-Wert der Ammoniumacetat-Lösung (60 mM) vor der Zugabe von Methanol mit Eisessig auf pH 5,7 eingestellt.

Die Geräteparameter sind wie folgt:

Ofentemperatur: 60 °C

Detektion: 340 nm (DAD), Scan Bandwidth: 1 nm, Channel sample rate: 10 Hz

Injektion: „Pull-loop“-Injektion, 120  $\mu$ L

Waschlösung: Wasser; Waschschrift: 3 mL

Flußrate: 0,25 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	% B
0	20
21	80
22,5	100
27,5	100
30,5	20
40	20

Für die Verbindungskapillaren wird durchgehend Polyetheretherketon-Material (PEEK) verwendet (vor der Säule: 0,17 mm ID, nach der Säule 0,13 mm ID). Um die Säule zu schützen, wird eine Vorsäule verwendet (Security Guard System, Phenomenex).

Massenspektrometer: APCI, positiver Modus (Parameter auch für *Full Scan!*)

Das Massenspektrometer wird mit all-*trans*-Retinsäure (10 ng/mL Standard in Methanol/Wasser (50/50), 30 mM Ammoniumacetat) automatisch auf maximale Empfindlichkeit ( $m/z$  301;  $(M+H)^+$ ) getunt. Die Einstellparameter des Massenspektrometers sind wie folgt: Temperatur der Kapillare: 152 °C, Nebulizergas ( $N_2$ ): 20 Einheiten, Vorhanggas ( $N_2$ ): off, *Vaporizer*-Temperatur: 370 °C, Quellen-Spannung: 6 kV, Kapillar-Spannung: 43 V, Max Ion Time: 200 ms, Micro Scans: 3, AGC: on, Injection Waveforms: Off

Segmente im MS/MS-Modus:

Segment 1: Dauer: 6 Minuten

*Full Scan:* (85.0 – 500.0)

Segment 2: Dauer: 2.51 Minuten

MS/MS (315.0) → (277.0 – 299.0)

Kollisionsenergie (CE): 34 %; Isolation Width (IsoW): 1.8

$m/z = 279+297$

Segment 3: Dauer: 4.22 Minuten

MS/MS (317.0) → (223.0 – 301.0)

CE: 34.0 %; IsoW 1.8

$m/z = 239+243+247+281+299$

Segment 4: Dauer: 4.82 Minuten

MS/MS (327.0) → (175.0-311.0)

CE: 32 %; IsoW 1.8; Source Induced Dissociation (SID): 8 V

$m/z = 177+267+309$

Segment 5: Dauer: 5.45 Minuten  
MS/MS (301.2) → (199.0 – 257.0)  
CE: 30 %; IsoW 1.8; SID: 1 V  
m/z = 201+205+231+241+245+255

### **E-23 LC-DAD-APCI-MS-Kopplung (negativer Modus)**

Geräte: analog E-22

Chemikalien: analog E-22

Verbrauchsmaterial: analog E-22

Arbeitsvorschrift: analog E-22, bis auf MS-Parameter

Massenspektrometer: APCI, negativer Modus (Parameter auch für *Full Scan!*)

Das Massenspektrometer wird mit all-*trans*-Retinsäure (10 ng/mL Standard in Methanol/Wasser (50/50), 30 mM Ammoniumacetat) automatisch auf maximale Empfindlichkeit (m/z 299; (M-H)<sup>-</sup>) getunt. Die Einstellparameter des Massenspektrometers sind wie folgt: Temperatur der Kapillare: 140 °C, Nebulizergas (N<sub>2</sub>): 75 Einheiten, Vorhanggas (N<sub>2</sub>): off, *Vaporizer*-Temperatur: 370 °C, Quellen-Spannung: -6 kV, Kapillar-Spannung: -46 V, Max Ion Time: 200 ms, Micro Scans: 3, AGC: on, Injection Waveforms: off

Segmente im MS/MS-Modus:

Segment 1: Dauer: 8.54 Minuten  
MS/MS (313) → (85.0 – 350.0)  
CE: 34 %; IsoW: 1.8; SID: 5 V  
m/z = 269+226+175

Segment 2: Dauer: 8.61 Minuten  
MS/MS (297.0) → (85.0 – 350.0)  
CE: 34 %; IsoW: 1.8; SID: 5 V  
m/z = 281+253+241

Segment 3: Dauer: 5.85 Minuten  
MS/MS (299.0) → (85.0 – 350.0)  
CE: 34 %; IsoW: 1.8; SID: 5 V  
m/z = 255+175

### **E-24 Aufnahme von UV-Spektren im HPLC-System**

Geräte:

wie in Abschnitt E-14



Durchführung:

Der Shimadzu SPD10AV<sup>VP</sup>-Detektor erlaubt die Aufnahme von Spektren direkt in der Flußzelle. Nach Injektion des Retinoid-Standards in das HPLC-System (entsprechend Abschnitt E-14) werden die Pumpen bei Erscheinen des Peaks über die Software gestoppt und es wird gewartet, bis sich eine stabile Basislinie ergibt. Das UV-Spektrum wird anschließend mit einer Scangeschwindigkeit von 5 nm/sec im Bereich von 280 bis 365 nm aufgenommen. Zur Hintergrundkorrektur wird während desselben Laufs kurz vor dem Peak ein Spektrum des reinen Eluenten aufgezeichnet, das über die CLASS-VP-Software automatisch von dem später erhaltenen Spektrum des Peaks abgezogen wird.

**E-25 Isolierung des unbekanntes Metaboliten**Geräte:

HPLC-System:	analog Abschnitt E-14, für Autoinjektor jedoch auch 1-mL-Probenschleife und Dilutor-Spritze 2,5 mL
Fraktionssammler:	FRC-10A, Fraction Collector Head mit Ventil, Rack No. 1
Homogenisator:	Potter S, Homogenisatorgefäß 5 mL, Teflonkolben, B. Braun Biotech
Konzentrator:	Rotations-Vakuum-Konzentrator Alpha RVC mit Rotoren für Gefäße mit 12 mm und 16 mm ID, Kühlfalle Alpha 1-4, Vakuumpumpe RF2, Christ
Zentrifuge:	CS 15 R Centrifuge mit Rotor S4180 mit Schwenkbechern und Polypropylenflaschen (200 mL), alles Beckman
Magnetrührer:	IKAMAG RH, Ominlab
Festphasenextraktion:	Baker spe 12G System mit Wasserstrahlpumpe
Glasgeräte:	Bechergläser 150 mL und 100 mL, Schütteltrichter 250 mL, COREX-Röhrchen 15 mL

Chemikalien:

wie in den Abschnitten E-6, E-7 und E-14

Acetonitril, HPLC Gradient Grade, Mallinckrodt-Baker

Verbrauchsmaterial:

Bakerbond spe Säulen NH<sub>2</sub>, 6 mL, 2000 mg, Mallinckrodt-Baker

HPLC-Säule I: Nucleosil 300-7 C18, 7 µm Partikel, 250 x 10 mm, Macherey-Nagel

HPLC-Säule II: Spherisorb ODS2, 3 µm Partikel, 125 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH

HPLC-Säule III: Sphereclone ODS(2), 3 µm Partikel, 150 x 2 mm, Phenomenex

Probengläser: Flasche G1, braun, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Schraubkappe G8-L, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Dichtscheibe G8-Sil/gS, 1,5 mL, CS-Chromatographie Service GmbH

Mikroeinsetz, 300  $\mu$ L, CS-Chromatographie Service GmbH  
Reagenzgläser: Fiolax-Reagenzgläser, 12 x 75 mm, Carl Roth GmbH & Co.  
Reagenzgläser, 3,5 mL, Shimadzu

Arbeitsvorschrift:

Etwa 20 g Leber (Abschnitt E-27) werden schrittweise in Wasser homogenisiert (1:1, w/v). Das Homogenat wird anschließend auf zwei Polypropylenflaschen aufgeteilt, in denen es jeweils mit der 4fachen Menge 2-Propanol versetzt wird. Unter Verwendung eines Magnet-rührers wird das Gemisch (mit Rührfisch) jeweils für ca. 15 Minuten gerührt. Nach der Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 10 Minuten) wird der Überstand abgenommen und jeweils in einen Schütteltrichter überführt. Dort erfolgt die Zugabe der 1,6fachen Menge Chloroform. Die Schütteltrichter werden immer wieder abwechselnd geschüttelt (ca. 10 Minuten). Da die Phasentrennung aufgrund einer Emulsionsbildung behindert ist, werden die Lösungen jeweils in Polypropylenbecher überführt und erneut zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 Minuten). Die unteren Phasen werden abgenommen, vereint und der Festphasenextraktion zugeführt. Dazu werden die SPE-Säulen auf der Vakuumvorrichtung plaziert (konditioniert mit jeweils 10 mL Hexan). Als Auffanggefäße dienen Bechergläser. Die Aufgabe des Extraktes erfolgt in Aliquots parallel auf 4 SPE-Säulen. Es ist davon auszugehen, daß die Kapazität der Säule aufgrund der großen Probenmenge im ersten Schritt nicht ausreicht, die zu isolierende Substanz vollständig zurückzuhalten. Daher wird das Eluat jeweils auf vier frische SPE-Säulen gegeben. Dieser Vorgang wird noch ein drittes Mal wiederholt. Anschließend erfolgt die Elution der zu isolierenden Substanz mit 15 mL einer Mischung aus Chloroform, 2-Propanol und Essigsäure (2:1, 3 % Essigsäure v/v). Die Eluate werden auf COREX-Röhrchen aufgeteilt und der Vakuumkonzentration zugeführt (analog Abschnitt E-9). Nach Wiederaufnahme in jeweils 2 mL Methanol werden die Lösungen vereint, auf zwei COREX-Röhrchen aufgeteilt und erneut der Vakuumkonzentration zugeführt. Nach Wiederaufnahme in jeweils 3 mL Methanol und Verdünnen mit Wasser werden die Probenlösungen zu je 1 mL auf Probengläser aufgeteilt und sequentiell in das HPLC-System (10-mm-Säule) injiziert.

Die chromatographische Aufreinigung erfolgt in drei Schritten mit HPLC-Säulen unterschiedlicher Innendurchmesser, Partikelgröße und Länge nach den Prinzipien der Routine-Methodik. Die jeweiligen chromatographischen Parameter wurden, um vergleichbare Kapazitätsfaktoren zu erhalten, entsprechend den Hinweisen von *Dolan* (195) auf das jeweilige Säulenformat angepaßt.

*HPLC-Aufreinigungsschritt I*

Bei gleichen Eluenten wie in der Routine-Methode (Abschnitt E-14) sind die Trennbedingungen wie folgt:

HPLC-Säule I: Nucleosil 300-7 C18, 7 µm Partikel, 250 x 10 mm, Macherey-Nagel

Flußrate: 5,7 mL/min

Gradient:

Zeit [min]	% B
0	20
35	80
37,5	100
40	100
41	20
50	20

Ofentemperatur: 60 °C

Autoinjektor: 1-mL-Probenschleife, 2,5-mL-Dilutor, 900 µL Injektionsvolumen  
(Cycle Time 51 min)

Der Peak des zu isolierenden Metaboliten wird jeweils mit Hilfe des Fraktionssammlers Software-gesteuert aus dem Eluat „herausgeschnitten“ und in einem Becherglas aufgefangen. Verbleibende Reste in den Probengläsern werden vereinigt und schließlich injiziert. Die in dem Becherglas aufgefangene Lösung wird in COREX-Gläser gegeben und der Vakuumkonzentration zugeführt. Nach Wiederaufnahme in 600 µL Methanol und Verdünnung mit 600 µL Wasser, wird die Probenlösung dem zweiten Aufreinigungsschritt zugeführt.

*HPLC-Aufreinigungsschritt II*

Bei gleichen Eluenten wie in der Routine-Methode (Abschnitt E-14) sind die Trennbedingungen wie folgt:

HPLC-Säule II: Spherisorb ODS2, 3 µm Partikel, 125 x 4 mm, CS-Chromatographie  
Service GmbH

Flußrate: 0,9 mL/min

Gradient:

Zeit [min]	% B
0	20
18	80
19,5	100
22	100
23	20
35	20

Ofentemperatur: 60 °C

Autoinjektor: 200- $\mu$ L-Probenschleife, 0,5-mL-Dilutor, 120  $\mu$ L Injektionsvolumen  
(Cycle Time 36 min)

Der Peak des zu isolierenden Metaboliten wird jeweils mit Hilfe des Fraktionssammlers Software-gesteuert aus dem Eluat „herausgeschnitten“ und in einem Becherglas aufgefangen. Verbleibende Reste in den Probengläsern werden vereinigt und schließlich injiziert. Die in dem Becherglas aufgefangene Lösung wird in ein Fiolax-Reagenzglas gegeben und der Vakuumkonzentration unterworfen. Nach Wiederaufnahme in 300  $\mu$ L Methanol und Verdünnung mit 300  $\mu$ L Wasser, wird die Probenlösung dem dritten Aufreinigungsschritt zugeführt.

### *HPLC-Aufreinigungsschritt III*

Um Ammoniumacetat-Rückstände zu vermeiden wird statt des gepufferten Eluenten A in diesem Fall eine reine Methanol/Wasser-Mischung (1:1) verwendet. Eluent B entspricht der Routine-Methodik.

HPLC-Säule III: Sphereclone ODS(2), 3  $\mu$ m Partikel, 150 x 2 mm, Phenomenex

Flußrate: 0,23 mL/min

Gradient:

Zeit [min]	% B
0	20
21	80
22,5	100
27,5	100
30,5	20
40	20

Ofentemperatur: 60 °C

Autoinjektor: 200- $\mu$ L-Probenschleife, 0,5-mL-Dilutor, 120  $\mu$ L Injektionsvolumen  
(Cycle Time 41 min)

Der Peak des zu isolierenden Metaboliten wird jeweils mit Hilfe des Fraktionssammlers Software-gesteuert aus dem Eluat „herausgeschnitten“ und in einem Reagenzglas aufgefangen. Verbleibende Reste in den Probengläsern werden vereinigt und schließlich injiziert. Die in dem Becherglas aufgefangene Lösung wird in ein Fiolax-Reagenzglas gegeben und der Vakuumkonzentration zugeführt. Nach Wiederaufnahme in 200  $\mu$ L Acetonitril und wird die Probenlösung in ein braunes Probenglas mit einem 300  $\mu$ L Mikroglaseinsatz pipettiert.

## **E-26 Aufnahme von $^1\text{H-NMR}$ -Spektren**

### Geräte:

Bruker-Avance, 600,13 MHz mit 2,5-mm-Mikroprobenkopf, Bruker

Chemikalien:

Stickstoff 5.0, Linde AG

Chloroform-d, 99.6 % D, Sigma

Acetonitril-d3, 99.8 % D, Sigma

Verbrauchsmaterial:

NMR-Röhrchen, 1.7 mm I.D., Bruker

Arbeitsvorschrift:

Die nach E-25 dargestellte Probenlösung wird zunächst in dem Mikrovial bis zur Trockene im Stickstoffstrom eingedampft. Anschließend wird der Rückstand in 70  $\mu\text{L}$   $\text{CD}_3\text{CN}$  aufgenommen und in das NMR-Röhrchen überführt. Nach Einschleusung des NMR-Röhrchens in das Hochfeldgerät erfolgt die Messung entsprechend den unten angegebenen Bedingungen. Analog erfolgt die Messung in  $\text{CDCl}_3$  nach erneuter Verdampfung des Lösungsmittels im Stickstoffstrom und Wiederaufnahme in 70  $\mu\text{L}$   $\text{CDCl}_3$ .

```
Current Data Parameters
NAME      Hydroxretins
EXPNO      3
PROCNO     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20001221
Time       18.07
INSTRUM    spect
PROBHD     2.5mm 1H 13C D
PULPROG    zg60
TD         65536
SOLVENT    CDC13
NS         8192
DS         2
SWH        12376.237 Hz
FIDRES     0.188846 Hz
AQ         2.6477044 sec
RG         8192
DW         40.400 usec
DE         6.00 usec
TE         300.0 K
D1         1.00000000 sec
```

```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         5.20 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       600.1337060 MHz
```

```
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         600.1300000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.00
```

```
Current Data Parameters
NAME      Hydroxretins
EXPNO      1
PROCNO     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20001220
Time       18.22
INSTRUM    spect
PROBHD     2.5mm 1H 13C D
PULPROG    zg30
TD         32768
SOLVENT    CD3CN
NS         4096
DS         2
SWH        5482.456 Hz
FIDRES     0.167311 Hz
AQ         2.9884915 sec
RG         2048
DW         91.200 usec
DE         6.00 usec
TE         300.0 K
D1         1.00000000 sec
```

```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         5.10 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       600.1326622 MHz
```

```
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         600.1300014 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.00
```

**E-27 Fütterungsstudie mit NMRI-Mäusen**

Für diese Studie wurden weibliche Mäuse (NMRI, Harlan-Winkelmann, Borchon, D) mit einem Gewicht von 26-36 g verwendet. Die Tiere wurden *ad libitum* mit Nagetier-Futter (Altromin 1324, Altromin, Lage, D) sowie Wasser versorgt und unter kontrollierten Bedingungen bei Raumtemperatur ( $21 \pm 1$  °C), relativer Luftfeuchtigkeit ( $55 \pm 5$  %) und 12-Stunden dauerndem Hell-Dunkel-Zyklus (mit Licht zwischen 10 und 22 Uhr) gehalten.

Während einer einwöchigen Eingewöhnungsphase wurden alle Mäuse zunächst mit Standardfutter (15.000 IE Vitamin A/kg Futter) gefüttert. Die Mäuse wurden in drei Gruppen zu je 6 Mäusen aufgeteilt und 14 Tage *ad libitum* mit Nagetierfutter unterschiedlicher Vitamin-A-Gehalte gefüttert (15.000 IE - Standard, 45.000 IE und 150.000 IE/kg Futter). Die Entnahme der Proben erfolgte am 15. Tag nach Beginn der Exposition um die Mittagszeit. Die Blutentnahme erfolgte nach Ethernarkose über den retroorbitalen Venenplexus. Nach der Tötung durch cervicale Dislokation wurden Leber, Niere und Gehirn entnommen. Für die behandelten Tiere waren im Rahmen dieser Studie keine Schmerzen, Leiden oder Schäden zu erwarten (4,382). Die verwendeten Tiere wurden in ihrer Zahl dem Tierschutzzentrum der Tierärztlichen Hochschule Hannover angezeigt. Zum Zeitpunkt der Tötung zeigten die Tiere keine klinischen Anzeichen einer Vergiftung.

Die statistische Bewertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat<sup>®</sup> (Jandel Scientific, Erkrath). Aus den Einzelwerten einer jeden Gruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Daten wurden bei Normalverteilung (*Kolmogorov-Smirnov-Test*) und bei Varianzhomogenität (*Levene Median Test*) mit dem *One Way ANOVA Test* untersucht. In anderen Fällen wurde der *Kruskal-Wallis One Way ANOVA Rank Sum Test* verwendet. Im Falle statistisch signifikanter Unterschiede wurden die Daten im ersten Fall mit dem *Tukey Test*, im zweiten Fall mit dem *Student-Newman-Keuls-Test* überprüft. Falls im zweiten Fall Gruppen unterschiedlicher Größe vorlagen, wurde der *Dunn's Test* angewandt. Das Signifikanzniveau lag dabei grundsätzlich bei  $p \leq 0,05$ .

### **E-28 Untersuchungen von humanen Lebern und humanem Plasma**

Die Plasma-Proben wurden von H. L. Spohr und W. Weber (DRK Kliniken, Kinderklinik, Spanndauer Damm 130, 14050 Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Leber-Proben stammten von VITRON INC. (Association of human tissue users, 8320 S. Wentworth Road, Tucson, Arizona 85747).

### **E-29 Untersuchungen zum Einfluß von TCDD auf den Metabolismus von Vitamin A in der Ratte**

Diese Studie wurde im Tierstall des Karolinska Institutes (Institute of Environmental Medicine, Stockholm, Schweden) unter der Anleitung von H. Hakansson durchgeführt. Alle Handlungen, bei denen Tiere involviert waren, wurden durch das lokale Ethik-Komitee für Tierversuche geprüft. Männliche Sprague-Dawley Ratten (B&K Universal AB, Sollentuna, Schweden) wurden mit drei Tieren pro Käfig gehalten und konnten innerhalb einer vierwöchigen Akklimatisierungs-Periode und im Rahmen des Experimentes frei über Wasser und R34 Nahrung (6000 IE Vitamin A/kg Futter, Lactamin, Stockholm, Schweden) verfügen. Zu Beginn des Experimentes wogen die Tiere  $273 \pm 18$  g. Es wurde ein kombiniertes

Experiment zur Zeit- und Dosis-Abhängigkeit durchgeführt. In dem Versuch zur Zeitabhängigkeit erhielten männliche Ratten jeweils einmalig eine orale Dosis von 0 oder 10 µg TCDD/kg Körpergewicht (TCDD: Lot MLB-682-49, CIL, Andover, MA; Lot 851:144-II, Dow Chemical, Midland, MI, USA) in Maiskeimöl (1 mL/kg Körpergewicht). Sie wurden 1, 3 und 28 Tage nach der Applikation getötet. In der Untersuchung zur Dosisabhängigkeit wurden Sprague-Dawley-Ratten jeweils einmalig einer oralen Dosis von 0, 0.1, 1.0, 10 oder 100 µg TCDD/kg ausgesetzt und schließlich an Tag 3 nach der Exposition getötet. Die Narkose wurde i.p. mit 90 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Mebumal®) durchgeführt. Das Blut wurde aus der Portalvene entnommen, um die Ratte zu töten. Nach Gerinnung und Zentrifugation des Blutes bei Raumtemperatur wurde das Serum bei -70 °C aufbewahrt. Lebern und Nieren wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -70 °C aufbewahrt.

Die statistische Bewertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat® (Jandel Scientific, Erkrath). Aus den Einzelwerten einer jeden Gruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. In der Studie zur Dosisabhängigkeit wurden die Daten für normalverteilte Daten (*Kolmogorov-Smirnov-Test*) und bei Varianzhomogenität (*Levene Median Test*) mit dem *One Way ANOVA Test* untersucht. In anderen Fällen wurde der *Kruskal-Wallis One Way ANOVA Rank Sum Test* verwendet. Im Falle statistisch signifikanter Unterschiede wurden die Daten im ersten Fall mit dem *Tukey Test*, im zweiten Fall mit dem *Dunnnett Test* überprüft. Falls im zweiten Fall Gruppen unterschiedlicher Größe vorlagen, wurde der *Dunn's Test* angewandt.

Die Zeit-Abhängigkeit wurde mit dem *Two Way ANOVA Test* bewertet. Feste Faktoren waren Zeit (Tag 1, Tag 3 bzw. Tag 28) und Behandlung (TCDD oder Kontrolle). Im Falle statistisch signifikanter Unterschiede wurden die Daten weiter mit dem *Tukey Test* untersucht.

Das Signifikanzniveau lag grundsätzlich bei  $p \leq 0,05$ .

### **E-30 Untersuchungen zum Einfluß von TCDD auf den Vitamin-A-Metabolismus in Bindeprotein-Knock-Out-Mäusen**

Diese Studie wurde im Tierstall des Karolinska Institutes (Institute of Environmental Medicine, Stockholm, Schweden) unter der Anleitung von H. Hakansson durchgeführt. Alle Handlungen, bei denen Tiere involviert waren, wurden durch das lokale Ethik-Komitee für Tierversuche geprüft. Transgene Mäuse (CRBP-I/CRABP-I/CRABP-II (-/-); CRABR-I/CRABP-II (-/-); Ursprung: C57B1 und 129/SV) und entsprechende Wildtyp-Mäuse wurden von Herrn P. Chambon (Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Illkirch Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Während des Experiments konnten die Mäuse frei über Wasser und Nahrung (Rat & Mouse no.1 maintenance diet, 6300 IE Vitamin A/kg Futter, SDS, Stockholm, Schweden) verfügen.

Die Mäuse (8 Wochen alt) erhielten einmalig eine orale Dosis von 0 oder 50 µg TCDD/kg Körpergewicht (TCDD: Lot 851:144-II, Dow Chemical, Midland, MI, USA) in Maiskeimöl (10 mL/kg Körpergewicht). Die Narkose wurde i.p. mit 90 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Mebumal<sup>®</sup>) durchgeführt. Das Blut wurde aus dem Herzen entnommen. Nach Gerinnung und Zentrifugation des Blutes bei Raumtemperatur wurde das Serum bei -70 °C aufbewahrt. Lebern und Nieren wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -70 °C aufbewahrt.

Die statistische Bewertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat<sup>®</sup> (Jandel Scientific, Erkrath). Aus den Einzelwerten einer jeden Gruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Daten wurden bei Normalverteilung (*Kolmogorov-Smirnov-Test*) und bei Varianzhomogenität (*Levene Median Test*) mit dem *One Way ANOVA Test* untersucht. In anderen Fällen wurde der *Kruskal-Wallis One Way ANOVA Rank Sum Test* verwendet. Im Falle statistisch signifikanter Unterschiede wurden die Daten im ersten Fall mit dem *Tukey Test*, im zweiten Fall mit dem *Student-Newman-Keuls-Test* überprüft. Falls im zweiten Fall Gruppen unterschiedlicher Größe vorlagen, wurde der *Dunn's Test* angewandt. Das Signifikanzniveau lag dabei grundsätzlich bei  $p \leq 0,05$ .

### **E-31 TCDD-Exposition trächtiger Ratten**

Diese Studie wurde im Tierstall der Universität Wageningen (Toxicology Group, Department of Agrotechnology & Food Sciences, Wageningen, Niederlande) unter der Anleitung von A. Brouwer durchgeführt. Alle Handlungen, bei denen Tiere involviert waren, wurden durch das *Animal Welfare Committee* der Universität Wageningen geprüft. Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland, 10 Wochen alt) wurden *ad libitum* mit Nagetier-Futter (Hope Farms, Woerden, Niederlande) sowie Wasser versorgt und unter kontrollierten Bedingungen bei Raumtemperatur (21 °C), relativer Luftfeuchtigkeit (50 %) und 12 Stunden dauerndem Hell-Dunkel-Zyklus (mit Licht zwischen 10 und 22 Uhr) in Plastik-Käfigen gehalten. Zu Beginn des Experimentes waren die weiblichen Ratten 12 Wochen alt. Eine weibliche Ratte wurde dann jeweils mit einer männlichen Ratte gepaart, indem sie über Nacht zwischen 17 Uhr und 9 Uhr zusammen in einen Käfig gesetzt wurden. Eine Konzeption wurde unterstellt, wenn nach der Verpaarung ein Vaginalpfropf festgestellt wurde. Nach der Konzeption wurde das Tier separat in einem Käfig gesetzt und dieser Tag als Tag 0 der Trächtigkeit terminiert. Am Tag 9 der Trächtigkeit (GD9) wurden die Ratten in einen Plastik-Käfig mit Stahlgitter gesetzt, um das Sammeln von TCDD-kontaminierten Fäzes zu erleichtern und Kontamination der Tier-Einrichtung zu verhindern. Die Ratten erhielten an Tag 10 der Trächtigkeit einmalig eine orale Dosis von 0 oder 15 µg TCDD/kg Körpergewicht in Maiskeimöl gelöst (2 mL/kg Körpergewicht). Die Autopsien an Muttertieren, Feten und Embryonen wurden nach Ethernarkose an Tag 14 und Tag 20 der Trächtigkeit vorgenommen.



---

Das Blut wurde aus der Hohlvene entnommen in heparinisierte Probengläschen gefüllt und bis zur Trennung von Plasma auf Eis gelagert. Maternale (GD14, GD20) und fetale (GD20) Lebern und Nieren, sowie Embryonen (GD14) wurden entnommen und auf Trockeneis gelagert. Fetales Plasma und Gewebe sowie Embryonen wurden zur Analyse wurfweise vereint. Alle Gewebe und Plasma wurden bis zur Analyse bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon aufbewahrt. Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat<sup>®</sup> (Jandel Scientific, Erkrath). Aus den Einzelwerten einer jeden Gruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte bei Feten und Embryonen für normalverteilte Daten (*Kolmogorov-Smirnov-Test*) und bei Varianzhomogenität (*Levene Median Test*) mit dem *t-Test*. In anderen Fällen wurde der *U-Test nach Mann und Whitney* verwendet. Die Daten der Muttertiere wurden mit dem *Two Way ANOVA Test* bewertet. Feste Faktoren waren Zeit (GD14 und GD20) und Behandlung (TCDD oder Kontrolle). Im Falle statistisch signifikanter Unterschiede wurden die Daten weiter mit dem *Tukey Test* untersucht. Das Signifikanzniveau lag grundsätzlich bei  $p \leq 0,05$ .

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) **Nau H and Blaner WS** (Hrsg.)  
Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action.  
*Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1999)*
- (2) **Blomhoff R** (Hrsg.)  
Vitamin A in health and disease.  
*1. Aufl. New York, Marcel Dekker, Inc (1994)*
- (3) **Sporn MB, Roberts AB, and Goodman DS** (Hrsg.)  
The Retinoids. Biology, chemistry and medicine.  
*New York, Raven Press (1994)*
- (4) **International Agency for Research on Cancer** (Hrsg.)  
IARC Handbooks of Cancer Prevention: Vitamin A.  
*Lyon, IARC-Press (1998)*
- (5) **International Agency for Research on Cancer** (Hrsg.)  
IARC Handbooks of Cancer Prevention: Retinoids.  
*Lyon, IARC Press (1999)*
- (6) **Chambon P**  
A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.  
*The FASEB Journal (1996)10, 940-54*
- (7) **Blaner WS, Piantedosi R, Sykes A, Vogel S**  
Retinoic acid synthesis and metabolism.  
*In: Nau H, Blaner WS (Hrsg.): Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1999) 117-49*
- (8) **Napoli JL**  
Retinoic acid biosynthesis and metabolism.  
*The FASEB Journal (1996) 10, 993-1001.*
- (9) **Vogel S, Gamble MV, Blaner WS**  
Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids.  
*In: Nau H, Blaner WS (Hrsg.): Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1999) 32-95*
- (10) **Diehl JF**  
Chemie in Lebensmitteln.  
*Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH (2000) 128-37*
- (11) **Liem AKD, Fürst P, Rappe C**  
Exposure of populations to dioxins and related compounds.  
*Food Additives and Contaminants (2000) 17(4), 241-59*

- 
- (12) **Pollitt F**  
Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans.  
*Regulatory Toxicology and Pharmacology* (1999) 30, S63-S68
- (13) **Schrenk D, Fürst P**  
WHO setzt Werte für die tolerierbare tägliche Aufnahme an Dioxinen neu fest.  
*Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* (1999) 47(3), 313-6
- (14) **Van Birgelen APJM, Van den Berg M**  
Toxicokinetics.  
*Food Additives and Contaminants* (2000) 17(4), 267-73
- (15) **Zile MH, Bank PA, Roltsch IA**  
Alterations in vitamin A metabolism by polyhalogenated aromatic hydrocarbons.  
*Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* (1989) 28, 93-102
- (16) **Eitenmiller RR, Landen WO Jr**  
Vitamin analysis for the health and food sciences.  
*Boca Raton, CRC Press* (1999) 3-75
- (17) **Furr HC, Barua AB, Olson JA**  
Analytical methods.  
*In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Hrsg.): The retinoids Biology, chemistry, and medicine.*  
2. Aufl. New York, Raven Press (1994) 179-210.
- (18) **Wyss R**  
Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids.  
*Journal of Chromatography B* (1995) 671, 381-425
- (19) **Noy N**  
Retinoid-binding proteins, mediators of retinoid action  
*The Biochemical Journal* (2000) 348, 481-95
- (20) **Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J**  
Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids.  
*Current Opinion in Gastroenterology* (2001) 17, 184-92
- (21) **Ghyselinck NB, Bavic C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Hakansson H, Sauvant P, Azais-Braesco V, Frasson M, Picaud S, Chambon P**  
Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis.  
*The EMBO Journal* (1999) 18(18), 4903-14
- (22) **Napoli JL**  
A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism.  
*Nutrition Reviews* 2000 58(8), 230-6

- (23) **Blomhoff R**  
Overview of vitamin A metabolism and function.  
*In: Blomhoff R (Hrsg.): Vitamin A in health and disease.*  
*1. Aufl. New York, Marcel Dekker, Inc (1994) 1-35*
- (24) **Arnhold T**  
Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A/Retinoiden im Hinblick auf eine Risikoabschätzung ihrer teratogenen Wirkung beim Menschen.  
*Dissertation (2000) Technische Universität Braunschweig*
- (25) **Hanck AB, Kuenzle CC, Rehm WF**  
Vitamin A.  
*Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey (1991)*
- (26) **Shirley MA, Bennani YL, Boehm MF, Breau AP, Pathirana C, Ulm EH**  
Oxidative and reductive metabolism of 9-*cis*-retinoic acid in the rat. Identification of 13,14-dihydro-9-*cis*-retinoic acid and its taurine conjugate.  
*Drug Metabolism and Disposition (1996) 24(3), 293-302*
- (27) **Napoli JL**  
Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism.  
*Biochimica et Biophysica Acta (1999) 1440, 139-62*
- (28) **Bayer W, Schmidt K**  
Vitamine in Prävention und Therapie.  
*Stuttgart, Hippokrates Verlag GmbH (1991)*
- (29) **Frolik CA**  
Metabolism of retinoids.  
*In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Hrsg.): The retinoids. Volume 2.*  
*Orlando, Academic Press, Inc (1984) 177-208*
- (30) **Duester G**  
Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function.  
*European Journal of Biochemistry (2000) 267, 4315-24*
- (31) **Napoli JL**  
Retinoic acid. Its Biosynthesis and metabolism.  
*Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (1999) 63, 139-88*
- (32) **Wilson JG, Roth B, Warkany J**  
An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation.  
*The American Journal of Anatomy (1953) 92, 189-217*
- (33) **Thompson JN, Howell JM, Pitt GAJ**  
Vitamin A and reproduction in rats.  
*Proceedings of the Royal Society of London, Series B (1964) 159, 510-35*

- 
- (34) **Wellik DM, DeLuca HF**  
Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A deficient rats.  
*Biology of Reproduction* (1995) 53, 1392-7
- (35) **Van Pelt AM, de Rooij DG**  
Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells.  
*Endocrinology* (1991) 128, 697-704
- (36) **Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C**  
9-*cis* Retinoic acid is a high affinity ligand for retinoid X receptor.  
*Cell* (1992) 68, 397-406
- (37) **Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A**  
9-*cis* retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha.  
*Nature* (1992) 355, 359-61
- (38) **Napoli JL**  
Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction.  
*Clinical Immunology and Immunopathology* (1996) 80, S52-S62
- (39) **Pijnappel WWM, Hendriks HFJ, Folkers GE, Van den Brink CE, Dekker EJ, Edelenbosch C, van der Saag PR, Durston AJ**  
The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification.  
*Nature* (1993) 366, 340-4
- (40) **Thaller C, Eichele G**  
Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud.  
*Nature* (1990) 345, 815-9
- (41) **Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P, Levin AA**  
Retinoic acid receptors and retinoid X receptors. Interactions with endogenous retinoic acids.  
*Proceedings of the National Academy Sciences of the USA* (1993) 90, 30-4
- (42) **Costardis P, Horton C, Zeitlinger J, Holder N, Maden M**  
Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult.  
*Developmental Dynamics* (1996) 205, 41-51
- (43) **Chen AC, Guo X, Derguini F, Gudas LJ**  
Human breast cancer cells and normal mammary epithelial cells, retinol metabolism and growth inhibition by the retinol metabolite 4-oxoretinol.  
*Cancer Research* (1997) 57, 4642-51

- (44) **Achkar CC, Derguini F, Blumberg B, Langston A, Levin AA, Speck J, Evans RM, Bolado J Jr, Nakanishi K, Buck J, Gudas LJ**  
4-Oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (1996) 93, 4879-84*
- (45) **Blumberg B, Bolado J, Derguini F, Craig AG, Moreno TA, Chakravarti D, Heyman RA, Buck J, Evans RM**  
Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (1996) 93, 4873-8*
- (46) **Okuno M, Sato T, Kitamoto T, Imai S, Kawada N, Suzuki Y, Yoshimura H, Moriwaki H, Onuki K, Masushige S, Muto Y, Friedman SL, Kato S, Kojima S**  
Increased 9,13-di-*cis*-retinoic acid in rat hepatic fibrosis, implication for a potential link between retinoid loss and TGF- $\beta$  mediated fibrogenesis.  
*Journal of Hepatology (1999) 30, 1073-80*
- (47) **Pijnappel WM, Folkers GE, de Jonge WJ, Verdegem PJE, de Laat SW, Lugtenburg J, Hendriks HFJ, van der Saag PR, Durston AJ**  
Metabolism to a response pathway selective retinoid ligand during axial pattern formation.  
*Proceedings of the National Academy Sciences of the USA (1998) 95, 15424-9*
- (48) **Collins MD, Mao GE**  
Teratology of retinoids.  
*Annual Review of Pharmacology and Toxicology (1999) 39, 399-430*
- (49) **Tillner J, Dingermann T**  
Retinoide und Embryonalentwicklung.  
*Deutsche Apothekerzeitung (1998) 138(9), 704-10*
- (50) **Buck J, Derguini F, Levi E, Nakanishi K, Hämmerling U**  
Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol.  
*Science (1991) 254, 1654-6*
- (51) **Buck J, Grün F, Derguini F, Chen Y, Kimura S, Noy N, Hämmerling U**  
Anhydroretinol, a naturally occurring inhibitor of lymphocyte physiology.  
*Journal of Experimental Medicine (1993) 178, 675-80*
- (52) **Derguini F, Nakanishi K, Hämmerling U, Chua R, Eppinger T, Levi E, Buck J**  
13,14-Dihydroxy-retinol, a new bioactive retinol metabolite.  
*The Journal of Biological Chemistry (1995) 270(32), 18875-80*
- (53) **Eppinger T, Buck J, Hämmerling U**  
Growth control or terminal differentiation. Endogenous production and differential activities of vitamin A metabolites in HL-60 cells.  
*Journal of Experimental Medicine (1995) 178, 1995-2005*
- (54) **Ross SA, McCaffery PJ, Dräger UC, De Luca LM**  
Retinoids in embryonal development.  
*Physiological Reviews (2000) 80(3), 1021-54*

- 
- (55) **Morriss-Kay GM, Ward SJ**  
Retinoids and mammalian development.  
*International Review of Cytology* (1999) 188, 73-131
- (56) **Nau H, Elmazar MMA**  
Retinoid receptors, their ligands, and teratogenesis: synergy and specificity of effects.  
*In: Nau H, Blaner WS (Hrsg.): Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action.*  
Berlin, Springer-Verlag (1999) 465-87
- (57) **Cooke M, Clark GC, Goeynes L, Baeyens W**  
Environmental bioanalysis of dioxin.  
*Today's Chemist at Work* (2000) 7, 34-40
- (58) **Li X, Weber LWD, Rozman KK**  
Toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female Sprague-Dawley rats including placental and lactational transfer to fetuses and neonates.  
*Fundamental and Applied Toxicology* (1995) 27, 70-6
- (59) **Poellinger L**  
Mechanistic aspects - the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor.  
*Food Additives and Contaminants* (2000) 17(4), 261-6
- (60) **Nilsson CB**  
Studies on the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on vitamin A homeostasis.  
*Dissertation* (1999) Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden
- (61) **United States Environmental Protection Agency**  
Scientific highlights from the dioxin reassessment report.  
*Information Sheet* (2000) 2
- (62) **Schrenk D**  
Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics.  
*Biochemical Pharmacology* (1998) 55, 1155-62
- (63) **Safe SH**  
Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds.  
*Pharmacology & Therapeutics* (1995) 67(2), 247-81
- (64) **Safe SH**  
Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs).  
*Critical Reviews in Toxicology* (1990) 21, 51-88
- (65) **Dragan YP, Schrenk D**  
Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion.  
*Food Additives and Contaminants* (2000) 17(4), 289-302

- (66) **Safe SH**  
Polychlorinated biphenyls (PCBs), environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment.  
*Critical Reviews in Toxicology* (1994) 24, 87-149
- (67) **Pohjanvirta R, Viluksela M, Tuomisto JT, Unkila M, Karasinska J, Franc M-A, Holowenko M, Giannone JV, Harper PA, Tuomisto J, Okey AB**  
Physicochemical differences in the AH receptors of the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1999) 155, 82-95
- (68) **Pohjanvirta R, Tuomisto J**  
Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals, effects, mechanisms, and animal models.  
*Pharmacological Reviews* (1994) 46(4), 483-549
- (69) **Yonemoto J**  
The effects of dioxin on reproduction and development.  
*Industrial Health* (2000) 38, 259-68
- (70) **Yoshida R, Ogawa Y**  
Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. An application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins.  
*Industrial Health* (2000) 38, 5-14
- (71) **Birnbaum LS, Tuomisto J**  
Non-carcinogenic effects of TCDD in animals.  
*Food Additives and Contaminants* (2000) 17(4), 275-88
- (72) **Brouwer A, Ahlborg UG, van den Berg M, Birnbaum LS, Boersma ER, Bosveld ATC, Denison MS, Hagmar L, Holene E, Huisman M, Jacobson SW, Jacobson JJ, Koopman-Esseboom C, Koppe JG, Kulig BM, Morse DC, Muckle G, Peterson RE, Sauer PJ, Seegal R, Smith-van Prooijje AE, Touwen BCL, Weisglas-Kuperus N, Winnecke G**  
Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants.  
*European Journal of Pharmacology* (1995) 114, 1-40
- (73) **Chen Y-J, Hsu C-C**  
Effects of prenatal exposure to PCBs on the neurological function of children, a neuropsychological and neurophysiological study.  
*Developmental Medicine and Child Neurology* (1994) 36, 312-20
- (74) **Guo Y-L, Lai TJ, Lu SH, Chen Y-C, Hsu C-C**  
Sexual development and biological findings in Yucheng children.  
*Organohalogen compounds* (1993) 14, 235-8
- (75) **Rogan WJ, Gladen BC, Hung K, Koong S-, Shia L-Y, Taylor JS, Wu Y-C, Yang D, Ragan NB, Hsu C-C**  
Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan.  
*Science* (1988) 241, 334-6



- 
- (76) **Umweltbundesamt (UBA) und Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)**  
Expertenrunde der Weltgesundheitsorganisation diskutiert gesundheitliche Bewertung von PCBs.  
*Gemeinsame Presseerklärung 26/2001*
- (77) **Inami S, Nakamura A, Nagayam S**  
Polychlorinated biphenyl toxicity and nutrition. II. PCB toxicity and vitamin A.  
*Journal of Nutritional Science and Vitaminology (1974) 20, 363-70*
- (78) **Kimbrough RD**  
Skin lesions in animals and humans, a brief overview.  
*Banbury Report (1984) 18, 357-363*
- (79) **Lu Y, Wang X, Safe S**  
Interaction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and retinoic acid in MCF-7 human breast cancer cells.  
*Toxicology and Applied Pharmacology (1994) 127(1), 1-8*
- (80) **Thunberg T, Ahlborg UG, Johnsson H**  
Vitamin A (retinol) status in the rat after a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
*Archives of Toxicology (1979) 42(4), 265-74*
- (81) **Zile MH**  
Vitamin A homeostasis endangered by environmental pollutants.  
*Proceedings of the Society for Environmental Biology and Medicine (1992) 201, 141-53*
- (82) **Abbott BD, Birnbaum LS**  
Cellular alterations and enhanced induction of cleft palate after coadministration of retinoic acid and TCDD.  
*Toxicology and Applied Pharmacology (1989) 99(2), 287-301*
- (83) **Hakansson H, Johansson L, Manzoor E, Ahlborg UG**  
Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the vitamin A status of Hartley guinea pigs, Sprague-Dawley rats, C57Bl/6 mice, DBA/2 mice, and Golden Syrian hamsters.  
*Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo) (1991) 37(2), 117-38*
- (84) **Van Birgelen AP, Van der Kolk J, Fase KM, Bol I, Poiger H, Brouwer A, Van den Berg M**  
Subchronic dose-response study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female Sprague-Dawley rats.  
*Toxicology and Applied Pharmacology (1995) 132(1), 1-13*
- (85) **Morse DC, Brouwer A**  
Fetal, neonatal, and long-term alterations in hepatic retinoid levels following maternal polychlorinated biphenyl exposure in rats.  
*Toxicology and Applied Pharmacology (1995) 131, 175-82*

- (86) **Hakansson H, Waern F, Ahlborg UG**  
Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the lactating rat on maternal and neonatal vitamin A status.  
*The Journal of Nutrition* (1987) 117(3), 580-6
- (87) **Morita A, Nakano K**  
Change in vitamin A content in tissues of rats on a vitamin A-free diet.  
*Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (1982) 28, 343-50
- (88) **Nilsson CB, Hanberg A, Trossvik C, Hakansson H**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects retinol esterification in rat hepatic stellate cells and kidney.  
*Environmental Toxicology and Pharmacology* (1996) 2, 17-23
- (89) **Nilsson CB, Hoegberg P, Trossvik C, Azais-Braesco V, Blaner WS, Fex G, Harrison EH, Nau H, Schmidt CK, van Bennekum AM, Hakansson H**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (2000) 169, 121-31
- (90) **Chen LC, Berberian I, Koch B, Mercier M, Azais-Braesco V, Glauert HP, Chow CK, Robertson LW**  
Polychlorinated and polybrominated biphenyl congeners and retinoid levels in rat tissues, structure-activity relationships.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1992) 114, 47-55
- (91) **Brouwer A**  
Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species.  
*Biochemical Society Transactions* (1991) 19, 731-7
- (92) **Andreola F, Fernandez-Salguero PM, Chiantore MV, Petkovich MP, Gonzalez FJ, De Luca LM**  
Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism.  
*Cancer Research* (1997) 57(14), 2835-8
- (93) **Hakansson H, Ahlborg UG**  
The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the uptake, distribution and excretion of a single oral dose of [11,12-<sup>3</sup>H]retinyl acetate and on the vitamin A status in the rat.  
*The Journal of Nutrition* (1985) 115(6), 759-71
- (94) **Cullum ME, Zile MH**  
Acute polybrominated biphenyl toxicosis alters vitamin A homeostasis and enhances degradation of vitamin A.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1985) 81, 177-81
- (95) **Jensen RK, Cullum ME, Deyo ME, Zile MH**  
Vitamin A metabolism in rats chronically treated with 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl.  
*Biochimica et Biophysica Acta* (1987) 926, 310-20

- 
- (96) **Bank PA, Salyers KL, Zile MH**  
Effect of tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the glucuronidation of retinoic acid in the rat.  
*Biochimica et Biophysica Acta* (1989) 993(1), 1-6
- (97) **Fiorella PD, Olson JR, Napoli JL**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces diverse retinoic acid metabolites in multiple tissues of the Sprague-Dawley rat.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1995) 134(2), 222-8
- (98) **Ashida H, Matsumura F**  
Effect of *in vivo* administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on DNA-binding activities of nuclear transcription factors in liver of guinea pigs.  
*Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (1998) 12(4), 191-204
- (99) **Lorick KL, Toscano DL, Toscano WAJ**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters retinoic acid receptor function in human keratinocytes.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1998) 243(3), 749-52
- (100) **Rubin AL, Rice RH**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polycyclic aromatic hydrocarbons suppress retinoid-induced tissue transglutaminase in SCC-4 cultured human squamous carcinoma cells.  
*Carcinogenesis* (1988) 9(6), 1067-70
- (101) **Weston WM, Nugent P, Greene RM**  
Inhibition of retinoic-acid-induced gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1995) 207(2), 690-4
- (102) **De Leenheer AP, Lambert WE, Meyer E**  
Chromatography of retinoids.  
*In: Livrea MA (Hrsg.): Retinoids, progress in research and clinical applications New York, M Dekker* (1993) 551-68
- (103) **Furr HC, Barua AB, Olson JA**  
Retinoids and carotenoids.  
*In: De Leenheer AP, Lambert WE, Nelis HJ (Hrsg.): Modern chromatographic analysis of vitamins 2. Aufl. New York, Marcel Dekker Inc* (1992) 1-71
- (104) **Wyss R**  
Chromatography of retinoids.  
*Journal of Chromatography* (1990) 531, 481-508
- (105) **Frolik CA, Olson JA**  
Extraction, separation, and chemical analysis of retinoids.  
*In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Hrsg.): The retinoids. Volume 1 1. Aufl. Orlando, Academic Press, Inc* (1984) 181-233

- (106) **Hébuterne X, Wang XD, Johnson J, Krinsky NI, Russell RM**  
Intestinal absorption and metabolism of 9-*cis*- $\beta$ -carotene *in vivo*, biosynthesis of 9-*cis*-retinoic acid.  
*Journal of Lipid Research* (1995) 36, 1264-73
- (107) **Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS**  
Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat.  
*Journal of Biological Chemistry* (1995) 270(30), 17850-7
- (108) **Tang G, Russell RM**  
13-*cis*-retinoic acid is an endogenous compound in human serum.  
*Journal of Lipid Research* (1990) 31, 175-82
- (109) **De Leenheer AP, Nelis HJ, Lambert WE, Bauwens RM**  
Chromatography of fat-soluble vitamins in clinical chemistry.  
*Journal of Chromatography* (1988) 429, 3-58
- (110) **Chadwick RR, Hsieh JC**  
Separation of *cis* and *trans* double-bond isomers using capillary zone electrophoresis.  
*Analytical Chemistry* (1991) 63, 2377-80
- (111) **Shi H, Ma Y, Humphrey JH, Craft NE**  
Determination of vitamin A in dried human blood spots by high-performance capillary electrophoresis with laser-excited fluorescence detection.  
*Journal of Chromatography B* (1995) 665, 89-96
- (112) **Ma Y, Wu Z**  
Fast minimicroassay of serum retinol (vitamin A) by capillary zone electrophoresis with laser-excited fluorescence detection.  
*Journal of Chromatography* (1993) 616, 25-30
- (113) **Ong CP, Lee CLNGH, Li SFY**  
Separation of water- and fat-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.  
*Journal of Chromatography* (1991) 547, 419-28
- (114) **Hsieh YZ, Kuo KL**  
Separation of retinoids by micellar electrokinetic capillary chromatography.  
*Journal of Chromatography A* (1997) 761, 307-13
- (115) **Bempong DK, Honigberg IL MN**  
Separation of 13-*cis*- and all-*trans* retinoic acid and their photodegradation products using capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography (MEC).  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (1993) 11(9), 829-33
- (116) **Chan KC, Lewis KC, Phang JM, Issaq HJ**  
Separation of retinoic acid isomers using micellar electrokinetic chromatography.  
*Journal of High Resolution Chromatography* (1993) 16, 560-1

- 
- (117) **Profumo A, Profumo V, Vidali G**  
Micellar electrokinetic capillary chromatography of three natural vitamin A derivatives.  
*Electrophoresis* (1996) 17, 1617-21
- (118) **Eckhoff C, Nau H**  
Identification and quantitation of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid in human plasma.  
*Journal of Lipid Research* (1990) 31, 1445-54
- (119) **Camman K**  
Instrumentelle Analytische Chemie.  
Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag (2001)
- (120) **Hagen JJ, Washco KA, Monnig C**  
Determination of retinoids by reversed-phase capillary liquid chromatography with amperometric electrochemical detection.  
*Journal of Chromatography B* (1996) 677, 225-31
- (121) **MacCrehan WA, Schönberger E**  
Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of retinol and its isomers.  
*Journal of Chromatography* (1987) 417, 65-78
- (122) **MacCrehan WA**  
Determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum liquid chromatography.  
*Methods in Enzymology* (1990) 189, 172-81
- (123) **Sakhi AK, Gundersen TE, Ulven SM, Blomhoff R, Lundanes E**  
Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection.  
*Journal of Chromatography A* (1998) 828, 451-60
- (124) **Molander P, Gundersen TE, Haas C, Greibrokk T, Blomhoff R, Lundanes E**  
Determination of retinoids by packed-capillary liquid chromatography with large-volume on-column focusing and temperature optimization.  
*Journal of Chromatography A* (1999) 847, 59-68
- (125) **Böcker J**  
Chromatographie. Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese.  
Würzburg, Vogel Buchverlag (1997)
- (126) **Garland WA, Huselton CA, Kolinsky F, Liberato DJ**  
A road less travelled: normal phase microbore liquid chromatography-mass spectrometry using direct liquid introduction.  
*Trends in Analytical Chemistry* (1991) 10, 177

- (127) **Ranald UB, Lausecker BB, Huselton C**  
Micro liquid chromatography-mass spectrometry with direct liquid introduction used for separation and quantitation of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acids and their 4-oxo metabolites in human plasma.  
*Journal of Chromatography* (1993) 617, 129-35
- (128) **Eckhoff C, Wittfoht W, Nau H, Slikker Jr W**  
Characterization of oxidized and glucuronidated metabolites of retinol in monkey plasma by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry.  
*Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* (1990) 19, 428-33
- (129) **Creech Kraft J, Slikker W, Bailey JR, Roberts LG, Fischer B, Wittfoht W, Nau H**  
Plasma pharmacokinetics and metabolism of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid in the cynomolgus monkey and the identification of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoyl-beta-glucuronides. A comparison to one human case study with isotretinoin.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1991) 19, 317-24
- (130) **Salyers KL, Cullum ME, Zile MH**  
Glucuronidation of all-*trans*-retinoic acid in liposomal membranes.  
*Biochimica et Biophysica Acta* (1993) 1152, 328-34
- (131) **Lehman PA, Franz TJ**  
A sensitive high-pressure liquid chromatography/particle beam/mass spectrometry assay for the determination of all-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid in human plasma.  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* (1996) 85, 287-90
- (132) **Ulven SM, Gundersen TE, Weedon MS, Landaas V, Sakhi AK, Fromm SH, Geronimo BA, Moskaug JO, Blomhoff R**  
Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-*trans*-retinoic acid.  
*Developmental Biology* (2000) 220, 379-91
- (133) **Van Breemen RB, Huang CR**  
High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of retinoids.  
*The FASEB Journal* (1996) 10(9), 1098-101
- (134) **Van Breemen RB, Nikolic D, Xu X, Xiong Y, van Lieshout M, West CE, Schilling AB**  
Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry.  
*Journal of Chromatography A* (1998) 794, 245-51
- (135) **Tang G, Andrien BA, Dolnikowski GG, Russel RM**  
Atmospheric pressure chemical ionization and electron capture negative chemical ionization mass spectrometry in studying  $\beta$ -carotene conversion to retinol in humans.  
*Methods in Enzymology* (1997) 282, 140-54

- 
- (136) **Wang Y, Xiaoying X, van Lieshout M, West CE, Lugtenburg J, Verhoeven MA, Creemers AFL, Muhilal, Van Breemen RB**  
A liquid chromatography - mass spectrometry method for the quantification of bioavailability and bioconversion of  $\beta$ -carotene to retinol in humans.  
*Analytical Chemistry* (2000) 72(20), 4999-5003
- (137) **Kellner R, Mermet J-M, Otto M, Widmer HM** (Hrsg.)  
Analytical Chemistry, the authentic text to FECS curriculum analytical chemistry.  
*Weinheim, Berlin, New York, Wiley-VCH Verlag GmbH* (1998)
- (138) **Albert K, Schlotterbeck G, Braumann U, Händel H, Spraul M, Krack G**  
Structure determination of vitamin A acetate isomers through coupled HPLC and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy.  
*Angewandte Chemie/International Edition in English* (1995) 34(9), 1014-6
- (139) **Albert K**  
Liquid chromatography - nuclear magnetic resonance spectroscopy.  
*Journal of Chromatography A* (1999) 856, 199-211
- (140) **Pursch M, Strohschein S, Händel H, Albert K**  
Temperature-dependent behaviour of C30 interphases. A solid-state NMR and LC-NMR study.  
*Analytical Chemistry* (1996) 68, 386-93
- (141) **Strohschein S, Schlotterbeck G, Richter J, Pursch M, Tseng LH, Händel H, Albert K**  
Comparison of the separation of *cis/trans* isomers of tretinoin with the different stationary phases by liquid chromatography-nuclear magnetic resonance coupling.  
*Journal of Chromatography A* (1997) 765, 207-14
- (142) **Wilson ID, Lindon JC, Nicholson JK**  
Advancing hyphenated chromatography.  
*Analytical Chemistry* (2000) August 1, 534A-542A
- (143) **Barua AB, Furr HC**  
Properties of retinoids.  
*Molecular Biotechnology* (1998) 10, 167-82
- (144) **Collins MD, Eckhoff C, Slikker W, Bailey JR, Nau H**  
Quantitative plasma disposition of retinol and retinyl esters after high-dose oral vitamin A administration in the cynomolgus monkey.  
*Fundamental and Applied Toxicology* (1992) 19, 109-16
- (145) **De Ruyter MGM, De Leenheer AP**  
Effect of silver ions on the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of retinyl esters.  
*Analytical Chemistry* (1979) 51, 43-6
- (146) **Furr HC, Cooper DA, Olson JA**  
Separation of retinyl esters by non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography* (1986) 378, 45-53

- (147) **Lanvers C, Hempel G, Blaschke G, Boos J**  
Simultaneous determination of all-*trans*-, 13-*cis*- and 9-*cis*-retinoic acid, their 4-oxo-metabolites and all-*trans*-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography B* (1996) 685, 233-40
- (148) **Barua AB, Olson JA**  
Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples.  
*Journal of Chromatography B* (1998) 707, 69-79
- (149) **Disdier B, Bun H, Catalin J, Durand A**  
Simultaneous determination of all-*trans*-, 13-*cis*-, 9-*cis*-retinoic acid and their 4-oxo-metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography B* (1996) 683, 143-54
- (150) **Dzerk AM, Carlson A, Loewen GR, Shirley A, Lee W**  
A HPLC method for the determination of 9-*cis* retinoic acid (ALRT1057) and its 4-oxo metabolite in human plasma.  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (1998) 16, 1013-9
- (151) **Gundersen TE, Laudanes E, Blomhoff R**  
Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of retinoids in human serum using on-line solid-phase extraction and column switching.  
Determination of 9-*cis*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, all-*trans*-retinoic acid, 4-oxo-all-*trans* retinoic acid and 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid.  
*Journal of Chromatography B* (1997) 691, 43-58
- (152) **Gundersen TE, Blomhoff R**  
On-line solid-phase extraction and isocratic separation of retinoic acid isomers in microbore column switching system.  
*Methods in Enzymology* (1999) 299, 430-41
- (153) **Takeda N, Yamamot A**  
Simultaneous determination of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acids and retinol in human serum by high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography B* (1994) 657, 53-9
- (154) **Teerlink T, Copper M, Klaassen I, Braakhuis BJM**  
Simultaneous analysis of retinol, all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid in plasma by liquid chromatography using on column concentration after single-phase fluid extraction.  
*Journal of Chromatography B* (1997) 694, 83-92
- (155) **Motto MG, Facchine KL, Hamburg PF, Burinsky DJ, Dunphy R, Oyler AR, Cotter ML**  
Separation and identification of retinoic acid photoisomers.  
*Journal of Chromatography* (1989) 481, 255-62



- 
- (156) **Sass JO, Nau H**  
Single-run analysis of isomers of retinoyl- $\beta$ -D-glucuronide and retinoic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography A* (1994) 685, 182-8
- (157) **Sundquist AR, Stahl W, Steigel A, Sies H**  
Separation of retinoic acid all-*trans*, mono-*cis* and poly-*cis* isomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography* (1993) 637, 201-5
- (158) **Wyss R, Bucheli F**  
Determination of endogenous levels of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin), all-*trans*-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection.  
*Journal of Chromatography B* (1997) 700, 31-47
- (159) **Horst RL, Reinhardt TA, Goff JP, Koszewski NJ, Napoli JL**  
9,13-di-*cis*-retinoic acid is the major circulating geometric isomer of retinoic acid in the periparturient period.  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* (1995) 322(1), 235-9
- (160) **Horst RL, Reinhardt TA, Goff JP, Nonnecke BJ, Gambhir VK, Fiorella PD, Napoli JL**  
Identification of 9-*cis*-, 13-*cis*-retinoic acid as a major circulating retinoid in plasma.  
*Biochemistry* (1995) 34, 1203-9
- (161) **Muruyama A, Suzuki T, Matsui M**  
Biological effect of geometrical isomers of retinoic acid on human promyelocytic leukemia (HL-60) cells.  
*Proceeding of the Japan Academy* (1994) 70 (Ser. B), 81-6
- (162) **Creech Kraft J, Eckhoff C, Kuhnz W, Löfberg B, Nau H**  
Automated determination of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and retinol in plasma, amniotic fluid and embryo by reversed-phase high performance liquid chromatography with a precolumn switching technique.  
*Journal of Liquid Chromatography* (1988) 11, 2051-69
- (163) **Eckhoff C, Löfberg B, Chahoud I, Bochert G, Nau H**  
Transplacental pharmacokinetics and teratogenicity of a single dose of retinol (vitamin A) during organogenesis in the mouse.  
*Toxicology Letters* (1989) 48, 171-84
- (164) **Rühl R**  
Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Retinoiden und deren Glukuronide zum Verständnis deren embryotoxischer Wirkung.  
*Dissertation* (1998) *Freie Universität Berlin*
- (165) **Evans RM, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Boehm MF, Eichele G, Thaller C**  
Means for the modulation of processes mediated by retinoid receptors and compounds useful therefore.  
*Patent PCT/US92/11214, A61K31/07, C07C403/20* (1993)

- (166) **Barua AB, Furr HC**  
Properties of retinoids. Structure, handling and preparation.  
*Methods in Molecular Biology (1998)* 89, 3-28
- (167) **Oehme M**  
Organische Spurenanalytik. Praktische Probleme und ihre Lösung - Kontaminationen und Lösemittelverluste.  
*LABO (1998) Sonderdruck (3)*
- (168) **Bligh EG, Dyer WJ**  
A rapid method of total lipid extraction and purification.  
*Canadian Journal of Biochemistry and Physiology (1959)* 37(8), 911-7
- (169) **Collins MD, Eckhoff C, Chahoud I, Bochert G, Nau H**  
4-Methylpyrazole partially ameliorated the teratogenicity of retinol and reduced the metabolic formation of all-*trans*-retinoic acid in the mouse.  
*Archives of Toxicology (1992)* 66, 652-9
- (170) **McDowall RD**  
Sample preparation for biomedical analysis.  
*Journal of Chromatography (1989)* 492, 3-58
- (171) **Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE**  
Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns.  
*Journal of Lipid Research (1985)* 26, 135-40
- (172) **Tang G, Russell RM**  
Formation of all-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid from all-*trans*-retinyl palmitate in humans.  
*Journal of Nutritional Biochemistry (1991)* 2, 210-3
- (173) **Periquet B, Lambert W, Garcia J, Lecomte G, De Leenheer AP, Mazieres B, Thouvenot JP, Arlet J**  
Increased concentrations of endogenous 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acids in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, as demonstrated by HPLC.  
*Clinica Chimica Acta (1991)* 203, 57-66
- (174) **Sadek PC**  
The HPLC solvent guide.  
*New York, John Wiley & Sons, Inc (1996)*
- (175) **Blevins DD, Hall DO**  
Recent advances in disc-format solid-phase-extraction.  
*LC/GC 1998 Current Trends and Developments in Sample Preparation, Supplement to LC/GC 09/1998*, 17-20
- (176) **Hennion M-C**  
Solid-phase extraction, method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography A (1999)* 856, 3-54

- 
- (177) **Lingeman H, Hoekstra-Oussoren SJF**  
Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis.  
*Journal of Chromatography B* (1997) 689, 221-37
- (178) **Majors RE**  
Sample concentration by evaporation.  
*LC/GC International* (1999) 12, 628-37
- (179) **Schwedt G**  
Chromatographische Trennmethoden.  
3. Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1994)
- (180) **Ross AC**  
Separation of long-chain fatty acid esters of retinol by high-performance liquid-chromatography.  
*Analytical Biochemistry* (1981) 115, 324-30
- (181) **Molander P, Thommesen SJ, Bruheim IA, Trones R, Greibrokk T, Lundanes E, Gundersen TE**  
Temperature-programmed packed capillary liquid chromatography separation with large volume on-column focusing of retinyl esters.  
*Journal of High Resolution Chromatography* (1999) 22(9), 490-4
- (182) **Vissers JPC**  
Recent developments in microcolumn liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography A* (1999) 856, 117-43
- (183) **Abian J, Oosterkamp AJ, Gelpi E**  
Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry.  
*Journal of Mass Spectrometry* (1999) 34, 244-54
- (184) **Eppert GJ**  
Flüssigchromatographie. HPLC - Theorie und Praxis.  
3. Aufl. Braunschweig/Wiesbaden, Vieweg (1997)
- (185) **Engelhardt H**  
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.  
Berlin, Springer-Verlag (1977)
- (186) **Majors RE**  
Analytical HPLC column technology - the current status.  
*LC/GC International* (1998), *Current Issues in HPLC Technology* (April), 7-21
- (187) **Meyer V**  
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie.  
4. Aufl. Frankfurt am Main, Diesterweg (1986)
- (188) **Majors RE**  
New chromatography columns and accessories at the 2001 Pittsburgh Conference, part I.  
*LC/GC Europe* (2001) 14(5), 284-301

- (189) **Braithwaite A, Smith FJ**  
Chromatographic methods.  
*5. Aufl. London, Chapman & Hall (1996)*
- (190) **Dolan JW**  
Extracolumn band broadening from injection and peak transfer.  
*LC/GC International (1998) 11(4), 199-202*
- (191) **Gilbert MT**  
High performance liquid chromatography.  
*Bristol, IOP Publishing Limited (1987)*
- (192) **Nelson MD, Dolan JW**  
UV detector noise.  
*LC/GC International (1999) 12(2), 64-70*
- (193) **Dolan JW**  
Mobile-phase degassing: why, when and how.  
*LC/GC Europe (1999) 12(11), 692-6*
- (194) **Dolan JW**  
How much is too much?  
*LC/GC International (1999) 12(7), 406-9*
- (195) **Dolan JW**  
Scaling gradients.  
*LC/GC International (1998) 11(2), 70-2*
- (196) **Dolan JW**  
Reducing column diameter in gradient elution - a case study.  
*LC/GC Europe (2001) 14(1), 14-7*
- (197) **Merdink JL, Dolan JW**  
Scaling gradient LC methods to LC-MS.  
*LC/GC Europe (2000) 13(11), 806-11*
- (198) **Molnar I**  
Robuste HPLC-Methoden Teil 3. Robuste isokratische und robuste Gradientenmethoden.  
*Laborpraxis (1998), Heft 10, 72-9*
- (199) **Dolan JW**  
Starting out right, part IV - additional variables to control selectivity.  
*LC/GC (2000) 13(4), 220-4*
- (200) **Wolcott RG, Dolan JW**  
Column temperature effects in gradient elution.  
*LC/GC International (1999) 12(1), 14-8*
- (201) **Kromidas S**  
HPLC-Tips Band I.  
*Darmstadt, Verlag Hoppenstedt GmbH (1997)*

- 
- (202) **Kromidas S**  
Der HPLC-Tipp im November: Erniedrigung der Nachweisgrenze durch Optimierung der Injektion.  
*LABO (2000), Heft 11, 69*
- (203) **Merck-Hitachi**  
Gebrauchsanweisung AS-4000.  
*(1993)*
- (204) **Noy N**  
Physical-Chemical Properties and Action of Retinoids.  
*In: Nau H, Blaner WS (Hrsg.): Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action.*  
*Berlin, Springer-Verlag (1999) 3-29*
- (205) **Kromidas S**  
Der HPLC-Tipp im Juni: Verschiebung des pH-Wertes im Eluenten.  
*LABO (2000), Heft 6, 66*
- (206) **Wilson N, Kern J, Dolan JW**  
Sample overload - friend or foe.  
*LC/GC International (1998) 11(6), 350-4*
- (207) **Huber L**  
Validation of analytical methods, review and strategy.  
*LC/GC International (1998) 11(2), 96-105*
- (208) **Kromidas S**  
Validierung in der Analytik.  
*1. Aufl. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH (1999)*
- (209) **Gottwald W**  
Statistik für Anwender.  
*Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH (2001)*
- (210) **Eckhoff C, Collins MD, Nau H**  
Human plasma all-*trans*-, 13-*cis*- and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid profiles during subchronic vitamin A supplementation, comparison of retinol and retinyl ester plasma levels.  
*The Journal of Nutrition (1991) 121, 1016-25*
- (211) **Funk W, Dammann V, Vonderheid C, Oehlmann G**  
Statistische Methoden in der Wasseranalytik. Begriffe, Strategien, Anwendungen.  
*Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH (1985)*
- (212) **Wünsch G**  
Robustheit und Anfälligkeit als Kenngrößen zur Bewertung analytischer Systeme.  
*Journal für praktische Chemie (1994) 336, 319-24*
- (213) **Molnar I**  
Robuste HPLC-Methoden Teil 1. Der Validierungsprozess bei HPLC-Analysen.  
*Laborpraxis (1998), Heft 7/8, 56-60*

- (214) **Molnar I**  
Robuste HPLC-Methoden Teil 2. Definitionen und Überprüfung der Robustheit.  
*Laborpraxis (1998), Heft 9, 20-3*
- (215) **Frickel F**  
Chemistry and physical properties of retinoids.  
*In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Hrsg.): The retinoids. Volume 1  
1. Aufl. Orlando, Academic (1984), 8-145*
- (216) **Isler O, Brubacher G**  
Fettlösliche Vitamine.  
*1. Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1982)*
- (217) **Deutsches Institut für Normung e V**  
DIN 32 645; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Ermittlung unter  
Wiederholbedingungen. Begriffe, Verfahren, Auswertung.  
*Arbeitsausschuß Chemische Terminologie (1994) 1-10*
- (218) **Sass JO, Tzimas G, Nau H**  
9-*cis*-retinoyl- $\beta$ -D-glucuronide is a major metabolite of 9-*cis*-retinoic acid.  
*Life Sciences (1994) 54(6), 69-74*
- (219) **Finnigan/Thermoquest**  
LCQ benchtop LC/MS<sup>n</sup> detector.  
*Werbebroschüre (1997)*
- (220) **Cooks RG, Glish GL, McLuckey SA, Kaiser RE**  
Ion trap mass spectrometry.  
*Chemical & Engineering News (1991) 69, 26-41*
- (221) **McLuckey SA, Van Berkel GJ, Goeringer DE, Glish GL**  
Ion trap mass spectrometry.  
*Analytical Chemistry (1994) 66(14), 737A-743A*
- (222) **McLuckey SA, Van Berkel GJ, Goeringer DE, Glish GL**  
Ion trap mass spectrometry of externally generated ions.  
*Analytical Chemistry (1994) 66(13), 689A-696A*
- (223) **Thermoquest**  
Triple Quads or Ion Traps continued.  
*Informationsblatt (1998)*
- (224) **Finnigan/Thermoquest**  
LCQ MS detector hardware manual.  
(1998)
- (225) **Kölliker S, Oehme M**  
HPLC-MS<sup>n</sup> HPLC kombiniert mit multipler Ionenfallen-Massenspektrometrie (MS<sup>n</sup>),  
ein Durchbruch für die Spurenanalytik und Strukturaufklärung im ng-Bereich?  
*LABO Trend (1997) 20-6*

- 
- (226) **Niessen WMA**  
Analytical mass spectrometry.  
*In: Kellner R, Mermet J-M, Otto M, Widmer HM (Hrsg.): Analytical Chemistry The Approved Text to the FECS Curriculum Analytical Chemistry Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH (1998) 603-39*
- (227) **Hübschmann H-J**  
GC/MS/MS zur strukturspezifischen Detektion Teil 1. Grundlagen.  
*Laborpraxis (1998), Heft 7/8, 65-7*
- (228) **Hübschmann H-J**  
GC/MS/MS zur strukturspezifischen Detektion Teil 2. Anwendungen.  
*Laborpraxis (1998), Heft 10, 66-8*
- (229) **Klink F, Majors RE**  
New sample preparation approaches to biological matrices for LC-MS.  
*LC/GC Europe (2000) 13(6), 396-409*
- (230) **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM**  
Electrospray ionization - principles and practice.  
*Mass Spectrometry Reviews (1990) 9, 37-70*
- (231) **Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga CJ, Udseth HR**  
New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization.  
*Analytical Chemistry (1990) 62, 882-99*
- (232) **Bruins AP**  
Mechanistic aspects of electrospray ionization.  
*Journal of Chromatography A (1998) 794, 345-57*
- (233) **Kebarle P, Tang L**  
From ions in solution to ions in the gas phase: the mechanism of electrospray mass spectrometry.  
*Analytical Chemistry (1993) 65(22), 972A-986A*
- (234) **Lehmann W-D**  
Physikalische Methoden in der Chemie: Massenspektrometrie.  
*Chemie in unserer Zeit (1991) 6, 308-15*
- (235) **Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P**  
Electrospray-ion spray. A comparison of mechanisms and performance.  
*Analytical Chemistry (1991) 63, 1989-98*
- (236) **Abian J**  
The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry.  
*Journal of Mass Spectrometry (1999) 34, 157-68*
- (237) **Gundersen TE, Ulven SM, and Blomhoff R**  
Ultrasensitive screening of retinoids in minute embryonic samples.  
*Tagungsbeitrag, „Retinoids `99“, European Research Group, Strasbourg, Frankreich*

- (238) **Tzimas G, Sass JO, Wittfoht W, Elmazar MMA, Ehlers K, Nau H**  
Identification of 9,13-dicis-retinoic acid as a major plasma metabolite of 9-cis-retinoic acid and limited transfer of 9-cis-retinoic acid and 9,13-dicis-retinoic acid to the mouse and rat embryos.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1994) 22(6), 928-36
- (239) **Tzimas G, Collins MD, Bürgin H, Hummler H, Nau H**  
Embryotoxic doses of vitamin A to rabbits result in low plasma but high embryonic concentrations of all-trans-retinoic acid, risk of vitamin A exposure in humans.  
*The Journal of Nutrition* (1996) 126, 2159-71
- (240) **Temesi D, Law B**  
The effect of LC eluent composition on MS responses using electrospray ionization.  
*LC/GC International* (1999) 12(3), 175-80
- (241) **Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P**  
Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry.  
*Analytical Chemistry* (1990) 62, 957-67
- (242) **Vakiani E, Buck J**  
Retro-retinoids: metabolism and action.  
In: Nau H, Blauer WS (Hrsg.): *Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action.*  
Berlin, Springer-Verlag (1999) 97-115
- (243) **Rücker G, Neugebauer M, Willems GG**  
Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysenmethoden.  
Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (1992)
- (244) **Aig E, Focella A, Parrish DR, Rosenberger M, Scott JW, Zenchoff GB**  
Synthesis of the major metabolites of (2E, 4E, 6E, 8E)- and (2Z, 4E, 6E, 8E) - 3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acids (retinoic acid and 13-cis-retinoic acid).  
*Synthetic Communications* (1987) 17(4), 419-29
- (245) **Barua AB, Das SR, Verma K**  
Occurrence of 3-hydroxyretinol in the freshwater fish *Bagarius bagarius* and *Wallago attu*.  
*The Biochemical Journal* (1977) 168, 557-64
- (246) **Borhan B, Souto ML, Um JM, Zhou B, Nakanishi K**  
Efficient synthesis of 11-cis-retinoids.  
*Chemistry: a European Journal* (1999) 5(4), 1172-5
- (247) **Hänni R, Bigler F**  
Isolation and identification of three major metabolites of retinoic acid from rat feces.  
*Helvetica Chimica Acta* (1977) 60(3), 881-7



- (248) **Halley BA, Nelson EC**  
High-performance liquid chromatography and proton nuclear magnetic resonance of eleven isomers of methyl retinoate.  
*Journal of Chromatography* (1979) 175, 113-23
- (249) **McKenzie RM, Hellwege DM, McGregor ML, Rockley NL, Riquetti PJ, Nelson EC**  
Separation and identification of geometric isomers of retinoic acid and methyl retinoate.  
*Journal of Chromatography* (1978) 155, 379-87
- (250) **Rosenberger M, Neukom C**  
Retinoic acid metabolites. 3. Total synthesis of (2E,4E,6E, 8E)-3,7-dimethyl-9-[6,6-dimethyl-2-(hydroxymethyl)-1-cyclohexen-1-yl]-2,4,6,8-nonatetraenoic acid.  
*The Journal of Organic Chemistry* (1982) 47(9), 1782-5
- (251) **Rosenberger M, Neukom C**  
Retinoic acid metabolites. 2. Total synthesis of rac-(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(6-carboxy-2,6-dimethyl-3-oxo-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid and rac-(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-[2,6-dimethyl-6-(hydroxymethyl)-3-oxo-1-cyclohexen-1-yl]-2,4,6,8-nonatetraenoic acid.  
*The Journal of Organic Chemistry* (1982) 47, 1779-82
- (252) **Rosenberger M**  
Retinoic acid metabolites. 1. Total synthesis of 4-hydroxy and 4-oxoretinoic acid.  
*The Journal of Organic Chemistry* (1982) 47, 1698-701
- (253) **Vane FM, Bugge CJL**  
Identification of 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid as the major metabolite of 13-*cis*-retinoic acid in human blood.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1981) 9(6), 515-20
- (254) **Vane FM, Bugge CJL, Williams TH**  
Metabolism of 13-*cis*-retinoic acid by a rat liver 9000g supernatant preparation.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1982) 10(3), 212-9
- (255) **Vane FM, Bugge CJL, Rodriguez LC, Rosenberger M, Doran TI**  
Human biliary metabolites of isotretinoin: identification, quantification, synthesis and biological activity.  
*Xenobiotica* (1990) 20, 193-207
- (256) **Waldmann D, König T, Schreier P**  
Iron(III)porphinate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated conversion of all-(E)-retinol.  
*Zeitschrift für Naturforschung* (1995) 50b, 589-94
- (257) **Liu RS, Asato AE**  
Photochemistry and synthesis of stereoisomers of vitamin A.  
*Tetrahedron* (1984) 40(10), 1931-69
- (258) Persönliche Mitteilung von Hofmann-La Roche, Basel, Schweiz (2001)

- (259) **Napoli JL, Khalil H, McCormick AM**  
Metabolism of 5,6-epoxyretinoic acid *in vivo*, isolation of a major intestinal metabolite.  
*Biochemistry* (1982) 21(8), 1942-9
- (260) **Hackbarth H**  
Grundlagen der Versuchstierkunde.  
*1. Aufl. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag* (1995)
- (261) **McPhillips DM, Kalin JR, Hill DL**  
The pharmacokinetics of all-*trans*-retinoic acid and N-(2-hydroxyethyl)retinamide in mice as determined with a sensitive and convenient procedure. Solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1987) 15(2), 207-11
- (262) **Satre MA, Ugen KE, Kochhar DM**  
Developmental changes in endogenous retinoids during pregnancy and embryogenesis in the mouse.  
*Biology of Reproduction* (1992) 42, 802-10
- (263) **Mulder GB, Manley N, Grant J, Schmidt K, Zeng W, Eckhoff C, Maggio-Price L**  
Effects of excess of vitamin A on development of cranial neural crest-derived structures, a neonatal and embryologic study.  
*Teratology* (2000) 62, 214-26
- (264) **Kochhar DM, Penner JD, Satre MA**  
Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol (vitamin A) in mice.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1988) 96, 429-41
- (265) **Tzimas G**  
Investigations on the metabolism and the pharmacokinetics of retinol and retinoic acid isomers toward understanding of the interspecies variations of retinoid teratogenicity and human risk assessment.  
*Dissertation* (1996) *Freie Universität Berlin*
- (266) **Muindi J, Frankel SR, Miller WH Jr, Jakubowski A, Scheinberg DA**  
Continuous treatment with all-*trans* retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations, implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia.  
*Blood* (1992) 79, 299-303
- (267) **Creech Kraft J, Slikker Jr W, Bailey JR, Roberts LG, Fischer B, Wittfoht W, Nau H**  
Plasma pharmacokinetics and metabolism of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid in the cynomolgus monkey and the identification of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoyl- $\beta$ -glucuronides: a comparison to one human case study with isotretinoin.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1991) 19(2), 317-24

- 
- (268) **Tzimas G, Nau H, Hummler H, Peterson PE**  
Retinoid metabolism and transplacental pharmacokinetics in the cynomolgus monkey following a nonteratogenic dosing regimen with all-*trans*-retinoic acid.  
*Teratology* (1996) 54, 255-65
- (269) **Tembe EA, Honeywell R, Buss NE, Renwick AG**  
All-*trans*-retinoic acid in maternal plasma and teratogenicity in rats and rabbits.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1996) 141, 456-72
- (270) **Collins MD, Tzimas G, Bürgin H, Hummler H, Nau H**  
Single versus multiple dose administration of all-*trans*-retinoic acid during organogenesis: differential metabolism and transplacental kinetics in rat and rabbit.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1995) 130, 9-18
- (271) **Tzimas G, Bürgin H, Collins MD, Hummler H, Nau H**  
Pharmacokinetics of all-*trans*-retinoic acid in pregnant rabbits after single and multiple oral administration.  
*Teratology* (1992) 46, 30A
- (272) **Kalin JR, Wells MJ, Hill DL**  
Effects of phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and retinoid pretreatment on disposition of orally administered retinoids in mice.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1984) 12(1), 63-7
- (273) **Muindi JR, Young CW, Warrell RP**  
Clinical pharmacology of all-*trans* retinoic acid.  
*Leukemia* (1994) 8(Suppl3), S16-S21
- (274) **Adamson PC, Boylan JF, Balis FM, Murphy RF, Godwin KA, Gudas LJ, Poplack DG**  
Time course of induction of metabolism of all-*trans*-retinoic acid and the upregulation of cellular retinoic acid-binding protein.  
*Cancer Research* (1993) 53, 472-6
- (275) **el Mansouri S, Tod M, Leclercq M, Petitjean O, Perret G, Porthault M**  
Time- and dose-dependent kinetics of all-*trans*-retinoic acid in rats after oral or intravenous administration(s).  
*Drug Metabolism and Disposition* (1995) 23, 227-31
- (276) **Leo MA, Shinji I, Lieber CS**  
Retinoic acid metabolism by a system reconstituted with cytochrome P450.  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* (1984) 234, 305-12
- (277) **Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC**  
Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats.  
*The FASEB Journal* (2000) 14, 2119-27
- (278) **Buss NE, Tembe EA, Prendergast BD, Renwick AG, George CF**  
The teratogenic metabolites of vitamin A in women following supplements and liver.  
*Human & Experimental Toxicology* (1994) 13, 33-43

- (279) **Mize CE, Steinberg D, Avigan J, Fales HM**  
A pathway for oxidative degradation of phytanic acid in mammals.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1966) 25, 329-65
- (280) **Vanhove G, van Veldhoven PP, Vanhoutte F, Parmentier G, Eysen HJ, Mannaerts GP**  
Mitochondrial and peroxisomal beta oxidation of the branched chain fatty acid 2-methylpalmitate in rat liver.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1991) 266, 24670-5
- (281) **Wolf G, Kahn SG, Connor J**  
Metabolism studies with radioactive vitamin A.  
*Journal of the American Chemical Society* (1957) 79, 1208-12
- (282) **Roberts AB, DeLuca HF**  
Pathways of retinol and retinoic acid metabolism in the rat.  
*The Biochemical Journal* (1967) 102, 600-5
- (283) **Pawson BA, Cheung H-C, Han R-JL, Trown PW, Buck M, Hansen R, Bollag W, Ineichen U, Pleil H, Rüegg R, Dunlop NM, Newton DL, Sporn MB**  
Dihydroretinoic acids and their derivatives. Synthesis and biological activity.  
*Journal of Medicinal Chemistry* (1977) 20(7), 918-25
- (284) **Willhite CC**  
Structure-activity relationships of retinoids in developmental toxicology. II. Influence of the polyene chain of the vitamin A molecule.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1986) 83, 563-75
- (285) **Raica N, Scott J, Lowry L, Sauberlich HE**  
Vitamin A concentration in human tissues collected from five areas in the United States.  
*American Journal of Clinical Nutrition* (1972) 25, 291-6
- (286) **Arnhold T, Tzimas G, Wittfoht W, Plonait S, Nau H**  
Identification of 9-*cis*-retinoic acid, 9-13-di-*cis*-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol in human plasma after liver consumption.  
*Life Sciences* (1996) 59(12), 169-77
- (287) **Eckhoff C, Nau H**  
Vitamin A supplementation increases levels of retinoic acid compounds in human plasma, possible implications for teratogenesis.  
*Archives of Toxicology* (1990) 64, 502-3
- (288) **Sass JO, Masgrau E, Saurat JH, Nau H**  
Metabolism of oral 9-*cis*-retinoic acid in the human.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1995) 23(9), 887-91
- (289) **Collins MD, Tzimas G, Hummler H, Bürgin H, Nau H**  
Comparative teratology and transplacental pharmacokinetics of all-*trans*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid and retinyl palmitate following daily administrations in rats.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1994) 127, 132-44

- (290) **Tzimas G, Collins MD, Nau H**  
Developmental stage-associated differences in the transplacental distribution of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid as well as their glucuronides in rats and mice.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1995) 133, 91-101
- (291) **Fattore E, Trossvik C, Hakansson H**  
Relative potency values derived from hepatic vitamin A reduction in male and female Sprague-Dawley rats following subchronic dietary exposure to individual polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran congeners and a mixture thereof.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (2000) 165, 184-94
- (292) **Brouwer A, Hakansson H, Kukler A, Van den Berg KJ, Ahlborg UG**  
Marked alterations in retinoid homeostasis of Sprague-Dawley rats induced by a single i.p. dose of 10 micrograms/kg of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
*Toxicology* (1989) 58(3), 267-83
- (293) **Chen H, Howald WN, Juchau MR**  
Biosynthesis of all-*trans*-retinoic acid from all-*trans*-retinol, catalysis of all-*trans*-retinol oxidation by human P-450 cytochromes.  
*Drug Metabolism and Disposition* (2000) 28(3), 315-22
- (294) **Raner G, Vaz ADN, Coon MJ**  
Metabolism of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral.  
*Molecular Pharmacology* (1996) 49, 515-22
- (295) **Roberts ES, Vaz ADN, Coon MJ**  
Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal.  
*Molecular Pharmacology* (1992) 41, 427-33
- (296) **Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky LS**  
Human cytochrome P-450 metabolism of retinals and retinoic acids.  
*Drug Metabolism and Disposition* (2000) 28(3), 292-7
- (297) **Van Wauwe J, Van Nyen G, Coene MC, Stoppie P, Cools W, Gossens J, Borghgraef P, Janssen PAJ**  
Liarozole, an inhibitor of retinoic acid metabolism, exerts retinoid-mimetic effects *in vivo*.  
*The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1992) 261, 773-9
- (298) **Nelson DR**  
A second CYP26 P450 in humans and zebrafish, CYP26B1.  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* (2000) 371(2), 345-7
- (299) **Sonneveld E, Van den Brink CE, Van der Leede B-JM, Schulkes RKAM, Petkovich M, Van der Burg B, van der Saag P**  
Human retinoic acid (RA) 4-hydroxylase (CYP26) is highly specific for all-*trans*-RA, and can be induced through retinoic acid receptors in human breast and colon carcinoma cells.  
*Cell Growth and Differentiation* (1998) 9, 629-37

- (300) **White JA, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam S-P, Petkovich M**  
Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-*trans*-retinoic acid metabolism.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (2000) 97(12), 6403-8
- (301) **Marchetti M-N, Sampol E, Bun H, Scoma H, Lacarelle B, Durand A**  
*In vitro* metabolism of three major isomers of retinoic acid in rats.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1997) 25(5), 637-46
- (302) **McSorley LC, Daly AK**  
Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-*trans*-retinoic acid 4-hydroxylation.  
*Biochemical Pharmacology* (2000) 60, 517-26
- (303) **Van den Bossche H, Willemsens G, Janssen PA**  
Cytochrome-P-450-dependent metabolism of retinoic acid in rat skin microsomes, inhibition by ketoconazole.  
*Skin Pharmacology* (1988) 1(3), 176-85
- (304) **Ahmad M, Nicholls PJ, Smith HJ, Ahmadi M**  
Effect of P450 isozyme-selective inhibitors on *in-vitro* metabolism of retinoic acid by rat hepatic microsomes.  
*Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2000) 52, 311-4
- (305) **Vecchini F, Lenoir-Viale MC, Cathelineau C, Magdalou J, Bernard BA, Shroot B**  
Presence of a retinoid responsive element in the promotor region of the human cytochrome P4501A1 gene.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1994) 201(3), 1205-12
- (306) **Vecchini F, Mace K, Magdalou J, Mahe Y, Bernard BA, Shroot B**  
Constitutive and inducible expression of drug metabolizing enzymes in cultured human keratinocytes.  
*British Journal of Dermatology* (1995) 132, 14-21
- (307) **Barua AB**  
Retinoyl  $\beta$ -glucuronide, a biologically active form of vitamin A.  
*Nutrition Reviews* (1997) 55( 7), 259-67
- (308) **Kalin JR, Starling ME, Hill DL**  
Disposition of all-*trans*-retinoic acid in mice following oral doses.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1981) 9, 196-201
- (309) **Kalin JR, Wells MJ, Hill DL**  
Disposition of 13-*cis*-retinoic acid and N-(2-hydroxyethyl)retinamide in mice following oral doses.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1982) 10, 391-8

- 
- (310) **Kojima R, Fujimori T, Kiyota N, Toriya Y, Fukuda T, Ohashi T, Sato T, Yoshizawa S, Takeyama K, Mano H, Masushige S, Kato S**  
*In vitro* isomerization of retinoic acids, rapid isomer exchange and gene expression.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1994) 269, 32700-7
- (311) **Sundaresan PR, Bhat PV**  
Ion-pair high-pressure liquid chromatography of *cis-trans* isomers of retinoic acid in tissues of vitamin A-sufficient rats.  
*Journal of Lipid Research* (1982) 23, 448-55
- (312) **Zile MH, Emerick RJ, DeLuca HF**  
Identification of 13-*cis*-retinoic acid in tissue extracts and its biological activity in rats.  
*Biochimica et Biophysica Acta* (1967) 141, 639-41
- (313) **Shih TW, Lin TH, Shealy, Hill DL**  
Nonenzymatic Isomerization of 9-*cis*-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1997) 25(1), 27-32
- (314) **Shih TW, Shealy YF, Strother DL, Hill DL**  
Nonenzymatic isomerization of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoids catalyzed by sulfhydryl compounds.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1997) 14, 698-702
- (315) **Urbach J, Rando RR**  
Thiol dependent isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid.  
*FEBS Letters* (1994) 351, 429-32
- (316) **Urbach J, Rando RR**  
Isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid.  
*The Biochemical Journal* (1994) 299, 459-65
- (317) **Chen H, Juchau MR**  
Glutathione S-transferases act as isomerases in isomerization of 13-*cis*-retinoic acid to all-*trans*-retinoic acid *in vitro*.  
*The Biochemical Journal* (1997) 327, 721-6
- (318) **Chen H, Juchau MR**  
Biotransformation of 13-*cis*- and 9-*cis*-RA to all-*trans*-retinoic acid in rat conceptual homogenates.  
*Drug Metabolism and Disposition* (1998) 26(3), 222-8
- (319) **Chen H, Juchau MR**  
Recombinant human glutathione S-transferases catalyze enzymic isomerization of 13-*cis*-retinoic acid to all-*trans*-retinoic acid *in vitro*.  
*The Biochemical Journal* (1998) 336, 223-6
- (320) **Shertzer HG, Nebert DW, Puga A, Ary M, Sonntag D, Dixon K, Robinson LJ, Cianciolo E, Dalton TP**  
Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1998) 253(1), 44-8

- (321) **Stohs SJ**  
Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).  
*Free Radical Biology & Medicine* (1990) 2, 79-90
- (322) **Stohs SJ, Shara MA, Alsharif NZ, Wahba ZZ, al-Bayati ZA**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in female rats.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1990) 106( 1), 126-35
- (323) **Aoki Y, Satoh K, Suzuki KT**  
Induction of glutathione-S-transferase P-form in primary cultured rat liver parenchymal cells by co-planar polychlorinated biphenyl congeners.  
*The Biochemical Journal* (1992) 281, 539-43
- (324) **Chu I, Lecavalier P, Hakansson H, Yagminas A, Valli VE, Poon P, Feeley M**  
Mixture effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyl congeners in rats.  
*Chemosphere* (2001) 43(4-7), 807-14
- (325) **Genchi G, Wang W, Barua AB, Bidlack WR, Olson JA**  
Formation of beta-glucuronides and of beta-galacturonides of various retinoids catalyzed by induced and noninduced microsomal UDP-glucuronosyltransferases in rat liver.  
*Biochimica et Biophysica Acta* (1996) 1289(2), 284-90
- (326) **Azais-Braesco V, Pascal G**  
Vitamin A in pregnancy, requirements and safety limits.  
*American Journal of Clinical Nutrition* (2000) 71, 1325S-33S
- (327) **Tzimas G, Bürgin H, Collins MD, Hummler H, Nau H**  
The high sensitivity of the rabbit to the teratogenic effects of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) is a consequence of prolonged exposure of the embryo to 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxo-retinoic acid, and not of isomerization to all-*trans*-retinoic acid.  
*Archives of Toxicology* (1994) 68, 119-28
- (328) **Krig SR, Rice RH**  
TCDD suppression of tissue transglutaminase stimulation by retinoids in malignant human keratinocytes.  
*Toxicological Sciences* (2000) 56, 357-64
- (329) **Hakansson H, Hanberg A**  
The distribution of [<sup>14</sup>C]-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and its effect on the vitamin A content in parenchymal and stellate cells of rat liver.  
*The Journal of Nutrition* (1989) 119(4), 573-80
- (330) **Ong DE**  
Cellular transport and metabolism of vitamin A, roles of the cellular retinoid-binding proteins.  
*Nutrition Reviews* (1994) 52, S24-S31
- (331) **Ong DE, Chytil F**  
Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity.  
*Nature* (1975) 255, 74-5



- 
- (332) **Bailey JS, Siu CH**  
Purification and partial characterization of a novel binding protein for retinoic acid from neonatal rat.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1988) 263, 9326-32
- (333) **Fiorella PD, Giguère V, Napoli JL**  
Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in *Escherichia coli*  
Characterization and comparison to cellular retinoic acid binding protein (type I).  
*The Journal of Biological Chemistry* (1993) 266, 21545-52
- (334) **Fogh K, Vorhees JJ, Aström A**  
Expression, purification and binding properties of human cellular retinoic acid binding protein (CRABP) type I and type II.  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* (1993) 300, 751-5
- (335) **Aström A, Tvakkol A, Pettersson U, Cromie M, Elder JT, Vorhees JJ**  
Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP)  
Retinoic acid-induced expression of CRABP-II in adult human skin *in vivo* and in skin fibroblasts *in vitro*.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1991) 266, 17662-6
- (336) **Siegenthaler G, Tomatis I, Chatellard-Gruaz D, Jaconi S, Eriksson U, Saurat JH**  
Expression of CRABP-I and -II in human epidermal cells. Alteration of relative protein amounts is linked to the state of differentiation.  
*The Biochemical Journal* (1992) 287, 383-9
- (337) **Ong DE, Newcomer ME, Chytil F**  
Cellular retinoid binding proteins.  
*In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Hrsg.): The Retinoids. Biology, chemistry and medicine*  
New York, Raven Press (1994) 283-318
- (338) **Napoli JL, Boerman MHEM, Chai X, Zhai Y, Fiorella PD**  
Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations.  
*The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1995) 53(1-6), 497-502
- (339) **Takase S, Ong DE, Chytil F**  
Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus.  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* (1986) 247, 328-34
- (340) **Gaub M, Lutz Y, Ghyselincq NB, Scheuer I, Pfister V, Chambon P**  
Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies.  
*Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (1998) 46, 1103-11
- (341) **Donovan M, Olofsson B, Gustafsson AL, Dencker L, Eriksson U**  
The cellular retinoic-acid-binding proteins.  
*The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (1995) 53, 459-65

- (342) **Asselineau D, Cavey MT, Shroot B, Darmon M**  
Control of epidermal differentiation by a retinoid analogue unable to bind to cytosolic retinoic-acid-binding-proteins (CRABP).  
*The Journal of Investigative Dermatology* (1992) 98, 128-34
- (343) **Nugent P, Greene RM**  
Antisense oligonucleotides to CRABP-I and -II alter the expression of TGF-beta 3, RAR-beta, and tenascin in primary cultures of embryonic palate cells.  
*In Vitro Cellular & Developmental Biology/Animal* (1995) 31, 553-8
- (344) **Fiorella PD, Napoli JL**  
Microsomal retinoic acid metabolism Effects of cellular retinoic-acid binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1994) 269(14), 10538-44
- (345) **Boylan JF, Gudas LJ**  
The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-*trans*-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1992) 267, 21486-91
- (346) **Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P**  
Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal.  
*Development* (1995) 121, 539-48
- (347) **Yamamoto M, Dräger UC, Ong DE, McCaffery PJ**  
Retinoid-binding proteins in the cerebellum and choroid plexus and their relationship to regionalized retinoic acid synthesis and degradation.  
*European Journal of Biochemistry* (1998) 257, 344-50
- (348) **Herr FM, Ong DE**  
Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins.  
*Biochemistry* (1992) 31, 6748-55
- (349) **Boerman MHEM, Napoli JL**  
Cholate-independent retinyl ester hydrolysis. Stimulation by apo-cellular retinol-binding protein.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1991) 266, 22273-8
- (350) **Tzimas G, Nau H**  
The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis.  
*Current Pharmaceutical Design* (2001) 7, 803-31
- (351) **Lu H-C, Thaller C, Eichele G**  
The role of retinoids in vertebrate limb morphogenesis: integration of retinoid- and cytokine-mediated signal transduction.  
*In: Nau H, Blaner WS (Hrsg.): Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action.*  
Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1999) 369-98

- 
- (352) **Helmut Hildebrandt** (Hrsg.)  
Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch.  
*257. Aufl. Berlin, Verlag Walter de Gruyter (1993)*
- (353) **Creech Kraft J, Kochhar DM, Scott J, Nau H**  
Low teratogenicity of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) in the mouse corresponds to low embryo concentrations during organogenesis. Comparison to the all-*trans*-isomer.  
*Toxicology and Applied Pharmacology (1987) 87, 474-82*
- (354) **Creech Kraft J, Löfberg B, Chahoud I, Bochert G, Nau H**  
Teratogenicity and placental transfer of all-*trans*-, 13-*cis*-, 4-oxo-all-*trans*- and 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid after a low oral dose during organogenesis in mice.  
*Toxicology and Applied Pharmacology (1989) 100, 162-76*
- (355) **Creech Kraft J, Nau H, Lammer E, Olney A**  
Human embryo retinoid concentrations after maternal intake of isotretinoin.  
*The New England Journal of Medicine (1989) 321, 262*
- (356) **Ward SJ, Morriss-Kay GM**  
Distribution of all-*trans*-, 13-*cis*- and 9-*cis*-retinoic acid to whole rat embryos and maternal serum following oral administration of a teratogenic dose of all-*trans*-retinoic acid.  
*Pharmacology and Toxicology (1995) 76, 196-201*
- (357) **Nau H, Elmazar MMA, Rühl R, Thiel R, Sass JO**  
All-*trans*-retinoyl-glucuronide is a potent teratogen in the mouse because of extensive metabolism to all-*trans*-retinoic acid.  
*Teratology (1996) 54, 150-6*
- (358) **Nau H, Chahoud I, Dencker L, Lammer E, Scott J**  
Teratogenicity of vitamin A and retinoids.  
*In: Blomhoff R (Hrsg.): Vitamin A in health and disease. New York, Marcel Dekker, Inc (1994) 615-63*
- (359) **Nau H**  
Chemical structure-teratogenicity relationships, toxicokinetics and metabolism in risk assessment of retinoids.  
*Toxicology Letters (1995) 82, 975-9*
- (360) **Geelen JAG**  
The localization of vitamin A in the pregnant rat by means of fluorescence microscopy.  
*Teratology (1972) 6(19), 26*
- (361) **Dimenstein R, Trugo NM, Donangelo CM, Trugo LC, Anastacio AS**  
Effect of subadequate maternal vitamin A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus.  
*Biology of the Neonate (1996) 69, 230-4*

- (362) **Hurst CH, Abbott BD, DeVito MJ, Birnbaum LS**  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in pregnant Long Evans rats. Disposition to maternal and fetal tissues.  
*Toxicological Science* (1998) 45, 129-36
- (363) **Nau H, Bass R**  
Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus.  
*Toxicology* (1981) 20(4), 299-308
- (364) **Hurst CH, DeVito MJ, Setzer RW, Birnbaum LS**  
Acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats, association of measured tissue concentrations with developmental effects. *Toxicological Sciences* (2000) 53, 411-20
- (365) **Peters JM, Wiley LM**  
Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1995) 134(2), 214-21
- (366) **Abbott BD, Probst MR**  
Developmental expression of two members of a new class of transcription factors. I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo.  
*Developmental Dynamics* (1995) 204(2), 133-43
- (367) **Abbott BD, Probst MR**  
Developmental expression of two members of a new class of transcription factors. II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo.  
*Developmental Dynamics* (1995) 204(2), 144-55
- (368) **Abbott BD, Schmid JE, Brown JG**  
RT-PCR quantification of AHR, ARNT, GR, and CYP1A1 mRNA in craniofacial tissues of embryonic mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone.  
*Toxicological Sciences* (1999) 47( 1), 76-85
- (369) **Morse DC, Groen D, Veerman M, Van Amerongen J, Koeter HBWM, Smith-van Prooije AE, Visser TJ, Koeman JH, Brouwer A**  
Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1993) 122, 27-33
- (370) **Borlakoglu JT, Scott A, Henderson CJ, Jenke HJ, Wolf CR**  
Transplacental transfer of polychlorinated biphenyls induces simultaneously the expression of P450 isoenzymes and the protooncogenes c-Ha-ras and c-raf.  
*Biochemical Pharmacology* (1993) 45(7), 1373-86
- (371) **Chen CY, Hamm JT, Hass JR, Birnbaum LS**  
Disposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and non-ortho polychlorinated biphenyls in pregnant Long Evans rats and the transfer to offspring.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (2001) 173(2), 65-88

- (372) **Norman RL, Johnson EF, Muller-Eberhard U**  
Identification of the major cytochrome P-450 form transplacentally induced in neonatal rabbits by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
*The Journal of Biological Chemistry* (1978) 253(23), 8640-7
- (373) **Yang HY, Zelus BD, Juchau MR**  
Organogenesis-stage cytochrome P450 isoforms, utilization of PCR for detection of CYP1A1 mRNA in rat conceptual tissues.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1991) 178(1), 236-41
- (374) **Shiverick KT, Swanson C, Salhab AS, James MO**  
Differential induction of ethoxyresorufin-O-deethylase in tissues of the rat placenta.  
*The Journal of Pharmacology and Experimental Pharmacapeutics* (1986) 238(3), 1108-13
- (375) **Kistler A**  
Teratogenesis of retinoic acid in rats, susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide.  
*Teratology* (1981) 23, 25-31
- (376) **Dencker L**  
Embryonic-fetal localization of drugs and nutrients.  
In: *Persaud TVN (Hrsg.): Advances in the study of birth defects. Volume 1. Lancaster, MTP* (1979) 1-18
- (377) **Dencker L, d'Argy R, Danielsson BR, Ghantous H, Sperber GO**  
Saturable accumulation of retinoic acid in neural and neural crest derived cells in early embryonic development.  
*Developmental Pharmacology and Therapeutics* (1987) 10, 212-23
- (378) **Piper WN, Rose JQ, Gehring PJ**  
Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat.  
*Environmental Health Perspectives* (1973) 5, 241-4
- (379) **Rose JQ, Ramsey JC, Wentzler TH, Hummel RA**  
The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin following single and repeated oral doses to the rat.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* (1976) 36, 209-26
- (380) **United States Environmental Protection Agency (EPA) (Hrsg.)**  
Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds.  
*Report* (2000)
- (381) **Dolan JW**  
Useful or useless - Part II.  
*LC/GC International* (1998) 11(9), 574-8
- (382) **Kamm JJ, Ashenfelter KO, Ehmann CW**  
Preclinical and clinical toxicology of selected retinoids.  
In: *Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Hrsg.): The retinoids. Volume 2 Orlando, Academic Press, Inc* (1984) 287-326

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A/P	<b>anterior-posterior</b>
ADH	<b>Alkohol-Dehydrogenase</b>
AhR	<b>Arylhydrocarbon-Rezeptor</b>
ALDH	<b>Aldehyd-Dehydrogenase</b>
AP	<b>Aktivierungsprotein</b>
APCI	<b>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</b>
ARAT	<b>Acyl-CoA:Retinol-Acyltransferase</b>
Arnt	<b>Ah receptor nuclear translocator</b>
AUC	<b>area under the concentration-time curve</b>
BCDO	<b>β-Carotinoid-15,15'-Dioxygenase</b>
BgVV	<b>Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin</b>
BSA	<b>Bovine Serum Albumine</b>
CM	<b>Chylomikron</b>
C <sub>max</sub>	<b>Maximale Konzentration (im Verlauf einer Kinetik)</b>
CMR	<b>Chylomikronen-Remnants</b>
CoA	<b>Coenzym A</b>
COSY	<b>Correlation Spectroscopy</b>
CRABP	<b>Cellular Retinoic Acid-Binding Protein</b>
CRBP	<b>Cellular Retinol-Binding Protein</b>
CYP	<b>Cytochrom P450</b>
DAD	<b>Diodenarray-Detektor</b>
DLI	<b>Direct Liquid Introduction</b>
DNA	<b>Desoxyribonucleid Acid</b>
DRE	<b>Dioxin-Response-Element</b>
EPA	<b>United States Environmental Protection Agency</b>
ESI	<b>Electrospray-Interface</b>
FAB	<b>Fast Atom Bombardment</b>
GD	<b>Gestation Day</b>
GST	<b>Glutathion-S-Transferase</b>
HPLC	<b>High Performance Liquid Chromatography</b>
HRR	<b>Hydroxy-Retro-Retinol</b>
HSP	<b>Hitzeschock-Protein</b>
IARC	<b>International Agency for Research on Cancer</b>
ID	<b>Innen-Durchmesser</b>

---

IE	<b>I</b> nternationale <b>E</b> inheit
IS	<b>I</b> nterner <b>S</b> tandard
I-TEQ	<b>I</b> nternational <b>T</b> CDD <b>E</b> quivalent
KG	<b>K</b> örpergewicht
LC	<b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
LD	<b>L</b> etaldosis
LIF	<b>L</b> aser-induzierte <b>F</b> luoreszenz
LPL	<b>L</b> ipoproteinlipase
LRAT	<b>L</b> ecithin: <b>R</b> etinol- <b>A</b> cyltransferase
ME	<b>M</b> ethylester
MS	<b>M</b> assenspektrometrie
NMR	<b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance
NWG	<b>N</b> achweisgrenze
PBI	<b>P</b> article- <b>B</b> eam- <b>I</b> nterface
PBS	<b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline
PCB	<b>p</b> olychloriertes <b>B</b> iphenyl
PCDD	<b>p</b> olychloriertes <b>D</b> ibenzo- <b>p</b> - <b>d</b> ioxin
PCDF	<b>p</b> olychloriertes <b>D</b> ibenzofuran
PPAR	<b>P</b> eroxisomen- <b>P</b> roliferator <b>a</b> ktivierter <b>R</b> ezeptor
RA	<b>R</b> etinoic <b>A</b> cid
RAL	<b>R</b> etinal
RAR	<b>R</b> etinoic <b>A</b> cid <b>R</b> eceptor
RARE	<b>R</b> etinoic <b>A</b> cid <b>R</b> eponse <b>E</b> lement
RBP	<b>R</b> etinol- <b>b</b> indendes <b>P</b> rotein
RE	<b>R</b> etinylester
REM	<b>R</b> emnant
ROH	<b>R</b> etinol
RP	<b>R</b> eversed <b>P</b> hase
RXR	<b>R</b> etinoid <b>X</b> <b>R</b> eceptor
RXRE	<b>R</b> etinoid <b>X</b> <b>R</b> esponse <b>E</b> lement
SDR	<b>S</b> hort- <b>C</b> hain <b>D</b> ehydrogenase/ <b>R</b> eductase
TCDD	<b>2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin</b>
TDI	<b>T</b> olerable <b>D</b> aily <b>I</b> ntake
TGF	<b>T</b> ransforming <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
THR	<b>T</b> hyroidhormon- <b>R</b> ezeptor
TSP	<b>T</b> hermospray
TTR	<b>T</b> ransthyretin

UBA	<b>U</b> mwelt <b>b</b> undes <b>a</b> mt
UDP	<b>U</b> ridin <b>d</b> iphosphat
UGT	<b>U</b> DP- <b>G</b> lukuronosyl- <b>T</b> ransferase
UV	<b>U</b> ltraviolett
VDR	<b>V</b> itamin- <b>D</b> - <b>R</b> ezeptor
WHO	<b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganisation



Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

**Nilsson CB, Hoegberg P, Trossvik C, Azais-Braesco V, Blaner WS, Fex G, Harrison EH, Nau H, Schmidt CK, van Bennekum AM, Hakansson H**

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat

*Toxicology and Applied Pharmacology (2000) 169, 121-131*

Tagungsbeiträge:

**Brouwer A, Schuur AG, Nau H, Schmidt CK, Regan C, Bacon L, Chambon P, Ghyselink N, Hakansson H, Nilsson C, van der Saag P, Sonneveld E**

Retinoid (Vitamin A) interactions with organohalogen food residues: mechanisms, biomarkers and implications for developmental toxicity

„Retinoids ‘99“, *European Research Group, Strasbourg, Frankreich*

**Hoegberg P, Schmidt CK, Nau H, Nilsson CB, Hakansson H**

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tissue retinoic acid (RA) levels in the rat

*Toxicology Letters (2000) 116(Supplement 1), 28; „EUROTOX 2000“, London, England*

**Schmidt CK, Hoegberg P, Nilsson CB, Hakansson H, Nau H**

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters all-*trans*-retinoic acid metabolism in the rat

*Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2001) 363(4), R148; Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2001 in Mainz*

**Hoegberg P, Schmidt CK, Nilsson CB, Trossvik C, Ghyselink NB, Chambon P, Cenijn PH, Slottje P, Schuur G, Brouwer A, Nau H, Hakansson H**

Studies of the effects of TCDD on the retinoid system using retinoid pathway knockout mice

„Dioxin 2001 - The 21<sup>st</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs“, *Kyongju, Korea*

---

This work has been carried out with financial support from the Commission of the European Communities, FAIR-CT97-3220: „Retinoids (Vitamin A) interaction with organohalogen food residues: Mechanisms, biomarkers and implication for developmental toxicity.“ It does not necessarily reflect its views and in no way anticipates the Commission's future policy in this area.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau danke ich für die interessante Themenstellung, die großzügige Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerold Wunsch danke ich für die Übernahme des Referats und für seine Diskussionsbereitschaft in allen Fragen zur Analytischen Chemie.

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Schwedt bedanke ich mich für die Bereitschaft, als Prüfender an der mündlichen Doktorprüfung teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Karsten Levsen und Herrn Markus Walles danke ich für die Ermöglichung der  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. W. Arnold, Herrn Dr. P. Mohr (Hoffmann-La Roche, Basel) und Herrn Dr. W. Regenhardt für die Hilfe bei der Interpretation der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren.

Allen Kollegen und Mitarbeitern der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover sei für die freundliche Hilfestellung und angenehme Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe gedankt. Mein besonderer Dank gilt:

- Dr. Thomas Arnhold für die geduldige Einarbeitung in das Gebiet der Retinoide und für so manche Aufrichtung nach Rückschlägen in der Methodenentwicklung
- den Tierärzten Jutta Volland, Dr. Silke Szceny und Matthias Radatz für die Einarbeitung in die physiologischen Aspekte der Arbeit
- Dr. Gerd Hamscher für die kompetente Hilfestellung am Massenspektrometer
- Dr. Silke Meyer, Simone Schmidt und Steffen Baltes für die Zusammenarbeit in der Vitamin-A-Dunkelkammer
- Prof. Dr. M.M.A. Elmazar für die lehrreichen Diskussionen
- Dr. Jörn Krüger für die Hilfe bei der Synthese der 9-*cis*-4-OH-Retinsäure

Den „EU-Partnern“ Bram, Gerlienke, Ciaran, Michelle, Larry, Norbert, Helen, Paul, Edwin, Charlotte, Pi, Peter, Bart, Pauline und Jacquélien danke ich für die hervorragende und produktive Zusammenarbeit im Rahmen des EU-Projektes. Gerne erinnere ich mich an die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche am Rande der Treffen in Wageningen, Stockholm, Dublin, Strasbourg, Hannover und Utrecht zurück.

Meinem Vater, Wilko und Hendrike danke ich für die Korrektur des Manuskripts.

Ferner möchte ich meiner Freundin Hendrike auch dafür danken, daß sie mich bei meiner Arbeit immer unterstützt hat. Ihr Verständnis und Rückhalt haben die Durchführung dieser Arbeit erheblich erleichtert. Meinen Eltern schließlich gilt mein tiefster Dank für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

---

## Lebenslauf

### Zur Person

---

Carsten Schmidt  
Diplom-Chemiker  
geb. am 25.03.71 in Schwerte/Ruhr

### Schule/Ausbildung

---

08/77 – 05/90      Grundschule, Gymnasium – Abitur (in Schwerte/Ruhr)  
10/90 – 09/91      Wehrdienst (in Gießen und Wetzlar)

### Hochschulbildung: Inland / Ausland

---

10/91 – 10/93      **Grundstudium Chemie**  
10/91 – 03/92      Universität Dortmund  
04/92 – 10/93      Technische Universität Clausthal

10/93 – 07/97      **Hauptstudium Chemie**  
Technische Universität Clausthal  
**Schwerpunkt: Analytische Chemie**

11/96 – 07/97      Diplomarbeit, Institut für Anorganische und Analytische Chemie,  
Lehrstuhl Prof. G. Schwedt  
Thema: Analytik von Phytinsäure und Inositolphosphaten mittels  
Kapillarelektrophorese und Flüssigkeitschromatographie

04/94 – 09/94      **Praxissemester Irland (Erasmus-Austauschprogramm)**  
University College Cork, Department of Analytical Chemistry,  
Irland, Lehrstuhl Dr. J.D. Glennon

11/97 – 11/01      **Dissertation**  
Tierärztliche Hochschule Hannover, Zentrumsabteilung für  
Lebensmitteltoxikologie, Lehrstuhl Prof. H. Nau

### Berufserfahrung

---

06/92 – 08/92      Mitarbeit als studentische Hilfskraft im Institut für Wasserforschung GmbH,  
Dortmund, Bereich Geowissenschaften und Chemie

10/93 – 02/94      Studentische Hilfskraft im Physikalischen Institut, Clausthal

08/95 – 10/95      Werkstudent bei der Bayer AG, Dormagen, Bereich Kautschuk,  
02/96 – 03/96      Forschung und Entwicklung

10/96 – 12/96      Studentische Hilfskraft im Institut für Anorganische und Analytische Chemie,  
Clausthal

11/97 – 09/01      Wissenschaftlicher Angestellter am Zentrum für Lebensmittelwissenschaften  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover