

Über ein modifiziertes Verfahren
zur Trennung von Sehfärbstoffisomeren
durch HPLC

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christian Becker
aus Echzell

Gießen 2006

Aus dem Physiologischen Institut

Direktor: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. G. Nöll

Gutachter: HDoz Dr. M. Niepmann

Tag der Disputation: 21.03.2007

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Methoden und Materialien	3
2.1. Herstellung von Retinoidisomeren	3
2.1.1. Retinalisomeren	3
2.1.2. Retinolisomeren	6
2.1.3. Retinylpalmitatisomeren	12
2.2. Probengewinnung aus Froschretinae und –pigmentepithel	23
2.3. Probengewinnung aus Pinealorganen von Regenbogenforellen	27
2.4. Apparative Ausstattung	27
2.4.1. Reagenzien	28
2.5. Auswertung der Chromatogramme	29
2.6. Diskussion	29
3. HPLC-Messungen der Retinoide	31
3.1. Messungen mit dem Lösungsmittel Hexan	31
3.1.1. Messungen bei verschiedenen Laufmittelverhältnissen	31
3.2. Messungen mit dem Lösungsmittel Heptan	36
3.2.1. Retinolmessungen	36
3.2.2. Retinalmessungen	37
3.2.3. Vergleich mehrerer Proben bei verschiedenen Belichtungszeiten und Lösungsmitteln	39
3.2.3.1. Ethanolbelichtungen	40
3.2.3.2. 2,2,2-Trifluorethanolbelichtungen	41
3.2.3.3. Acetonitrilbelichtungen	44
3.2.4. Identifikation der Retinalisomeren	45
3.2.5. Retinolmessungen	47
3.3. Diskussion	51

4. Identifikation des 7-cis-Retinalisomers	54
4.1. Einleitung	54
4.2. Isomerengewinnung und Identifikation	54
4.3. Diskussion	57
5. HPLC-Messungen von Retinoiden in Pinealisdrüsen von Regenbogenforellen	59
5.1. Einleitung	59
5.2. Probengewinnung und Aufbereitung	60
5.3. Messungen der Retinoide in Pinealorganen der Regenbogenforelle	61
5.4. Identifikation der Isomeren	66
5.5. Diskussion	68
6. HPLC der Sehfarbstoffisomeren in Pigmentepithel und Retina	70
6.1. Einleitung	70
6.1.1. Anatomie des Pigmentepithels	70
6.1.2. Biochemie des Pigmentepithels	71
6.2. Die Retinoide in Pigmentepithel und Retina	73
6.2.1. Retinalisomeren	73
6.2.2. Retinolisomeren	75
6.2.3. Retinylpalmitatisomeren	77
6.3. Diskussion	79

7. Arbeitsmedizinische Betrachtung zu den Laufmitteln Hexan und Heptan in der HPLC	80
7.1. Allgemeines	80
7.2. Arbeitsmedizinische Betrachtung zu Hexan und Heptan	80
7.2.1. Hexan	80
7.2.2. Heptan	83
7.3. Diskussion	85
8. Zusammenfassung der Ergebnisse	87
8.1. Einleitung	87
8.2. Qualität der neuen Messstandards mit dem Eluenten n-Heptan	87
8.3. Technische Aspekte der Trennleistung unter Verwendung von n-Heptan	89
8.4. Die Retinoide im Nativgewebe	90
8.5. Isomerenidentifikation	91
9. Literaturverzeichnis	92
10. Anhang	109
10.1. Zusammenfassung / Summary	109
10.2. Abkürzungen	110
10.3. Ehrenwörtliche Erklärung	111
10.4. Curriculum vitae	112
10.5. Danksagung	113

1. Einleitung

Fragestellung und Zielsetzung

Nach wie vor ist der Sehvorgang Gegenstand intensiver Forschung. Von besonderem Interesse ist dabei das Sehpigment Rhodopsin, welches das zentrale Bindeglied zwischen der physikalisch-biochemischen und der elektrischen Signaltransduktion im Sehvorgang darstellt. Rhodopsin oder auch Sehpurpur besteht aus 11-cis-Retinal, der Aldehydform des Vitamin A und einem Proteinanteil, dem sogenannten Opsin. Durch eine protonierte Schiff'sche Base ist der Lysinrest des Opsins mit 11-cis-Retinal konjugiert.

Das Rhodopsin ist in der Rezeptorenschicht des Auges in den Außensegmenten der Stäbchen in den dort lokalisierten Lipiddoppelmembranen, sog. Disks, gespeichert und ermöglicht das Hell- und Dunkelsehen. Bei Belichtung der Photorezeptoren kommt es zu einer Umwandlung von 11-cis- in all-trans-Retinal (Dartnall 1968). Das Opsin ändert dabei seine Konformation, ebenso das Retinal-Molekül (Hubbard u. Wald 1951). Durch Hydrolyse der Bindungsstelle kommt es schließlich zur Trennung von Opsin und all-trans-Retinal.

Die Photosensibilität der Spaltprodukte liegt nach diesem Vorgang nicht mehr im Bereich sichtbarer Lichtwellenlängen, so dass eine Regeneration zu Rhodopsin notwendig ist, um den Sehvorgang unbegrenzt dem Organismus zur Verfügung zu stellen. Dieser Regenerationsprozess und der Nachweis der dazu notwendigen Isomerasen wurde in mehreren Arbeiten zu diesem Thema beschrieben (Hubbard u. Wald 1951; Rando 1990; Besler 1994).

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits eine Arbeit zu diesem Thema verfasst. Im Rahmen dieser Forschungsarbeiten wurden mehrere Teilaspekte zur technischen Vorbereitung und Durchführung HPL-chromatografischer Messungen der Sehfarbstoffisomeren näher erörtert. Kernpunkt der vorangegangenen Arbeiten war dabei die Schaffung von Meßstandards, welche weiteren Untersuchungen der Retina und des Pigmentepithels als Grundlage und Referenz zur Verfügung standen (Besler 1994).

Aus arbeitsmedizinischen Gründen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit der Ersatz des Haupteluenten der HPLC, Hexan, durch einen mindergefährlichen Aromaten, das Heptan (Nöll u. Besler 1994). Im Rahmen dieser Versuche wurde schließlich die Vermutung geäußert, dass sich durch Heptan als Eluenten bessere Messergebnisse erzielen lassen, als dies mit Hexan der Fall war.

Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war es, die Beweisführung für die oben angeführte These zu erbringen. Mit dem Haupteluenten Heptan in der HPLC der Retinoide sollten neue Meßstandards entwickelt werden, es sollte im weiteren untersucht werden, ob durch die veränderten Messbedingungen weitere Stereoisomeren des Retinals, des Retinols und des Retinylpalmitats identifiziert werden können. Eine Erprobung der Anwendbarkeit des Verfahrens auf natives Probenmaterial sollte schließlich daran angeschlossen werden, falls der Nachweis für eine Verbesserung der Trennleistung der HPLC erbracht werden kann.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die erneute Betrachtung arbeitsmedizinischer Zusammenhänge bezogen auf die Verwendung von Heptan statt Hexan in der HPLC der Retinoide. Von besonderem Interesse waren dabei die Interaktionen von Heptan mit dem zweiten Eluenten, dem tertiären Butylmethylether.

Da sich die vorliegende Arbeit aus mehreren voneinander unabhängigen Kapiteln zusammensetzt, wurde jedem dieser Kapitel eine separate Diskussion angefügt, die abschließende Zusammenfassung dient nur noch zur Diskussion übergreifender Aspekte.

2. Methoden und Materialien

2. 1. Herstellung von Retinoidisomeren

2. 1. 1. Retinalisomeren

Die Gewinnung von Retinalisomeren zur Erstellung von Standardchromatogrammen und zur Identifikation von unbekanntem Isomeren in verschiedenen Messungen stellt in der Regel kein wesentliches Problem dar.

Wie schon in den ersten Arbeiten zur chromatografischen Trennung der Retinoidisomere beschrieben, kann all-trans-Retinal, das in größerer Menge relativ preisgünstig von verschiedenen Firmen käuflich zu erwerben ist, in verschiedenen Lösungsmitteln belichtet werden, um eine ausreichende Zahl und Menge an verschiedenen mono-, dicis- und tricis-Isomeren zu erhalten (Landers + Olsen, 1980; Bridges et al. , 1980). Die qualitative Ausbeute an Isomeren richtet sich im wesentlichen nach dem verwendeten Lösungsmittel zur Belichtung. Während bei Belichtung von all-trans-Retinal in Ethanol hauptsächlich monocis- und dicis-Isomeren entstehen, wie 13-cis, 11-cis, 9-cis und 7,9-dicis (RALHEPT/Nr. 14 ; Vgl. auch Besler, 1993; Bridges et al. 1990), so kommt es bei Belichtungsversuchen mit 2,2,2-Trifluorethanol auch zum Entstehen von "kleineren" Isomeren, also zum Teil auch instabilen dicis- und tricis-Isomeren, wie 13,11-dicis, 9,11-dicis und 9,11,13-tricis Retinal (RALHEPT/Nr. 22), welche in ausreichenden Mengen entstehen, die ein Abfangen und Isolieren solcher Isomeren zur Identifikation von unbekanntem Peaks ermöglicht.

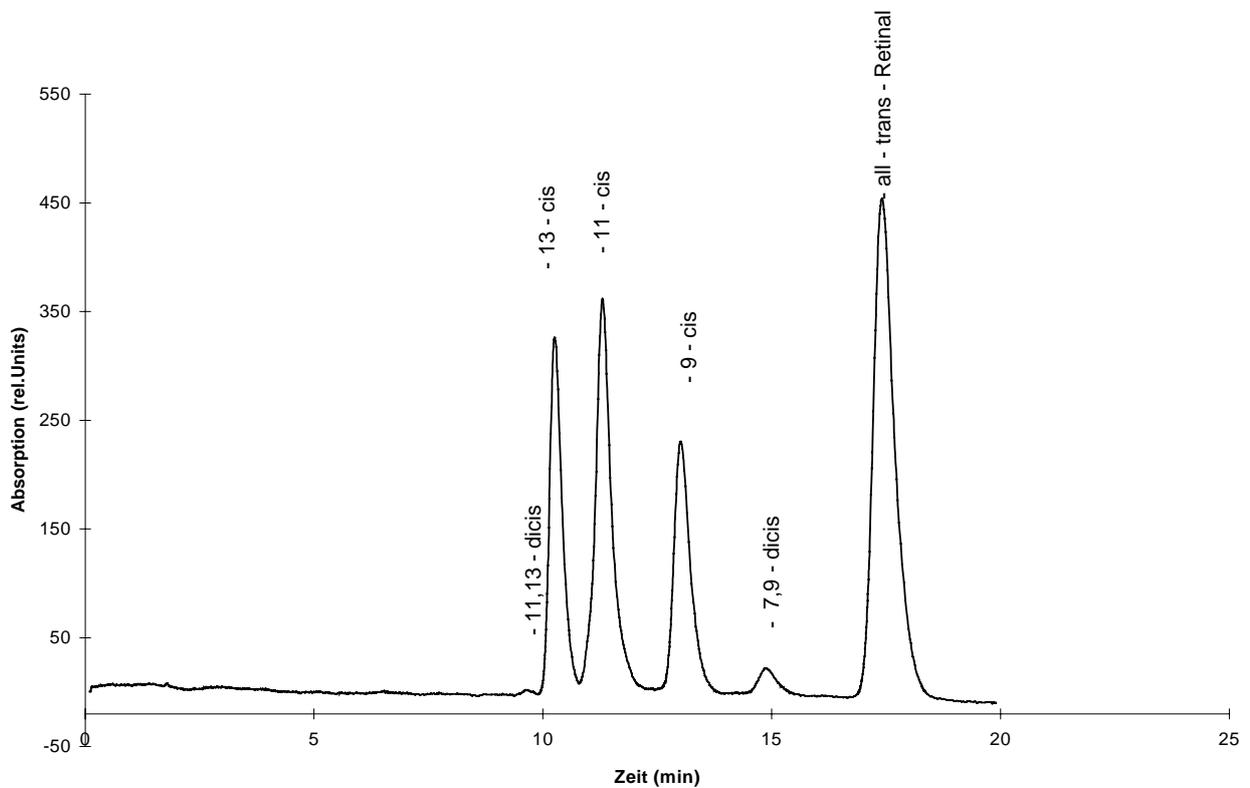
Als Beispiel seien hier in Tabellenform Belichtungen von all-trans-Retinal in Ethanol und 2,2,2-Trifluorethanol wiedergegeben, um einen Mengenvergleich in bezug auf die Isomeren zu haben. Die Messungen erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,0 ml/min, einem Laufmittelgemisch von 98:2 n-Heptan / tertiärem Butylmethylether, einem durchschnittlichen Druck von 109 bar vor der Säule und einer Messwellenlänge von 371 nm.

Es wurden 2,45 mg all-trans-Retinal in 2 ml Ethanol und 3,10 mg der selben Originalprobe in 2 ml 2,2,2-Trifluorethanol gelöst und für je 40 Minuten unter Weißlicht (60 Watt) in einer auf Eis gelagerten Glasküvette belichtet, danach von jeder Probe 100 µl abgezogen, unter N₂ getrocknet und mit 1 ml n-Heptan resuspendiert. Alle Messungen erfolgten im Dunkeln bei schwachem Rotlicht.

Tabelle 2. 1.

(RALHEPT 22)

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit (min)</u>	<u>Menge (%)</u>
11,13-dicis	9,62	0,22
13-cis	10,26	17,3
11-cis	11,31	24,9
9-cis	13,02	15,7
7,9-dicis	14,88	1,58
all-trans-Retinal	17,41	40,5

Abbildung 2. 1.*RALHEPT 22; 2,0 ml/min; 98:2 Heptan / tBME; $\lambda=371nm$* 

Im Vergleich dazu steht die im folgenden wiedergegebene Trifluorethanolbelichtung.

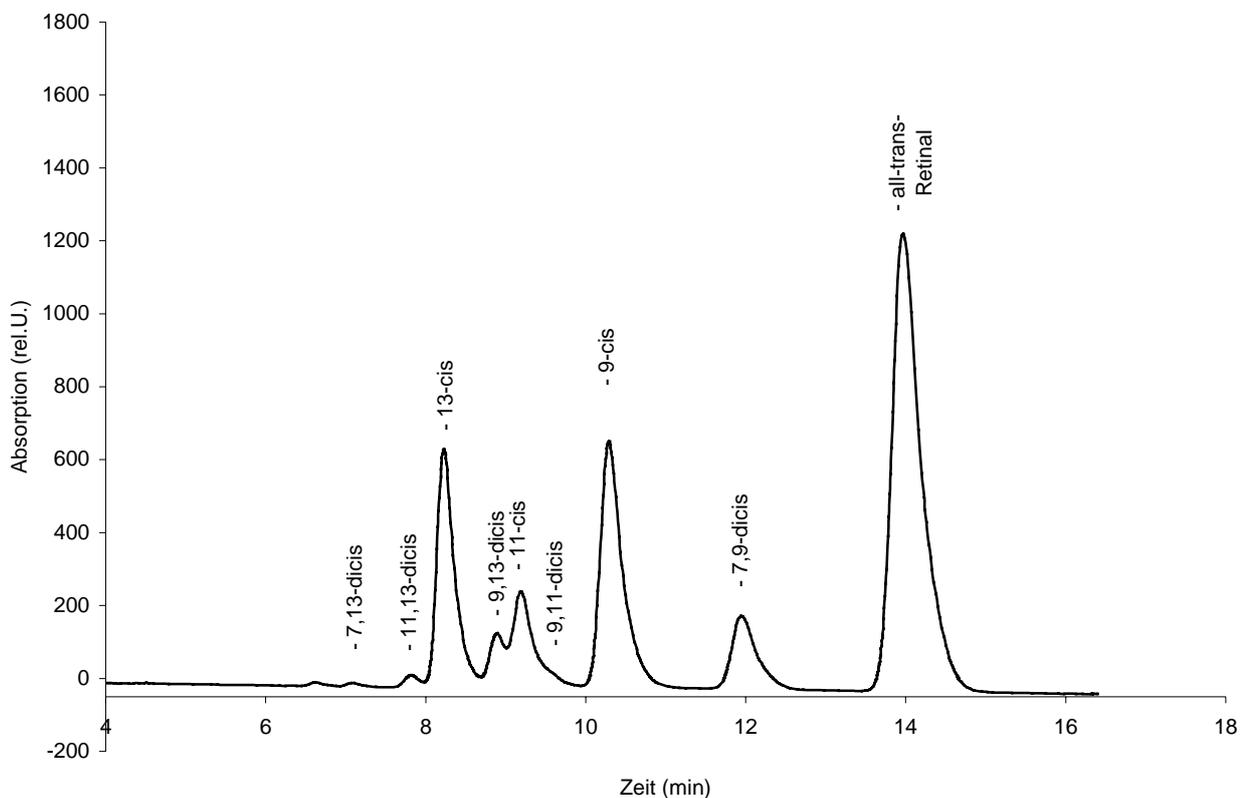
Tabelle 2.2.

(RALHEPT 14)

<u>Name</u>	<u>Ret.-Zeit (min)</u>	<u>Menge (%) (20 min)</u>
7,13-dicis	7,14	0,14
11,13-dicis	7,79	1,02
13-cis	8,08	16,41
9,11,13-tricis	8,77	0,27
9,13-dicis	8,84	3,28
11-cis	9,01	6,71
9,11-dicis	9,42	1,91
9-cis	10,04	17,22
7,9-dicis	11,69	8,84
all-trans-Retinal	15,75	44,9

Abbildung 2. 2.

RALHEPT 14; 2,0 ml/min; 98:2 Heptan / tBME; $\lambda=371nm$



Wir isolierten die einzelnen Isomeren aus diesen und ähnlichen Belichtungsversuchen, um genügend Material für spätere Cochromatografien zur Verfügung zu haben, indem wir, unter optischer Kontrolle anhand der Computergrafik des Chromatogramms, Probenvolumen aus der Leitung am Detektorausgang in Eppendorfgefäße abfingen, diese unter Stickstoffbegasung trockneten und in dieses Probengefäß mehrfach, d. h. über 5 bis 6 Messungen, auf dieselbe Weise Probenmaterial sammelten und in lichtdichten Gefäßen in getrocknetem Zustand im Gefrierschrank bei -18°C aufbewahrten.

Bei diesen Versuchen gelang es uns nie, das 7-cis-Retinal-Isomer als Peak zu identifizieren. In der Literatur fanden wir schließlich den Hinweis, dass das 7-cis-Isomer offenbar ausschließlich bei Belichtungen in Acetonitril als Lösungsmittel entsteht. Die Versuche zu dessen Identifikation und Isolierung sind in einem speziellen Kapitel dargestellt. Gleichzeitig stellten wir weitere Versuche dazu an, welche Isomeren nach welcher Belichtungszeit entstehen, b. z. w. welche davon, speziell der dicis- und tricis-Isomere dann auch wieder zerfallen. Auch zu diesen Versuchen verweisen wir auf ein gesondertes Kapitel, da an dieser Stelle ausschließlich die Herstellung der Isomeren besprochen werden soll.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass Retinalisomeren relativ leicht durch Belichtung von all-trans-Retinal zu gewinnen sind, in ausreichenden Mengen zu Darstellbarkeit in den Chromatogrammen und zur Isolation aus den Messproben heraus entstehen, sowie bei entsprechender Lagerung auch genügend lange haltbar sind, um als Referenz bei Messungen mit unbekanntem Material zu dienen. Die gewonnene Menge an Isomeren ist weitgehend von der Polarität der angewendeten Lösungsmittel abhängig, in welchen die Belichtung vorgenommen wurde.

2. 1. 2. Retinolisomeren

Die Gewinnung von Retinolisomeren gestaltete sich, gegenüber den relativ einfachen Belichtungsverfahren bei Retinal, weitaus komplizierter. Auch hierzu sind in der Literatur bereits Versuche vorbeschrieben, welche sich dieser Problemstellung widmeten.

Ebenso wie das all-trans-Retinal ist auch all-trans-Retinol in größeren Mengen zu einem akzeptablen Preis von diversen Firmen zu erwerben.

All-trans-Retinol entsteht, ebenso wie das Retinal, gewissermaßen als Abfallprodukt bei der industriellen Futtermittelherstellung, und steht deshalb in genügender Menge zur Verfügung, ohne in einem aufwendigen Prozess gewonnen werden zu müssen, wie das bei den von der Industrie vertriebenen Retinoidisomeren, hauptsächlich 11-cis und 9-cis, der Fall ist.

Bei der Belichtung von all-trans-Retinol in verschiedenen Lösungsmitteln entstehen nur winzige Mengen an 13-cis und 9-cis Isomeren, jedoch kein 11-cis und auch keine dicis- oder tricis-Isomere (BROLS1/Nr. 10). Zur Erstellung eines Standardchromatogramms und zur Gewinnung von einzelnen Retinolisomeren war es jedoch unabdingbar notwendig, solche in größeren Mengen herzustellen. Schon in einer Arbeit aus dem Jahre 1965 von Bowns und Wald ist ein Verfahren publiziert worden, welches die Reduktion von Retinal in Retinol mittels KBH_4 beschreibt, das auch wir in Anwendung bringen wollten. In den damaligen Versuchsreihen verwendete man zunächst KBH_4 , im weiteren schließlich NaBH_4 , um mit dessen Hilfe die Schiff'sche Base, welche Retinal mit Opsin verknüpft, so zu reduzieren, dass ein Rhodopsinderivat entstand. NaBH_4 wurde dann in der Folge auch in anderen Versuchsreihen als Ausgangssubstanz zur Reduktion verwendet (Hubbard et al., 1971; Bridges, 1971; Landers, 1990).

Wegen der nur mangelhaften Isomerisierbarkeit durch Belichtung wurde in diesen Arbeiten der Syntheseweg angestrebt, um ausreichende Mengen von Retinol zu erhalten. Diese Synthese ging von all-trans-Retinal, also der Aldehydform, als Grundsubstanz aus. Einige Milligramm all-trans-Retinal wurden in 5 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurden 10 mg Kaliumborhydrid (KBH_4) und 5 ml Petroleumbenzin hinzugefügt. Den Reaktionsablauf konnte man an den aufsteigenden Gasblasen gut beobachten.

Die Reaktionszeit wurde von Bridges et al (1980). auf 7 min bei Raumtemperatur festgelegt. Während dieser Zeit wurde die Probe immer wieder auf Eis abgekühlt, um die entstandene Reaktionswärme zu verringern. Nach der angegebenen Zeit wurde 5 ml Aqua dest. zur Probe gegeben, um erstens das eventuell nicht verbrauchte KBH_4 auszuwaschen und zweitens eine deutliche Trennlinie zwischen der Ethanol und der Petroleumbenzinphase zu haben, in welcher sich, bedingt durch die lipophilen Eigenschaften des Petroleumbenzins, der Hauptanteil des entstandenen Retinols befinden musste.

Die Benzinphase wurde abgezogen und zweifach mit je 10 ml Aqua dest. ausgewaschen, anschließend evaporiert und dann unter Stickstoffatmosphäre getrocknet. Wir verwendeten zur gleichen Umwandlungsreaktion Natriumborhydrid (NaBH_4) statt des Kaliumborhydrids, auch konnten wir die Mengen der Reaktionspartner stark verringern, da sich unsere bereits isomerisierten Proben vom Volumen her im Mikrogrammbereich bewegten.

Wir nahmen insgesamt 1 ml Ethanol, 1,5 ml Petroleumbenzin und jeweils 1 ml Aqua dest. zum Waschen der Probe. Die Reaktionszeit konnte auch reduziert werden. Wir warteten nicht eine vorgegebene Zeit ab, sondern schüttelten die mit NaBH_4 inkubierte und vorher in Ethanol aufgelöste Retinalprobe nur kurze Zeit durch und gingen danach vor, wie schon oben beschrieben. Schon diese kurze Zeitspanne reichte aus, um genügend Retinal zu Retinol zu reduzieren.

Wir trockneten dann die in Petroleumbenzinlösung befindliche Retinolprobe unter N_2 , bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Danach wurde die Probe mit 1 ml Heptan resuspendiert und einige Mikroliter davon auf die Säule aufgespritzt (ROLHEP 1/Nr. 85). Messbedingungen hierbei waren: Flussgeschwindigkeit 2,0 ml/min, Verhältnis 92:8 Heptan / tertiärer-Butylmethylether, Druck vor der Säule 109 bar, Messwellenlänge 325 nm.

Tabelle 2. 3.

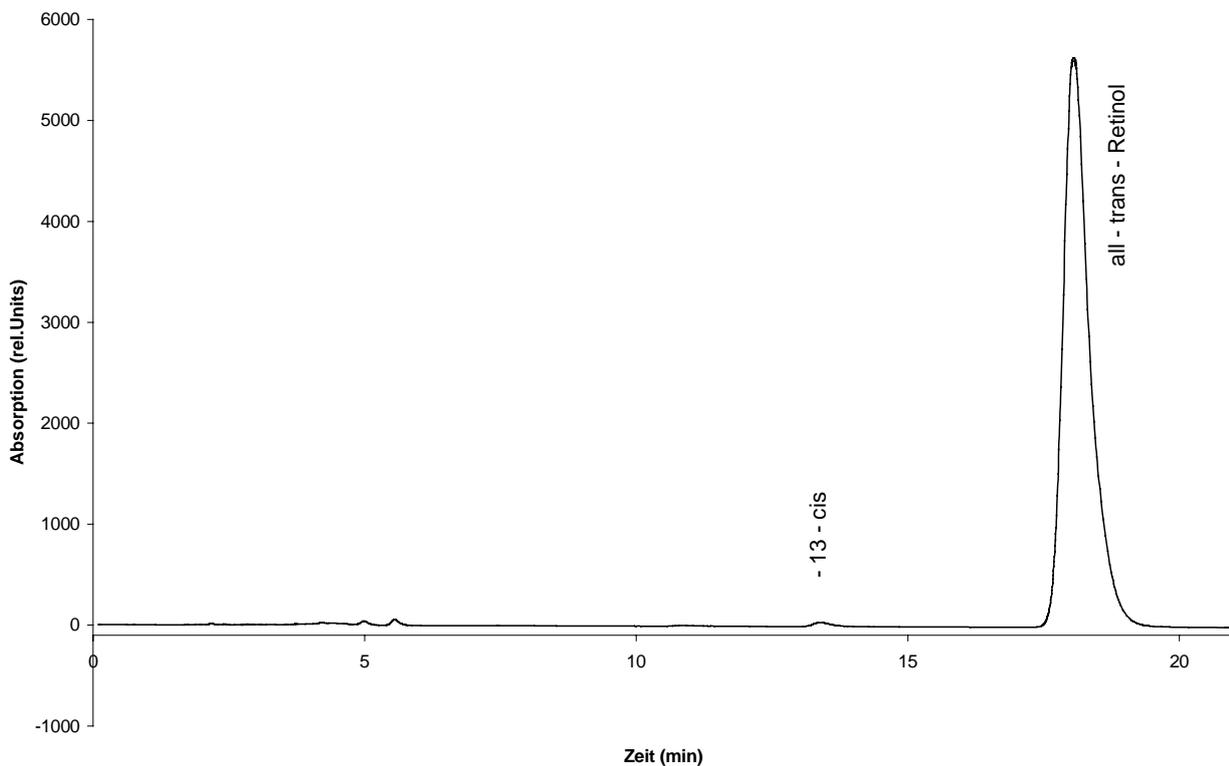
(ROLHEPT1 85)

<i>Name</i>	<i>Retentionszeit (min)</i>	<i>Menge (%)</i>
13-cis	13. 39	0,55
all-trans-Retinol	18,07	99,44

Abbildung 2. 3.

ROLHEPT1 85; 2,0 ml/min; 92:8 Heptan / t-BME; $\lambda=325\text{nm}$

Umgewandelte Probe von Retinal in Retinol



Nächster Schritt war dann die Umwandlung einer bereits belichteten Retinalprobe, welche dann die entsprechenden Isomeren enthält. Dazu lösten wir 1,0 mg all-trans-Retinal in 1 ml Ethanol, überführten die Probe in eine Glasküvette und belichteten für 15 min unter Weißlicht (60 Watt) unter Kühlung der Probe in einem mit Eis gefüllten Styroporbehälter.

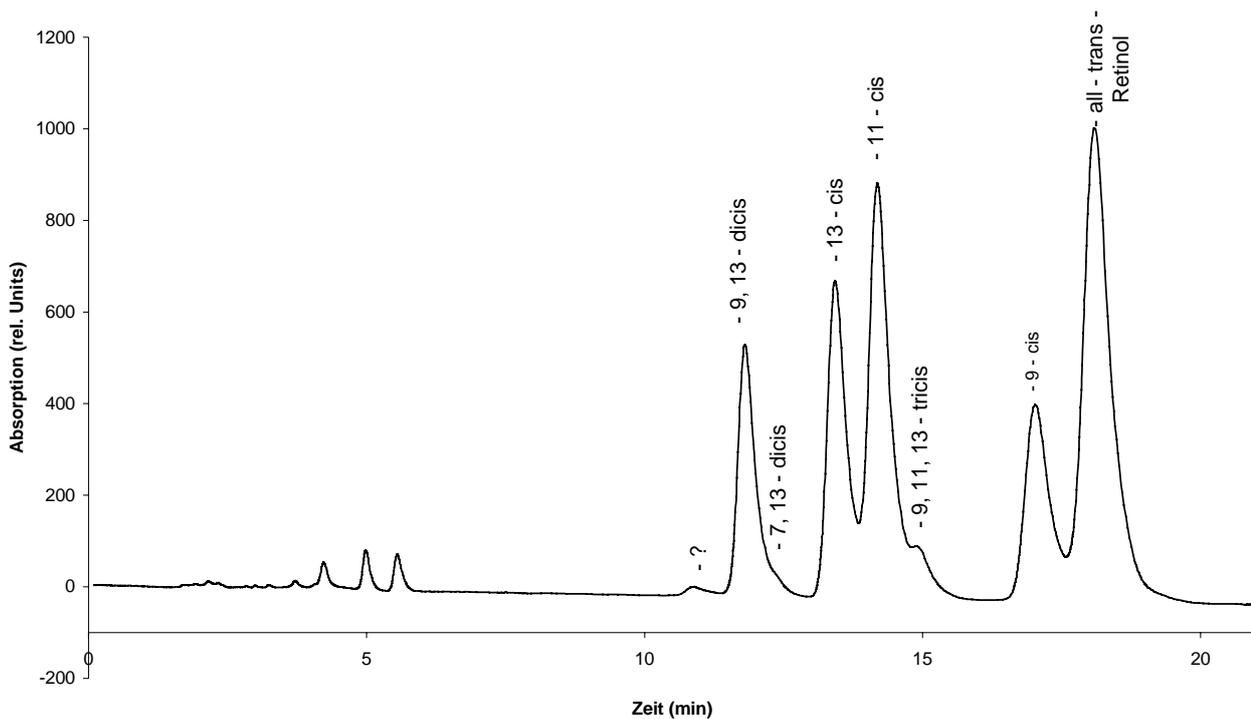
Danach wandelten wir auch dieses Material mit der oben beschriebenen Methode zu Retinol, trockneten unter N₂ und resuspendierten mit 1 ml Heptan. 10 µl dieser Isomerenprobe gaben wir auf die Säule unter den schon im vorangegangenen beschriebenen Messbedingungen.

Tabelle 2. 4.

(ROLHEPT1 84)

Ergebnisse der Umwandlung von Retinal in Retinol

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit (min)</u>	<u>Menge (%)</u>
unbekannt	10,89	0,49
9,13-dicis	11,80	11,97
7,13-dicis	12,24	1,44
13-cis	13,42	15,21
11-cis	14,18	22,73
9,11,13-tricis	14,87	2,61
9-cis	17,02	12,34
all-trans Retinol	18,08	34,65

Abbildung 2. 4.*ROLHEPT1 84; 2,0 ml/min, 92:8 Heptan / t-BME, $\lambda=325$ nm*

Somit zeigte sich, dass durch dieses Umwandlungsverfahren genügend große Mengen an Retinolisomeren gewonnen werden können. Um nun eine Identifikation dieser Retinolisomeren vornehmen zu können, war es notwendig, die bereits abgefangenen und isolierten Retinalisomeren auf die selbe Weise umzuwandeln und mit der jetzt isomerisierten Retinolprobe gemeinsam aufzuspritzen. In diesen Cochromatografien konnten alle bereits bei Retinal gefundenen Isomeren eindeutig zugeordnet werden, bis auf das 7,9-dicis-Isomer, welches unter Retinolmessbedingungen offenbar gemeinsam mit dem all-trans-Peak eluiert und auch bei Verringerung des Etheranteils der mobilen Phase nicht von diesem zu trennen war (ROLHEP1/ Nr. 86 - 88). Auf die Trennqualität unter n-Heptan als Haupteluent soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden, diese Zusammenhänge werden in der abschließenden Diskussion besprochen.

2. 1. 3. Retinylpalmitatisomeren

Während Aufgaben, Eigenschaften und auch die Herstellung von Retinal- und Retinolisomeren in der bisherigen Literatur zum Thema Retinoide häufig sehr ausführlich dargestellt worden sind, wurde die dritte Form des im Auge vorkommenden Sehfärbstoffes, nämlich seine Speicherform in Gestalt des Retinylpalmitates, oft nur relativ kurz und unvollständig abgehandelt. In jenen Arbeiten, die sich schließlich näher mit dem Retinylpalmitat und seinen Aufgaben im Sehprozess widmeten, fanden sich häufig nur unvollständige Darstellungen zu chromatografischen Meßmethoden und zur Identifikation einzelner Isomeren, obwohl Retinylpalmitat mengenmäßig den größten Anteil an aus dem Pigmentepithel extrahierten Retinoiden beim Frosch und auch beim Menschen darstellt. Ziel unserer Messungen nun war es, einerseits die technischen Voraussetzungen seitens der HPLC so zu gestalten, dass problemlose Messungen mit einer hohen Trennleistung ermöglicht werden konnten. Zum anderen wollten wir auch hier eine zweifelsfreie Identifikation aller entstehenden Isomeren vornehmen, um später Rückschlüsse auf die im Auge vorhandenen und entstehenden Isomeren ziehen zu können.

Käuflich zu erwerben ist vom Retinylpalmitat, wie schon bei Retinal und Retinol beschrieben, zu einem akzeptablen Preis in relativ großen Mengen nur die all-trans Form, wobei dieses Material 13-cis-Isomeren in der Größenordnung von bis zu 5 % enthalten kann. Daneben gibt es lediglich noch das 13-cis und das 9-cis-Isomer als „Reinsubstanz“ von der chemischen Industrie, jedoch nur in verschwindend geringen Mengen und relativ teuer. Da uns in bezug auf den Sehprozess aber ohnehin mehr die 11-cis-Form und das all-trans-Retinylpalmitat interessierten, waren wir zunächst auf Belichtungsversuche von all-trans-Retinylpalmitat angewiesen, um festzustellen, ob und wie viele Isomeren dabei entstehen.

Dazu benutzten wir industriell gewonnenes all-trans-Retinylpalmitat (Sigma), von welchem wir einige Milligramm in 5 ml n-Heptan auflösten. Dabei zeigte sich, dass diese Stammsubstanz offenbar nur eine schlechte Löslichkeit in n-Heptan besitzt und, vermutlich durch Wasseradsorptionsvorgänge beim Öffnen der Verpackung, bereits chemische Prozesse in Gang waren, welche zu einer Agglutination der obersten Schichten des Originals geführt hatten.

Trotzdem versuchten wir, einige Mikrogramm der gelösten Probe möglichst frei von ungelösten Bestandteilen in eine HPLC-Spritze aufzuziehen und auf die Säule aufzuspritzen. Dies gelang besser, als wir es uns erhofft hatten, denn die Säulenverhältnisse blieben stabil, die Reproduzierbarkeit war fast optimal und die erreichten Signale im Chromatogramm größer als erwartet (BRYLPA / Nr. 05). Die Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen: Flussgeschwindigkeit 2,0 ml/min, Eluentenverhältnis 98:2 n-Heptan/tertiärer Butylmethylether, Druck 111 bar, Wellenlänge am Detektor 325 nm.

Abbildung 2. 5.

BRYLPA 05; 2,0 ml/min; 98:2 Heptan / t-BME, $\lambda=325\text{nm}$; „industrielles Retinylpalmitat“

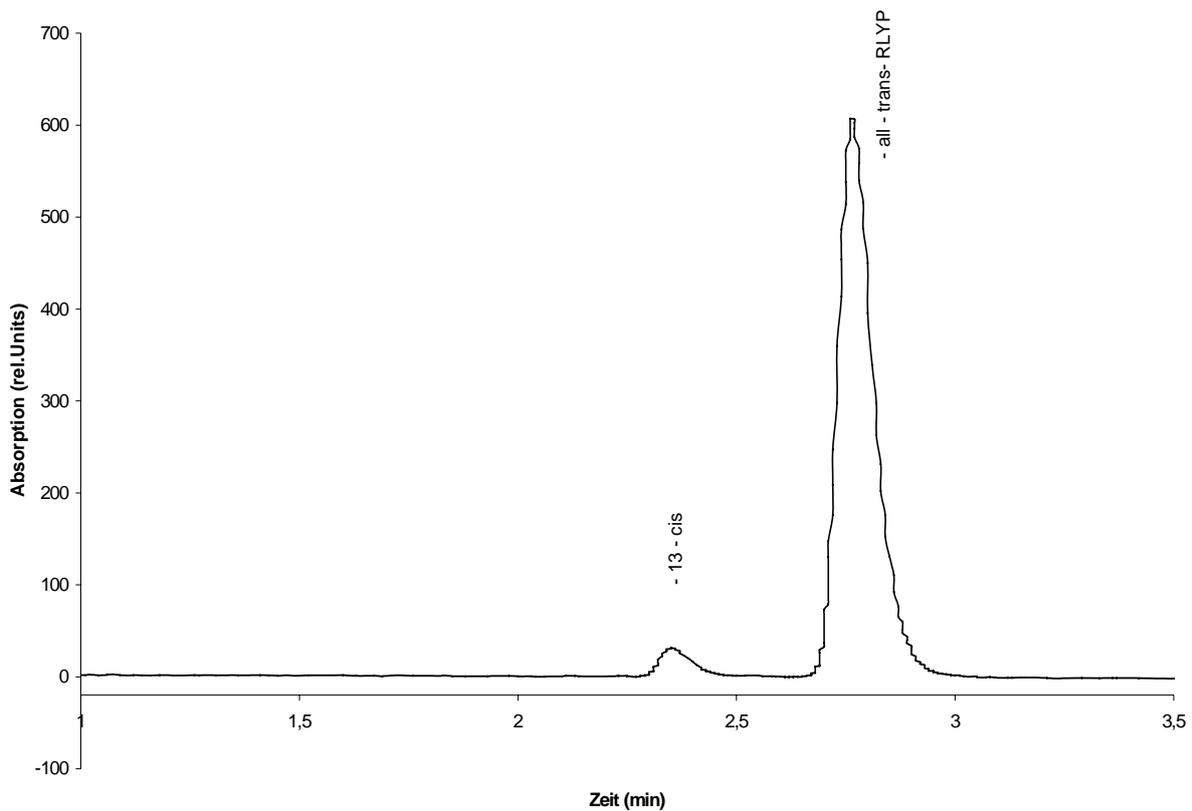


Tabelle 2. 5.

(BRYLPA 05)

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit (min)</u>	<u>Menge (%)</u>
13-cis	2,35	3,99
all-trans- Retinylpalmitat	2,76	96,01

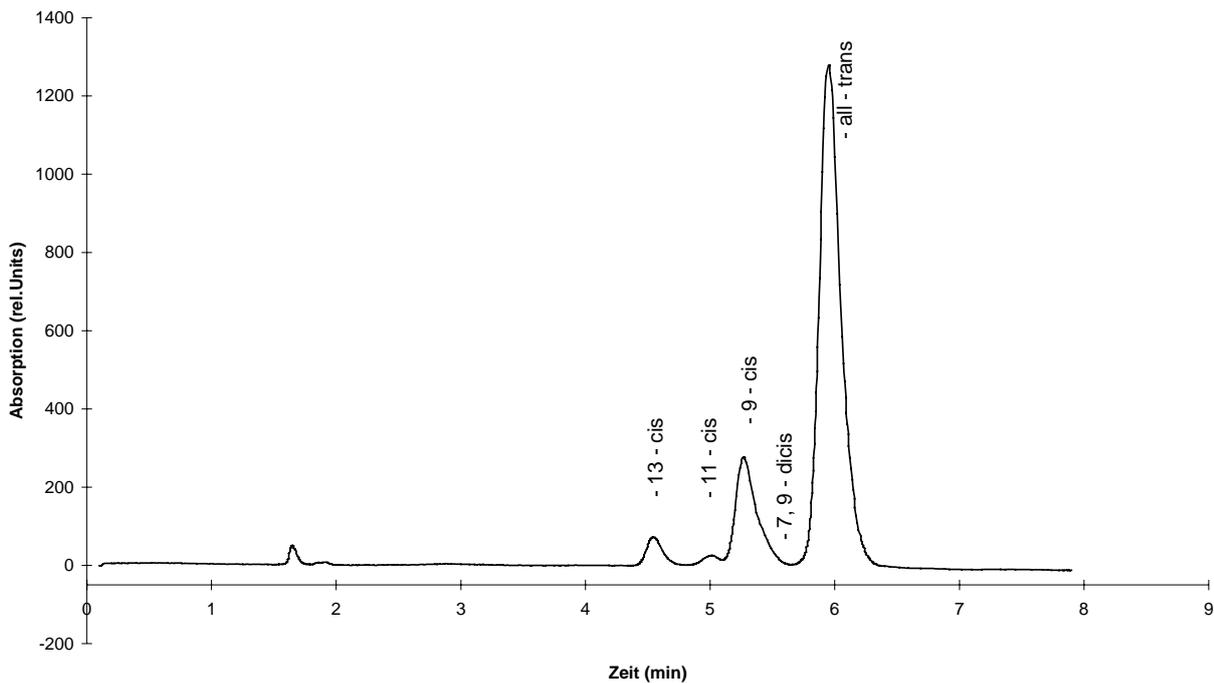
Es zeigte sich in diesen Messungen, dass die Umwandlungsprozesse in der Originalprobe offenbar die qualitative Zusammensetzung der Isomeren, wie von der Firma Sigma vorgegeben (94,5% all-trans; 5,5% 13-cis), nicht beeinflusst hatte. Um nun Isomeren in größeren Mengen zu gewinnen, lösten wir wenige Milligramm all-trans-Retinylpalmitat in 3 ml Ethanol, überführten diese Lösung in eine Glasküvette und belichteten für 40 Minuten unter Weißlicht (60 Watt), indem wir die Küvette auf Eis in einem weißen Styroporbehälter lagerten.

Die Messungen erfolgten zunächst unter den selben Bedingungen wie oben, danach wechselten wir zu einem Mischverhältnis von 99:1 n-Heptan / tertiärem-Butylmethylether bei einem Flow von 2,0 ml/min und einem Druck von 110 bar (RYLHEP / Nr. 23). Die Messwellenlänge betrug weiterhin 325 nm. Obwohl wir bei einem solchen Eluentenverhältnis keine Garantie mehr auf konstante Bedingungen hatten, entschlossen wir uns dennoch, diese Mischung zu wählen, da wir uns bessere Trennbedingungen als bei 98:2 erhofften. Es zeigte sich tatsächlich eine deutlich bessere Auftrennbarkeit der Retinylpalmitatisomeren, jedoch waren die Retentionszeiten nach einigen Messungen schließlich nicht mehr konstant zu halten.

Da aber das Eluentenverhältnis zumindest für die jeweils ersten zehn Messungen bei 99:1 durch die Anlage noch eingehalten werden konnte, ergaben sich schließlich verwertbare Chromatogramme.

Abbildung 2. 6.

RYLHEP 10; 2,0 ml/min; 99:1 Heptan / t-BME; $\lambda=325\text{nm}$; all-trans RYLP belichtet



Zum Vergleich zu diesen Ethanolbelichtungen stellten wir nun noch Versuche mit anderen Lösungsmitteln zur Belichtung an, um feststellen zu können, ob in anderen Lösungsmitteln, in diesem Fall 2,2,2-Trifluorethanol und Acetonitril, noch andere außer den bereits beim Ethanol auftretenden Isomeren entstehen. Daher führten wir zunächst eine 40 Minuten-Belichtung von all-trans-Retinylpalmitat in Trifluorethanol durch, indem wir 3 mg davon in 2 ml 2,2,2-Trifluorethanol lösten und, wie schon oben beschrieben, auf Eis mit Weißlicht belichteten. Dabei entstanden folgende Isomeren:

Tabelle 2. 6.

(RYLHEP 13)

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit(min)</u>	<u>Menge (%)</u>
13-cis	3,92	0,08
11-cis	4,54	3,36
9-cis	5,02	0,60
7,9-dicis	5,27	17,78
all-trans-	5,96	78,19
Retinylpalmitat		

Ein Belichtungsversuch mit Acetonitril, der von der Vorgehensweise her identisch zu der Trifluorethanolbelichtung war, erbrachte kein weiteres Isomer und entsprach in seiner mengenmäßigen Zusammensetzung im wesentlichen der Trifluorethanolbelichtung.

Unbefriedigend war bis zu diesem Zeitpunkt noch die Trennleistung seitens der HPLC Anlage bezogen auf das Eluentenverhältnis. Um noch bessere Abgrenzbarkeiten der einzelnen Peaks zu erreichen, entschlossen wir uns, ein n-Heptan/Butylmethylether-Gemisch herzustellen, welches dann, in bezug auf die Mischungsmöglichkeiten, mit einem größeren Gradienten gefördert werden kann, um nicht in den technischen Grenzbereich der Anlage zu kommen.

Dazu vermischten wir drei Teile n-Heptan mit einem Teil tertiärem-Butylmethylether und ließen diese Mischung nun über Leitung B fördern. Ein Pumpverhältnis von 96:4 Leitung A (Heptan) zu Leitung B (Heptan/Ethergemisch) entspricht so einem wahren Verhältnis von 99:1 Heptan/Ether. Im weiteren werden hier nur die tatsächlichen Eluentenverhältnisse wiedergegeben und nicht mehr die anlagentechnischen. Nach einigen weiteren Messungen mit 99:1, wählten wir schließlich 99,5:0,5 als Mischung und maßen unsere Proben von Ethanol, 2,2,2-Trifluorethanol und Acetonitril erneut durch.

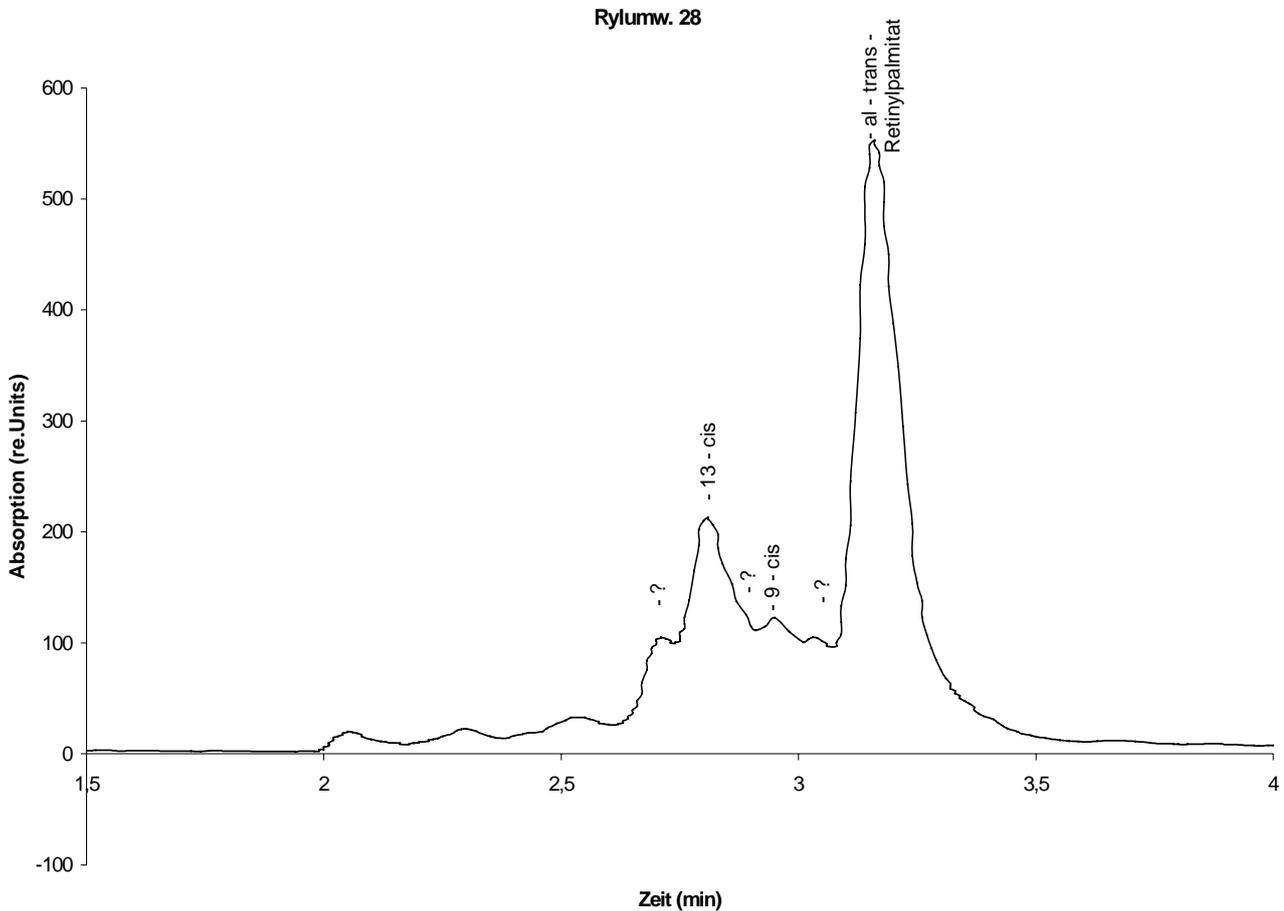
Bei diesem Verhältnis ergaben sich die bislang besten Auftrennungen der Isomeren des Retinylpalmitats, von welchen wir aber zunächst nur das 13-cis, das 9-cis und das all-trans relativ sicher anhand in der Literatur wiedergegebener Chromatogramme identifizieren konnten. Die weiteren, in unseren Belichtungen entstandenen Isomeren waren so nicht zu benennen.

Daher entschlossen wir uns, auch aus dem Grunde heraus, dass bei den Belichtungen ja nur relativ geringe Mengen der einzelnen Isomeren entstanden waren, zur Synthese von Retinylpalmitat aus Retinolisomeren als Ausgangssubstanz. Der von Nöll (1984) dargestellte Weg wurde von uns zunächst, bezogen auf die Mengen der Reagenzien, so übernommen, obwohl unsere Probenvolumina wesentlich geringer waren, als die damaligen. In 1984 wurden ca. 60 mg 11-cis Retinol in einem Gemisch aus 2,0 ml Dichlormethan und 0,12 ml Palmitoylchlorid gelöst und für 10 Minuten in einem Gemisch aus 2 ml Dichlormethan und 0,08 ml Triethylamin in einer 50 ml Doppelhalsdestillationsflasche unter Argonatmosphäre verrührt. Anschließend wurden dem Gemisch 20 ml Aqua dest. und 80 ml Diethylether hinzugefügt.

Die Etherphase wurde in einem Scheidetrichter separiert und zweimal mit 60 ml Aqua dest. ausgewaschen, anschließend fügte man destillierten Petroleumether (100 ml) hinzu und trocknete dann diese Lösung für mindestens drei Stunden über dehydriertem Natriumsulfat. Nach dieser Zeit wurde die Lösung gefiltert und evaporiert (Rotavapor RE 120, Büchi). In 4 ml n-Hexan wurde der Ester schließlich resuspendiert und auf die Säule gegeben.

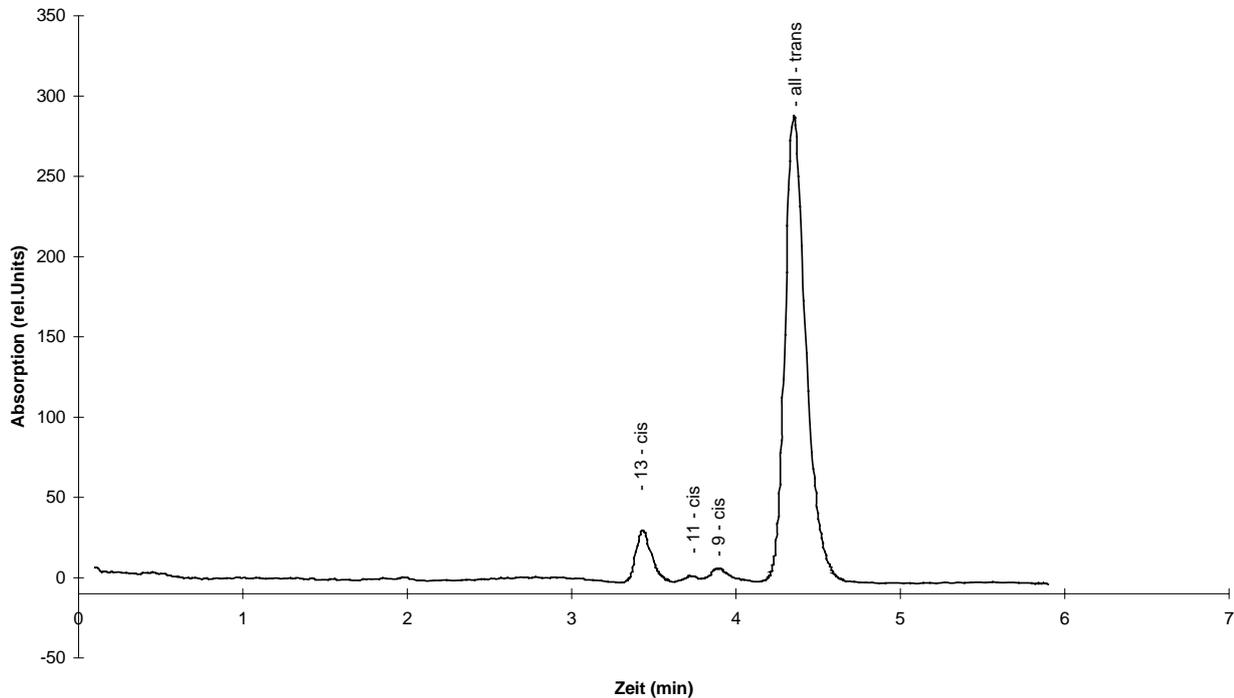
Wir modifizierten diesen Vorgang zunächst nur geringfügig, indem wir die Durchmischung zu Beginn unter Stickstoffbegasung durchführten und die Extraktion mit Petroleumbenzin statt mit Petroleumether vornahmen.

Die Resuspension erfolgte schließlich mit n-Heptan. Als Grundprobe nahmen wir eine ältere Probe 40 Minuten in 2,2,2-Trifluorethanol belichtetes Retinol (ROLHEP1 / Nr. 56), die wir wie oben dargestellt umwandelten und 2,5 µl davon auf die Säule aufspritzten. Die Messbedingungen waren: Flow 1,5 ml/min, 99:1 n-Heptan / tertiärer-Butylmethylether, Druck 81 bar, Wellenlänge 325 nm.

Abbildung 2.7.***RYLUMW 28; synthetisch hergestelltes Isomerengemisch Retinylpalmitat aus Retinol***

Es zeigte sich hierbei, dass nun zwar mehr Isomeren von Retinylpalmitat nachweisbar waren, als bei den vorangegangenen Belichtungsversuchen mit den all-trans-Proben, das Problem lag jetzt allerdings darin, eine optimale Trennung der Isomeren im Chromatogramm zu erreichen. Auf das Problem der Mischverhältnisse der Eluenten soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

An dieser Stelle sei gesagt, dass durch Zumischung von n-Heptan zum tertiären-Butylmethylether schließlich eine Eluentenkonstellation im Verhältnis 99,5:0,5 (Heptan/Ether) möglich wurde, welche eine gute, wenn auch noch nicht optimale, Darstellbarkeit der Isomeren im Chromatogramm erbrachte.

Abbildung 2. 8.***RYLUMW 34; Isomerentrennung bei Mischverhältnis 99,5:0,5 Heptan / t-BME***

Im folgenden war es nun möglich, auch einzelne Isomeren, welche in den Retinalmessungen abgefangen wurden, zunächst wie oben beschrieben in Alkoholform umzuwandeln und diese dann schließlich zu einem Palmitinsäuresalz zu verestern.

So war uns die Herstellung der gewünschten Isomeren und im weiteren auch die Identifikation einzelner, bisher unbekannter Peaks in den Chromatogrammen möglich. Somit gelang es uns, die Retinylpalmitatisomeren 13-cis, 9,13-dicis, 11-cis, 9-cis und 7,9-dicis durch Cochromatografie zu identifizieren (RYLUMW Nr. 32, 34, 42, 43).

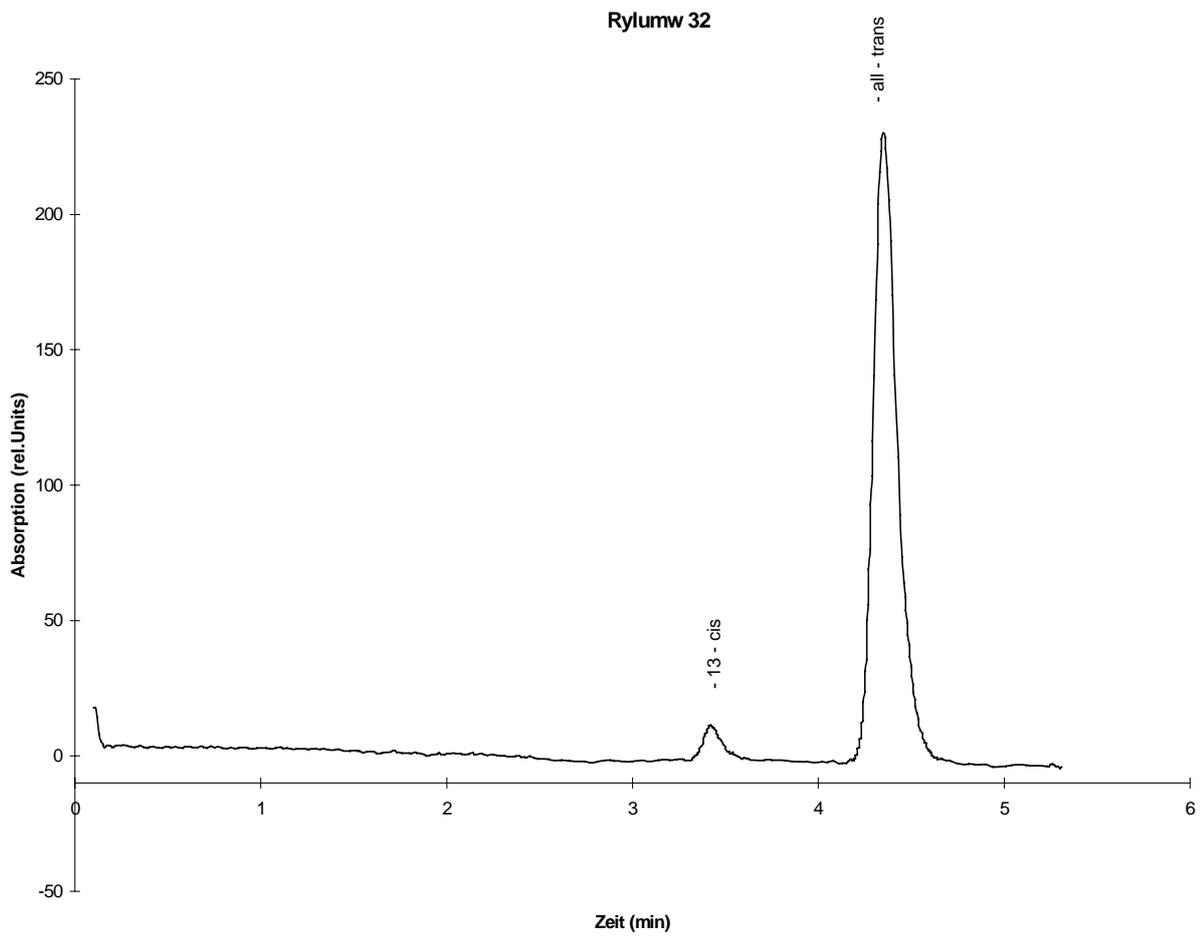
Abbildung 2.9.***Identifikation 13-cis-Retinylpalmitat***

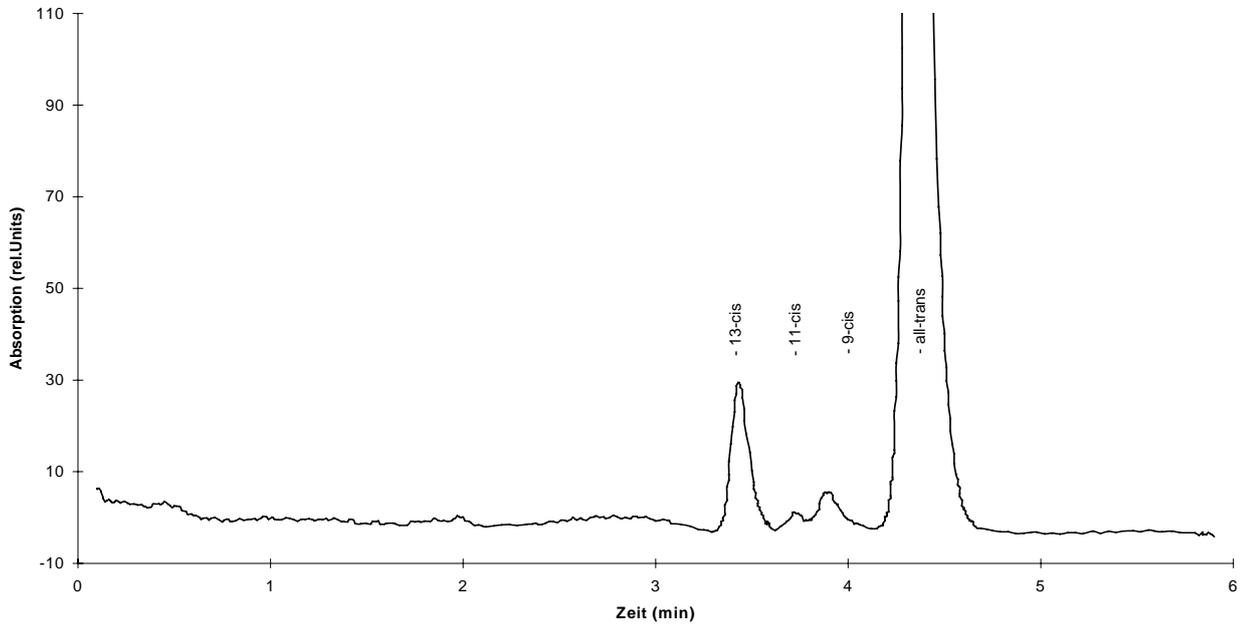
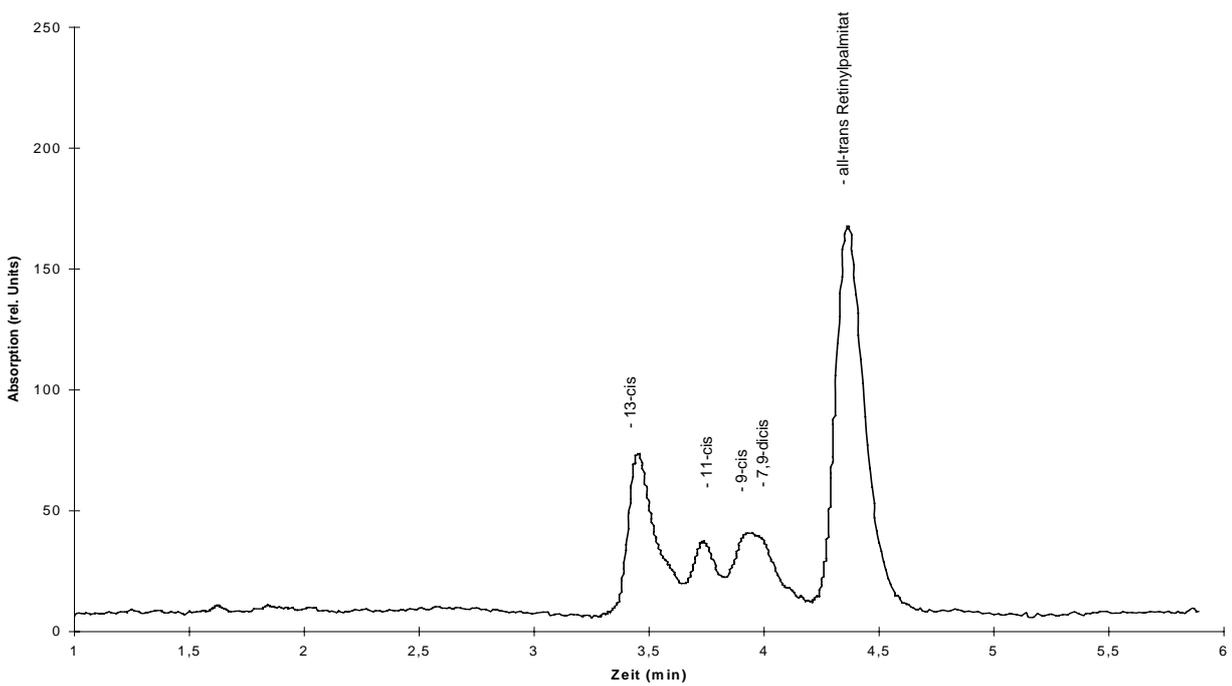
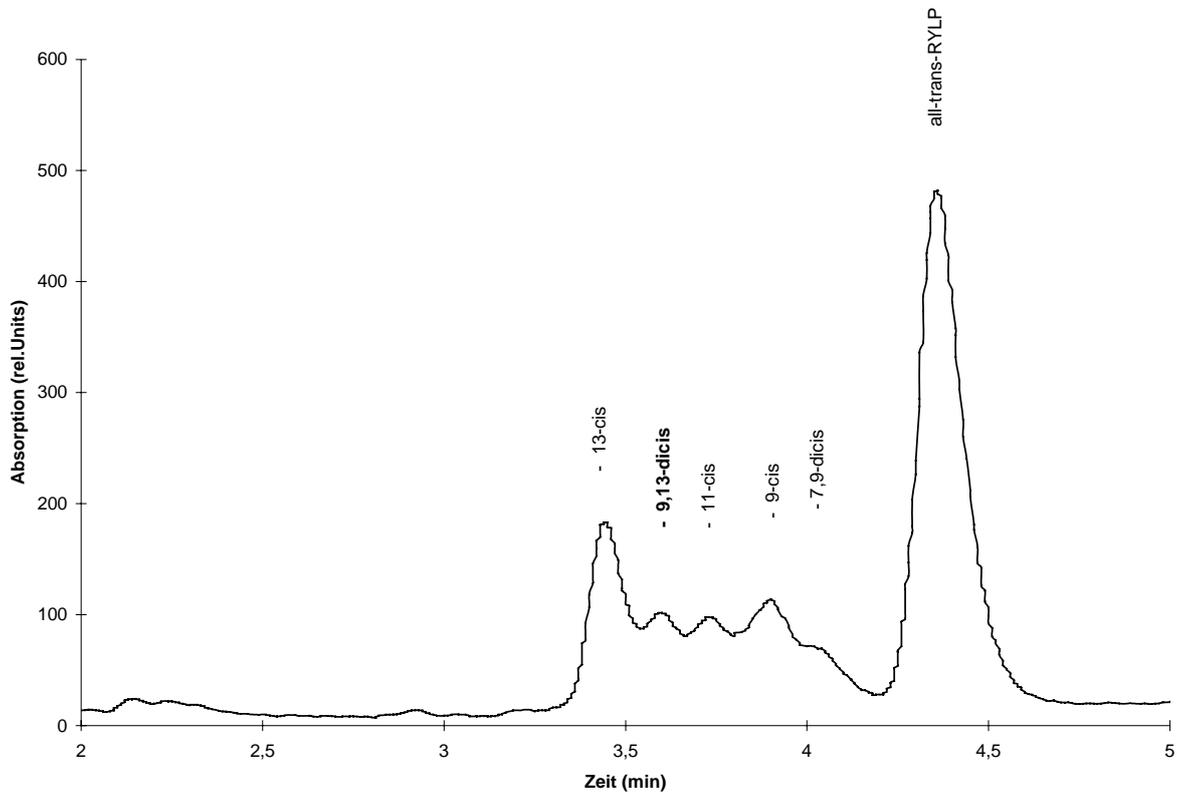
Abbildung 2.10.***Identifikation 11-cis und 9-cis-Retinylpalmitat*****Abbildung 2.11.*****Identifikation 7,9-dicis-Retinylpalmitat***

Abbildung 2.12.***Identifikation 9,13-dicis-Retinylpalmitat***

2.2. Probengewinnung aus Froschretinae und -pigmentepithel

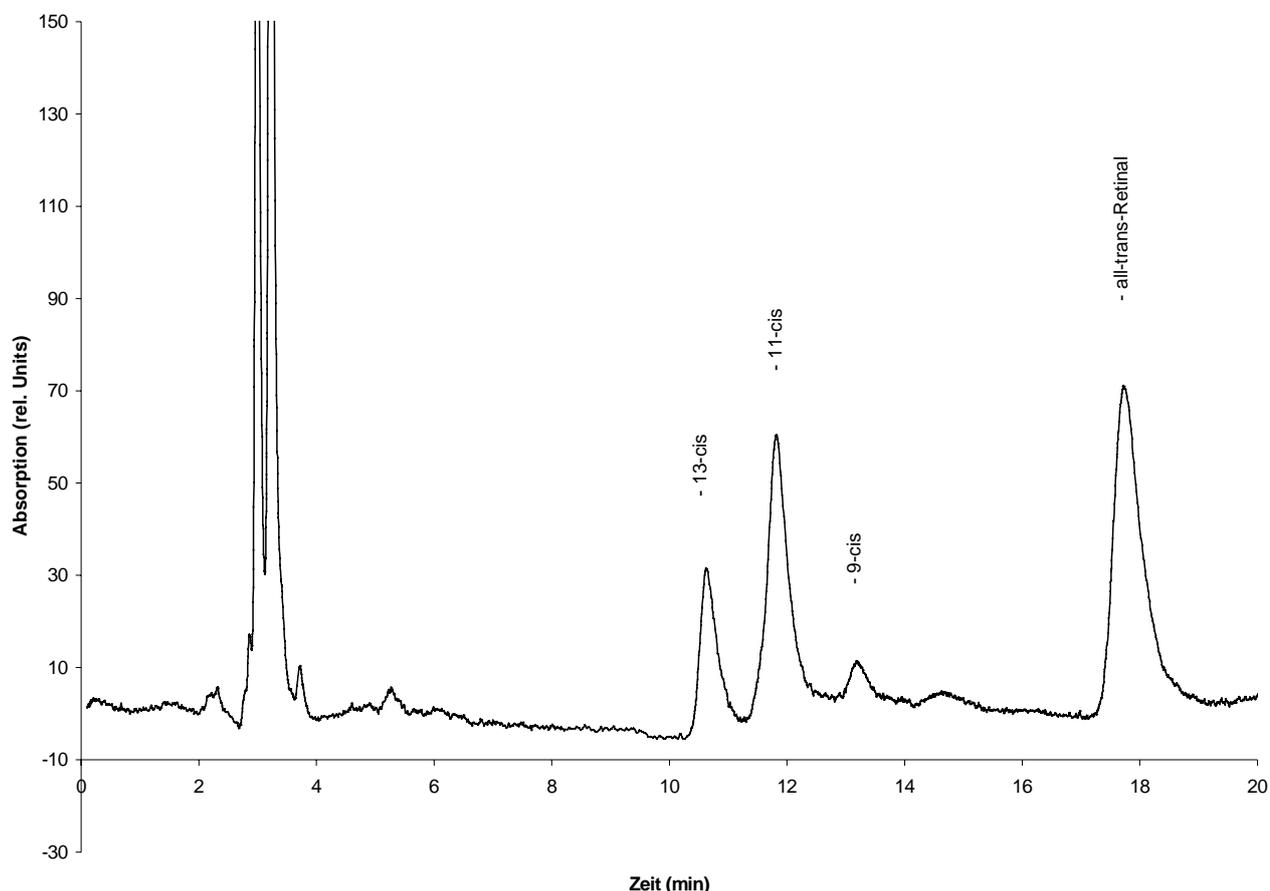
Für die Gewinnung der Proben zur HPLC-Bestimmung der Farbstoffisomeren in Retina und Pigmentepithel der Froschaugen hielten wir uns an die in unserem Labor von BESLER (1994) entwickelte Methodik, um zunächst vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können. Augen von Grasfröschen, die den Patch-clamp-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe entstammten und unter dem Infrarotmikroskop aus den Augenhöhlen freipräpariert und anschließend sofort bei -30°C tiefgefroren wurden, tauten wir nach einer durchschnittlichen Lagerungszeit von 6 Tagen in einem Behälter mit Eis behutsam auf. Danach entfernten wir mittels einer Schneidevorrichtung die Kornea und lösten vorsichtig die Retina aus dem Augenbecher aus. Dabei zeigte sich, dass, offenbar durch den Gefriervorgang bedingt, die Adhäsivkräfte zwischen Retina und Pigmentepithel so groß geworden waren, dass ein sauberes und komplettes Lösen der Retina allein fast unmöglich geworden war. Nach einigen wenigen erfolgreichen Präparationen der Retina (RALPIG Nr. 12) entschlossen wir uns schließlich, Netzhaut und Pigmentepithel en bloc zu entnehmen und aufzubereiten, um komplette Messergebnisse zu erhalten.

Nach der Präparation überführten wir das entnommene Material in ein Eppendorfgesäß (2 ml) und trockneten es unter einer Stickstoffatmosphäre. Anschließend fügten wir 300 μl Ethanol hinzu und vortexten die Probe für 60 Sekunden. Danach fügten wir 300 μl Petroleumbenzin hinzu, vortexten erneut kurz für 10 Sekunden und zentrifugierten die Probe schließlich für 3 Minuten. Vom klaren Überstand zogen wir nach der Zentrifugation 100 μl ab, trockneten diese unter Stickstoffbegasung und resuspendierten schließlich unseren Extrakt mit 50 μl Heptan.

Die jetzt durchgeführten ersten Messungen (RALPIG Nr. 15 - 17) erbrachten für uns mehrere Aufschlüsse. Zum einen zeigte sich, dass unsere Extraktionsmethode vom quantitativen Aspekt her genügend Farbstoffmaterial zur Analyse erbrachte. Zum anderen aber fiel uns sofort auf, dass im aufgespritzten Probenmaterial neben den erwarteten 11-cis und all-trans-Retinalisomeren auch erhebliche Mengen an 13-cis- und 9-cis-Retinalisomeren zu finden waren. Wiedergegeben ist an dieser Stelle die Messung Ralpig 17.

Abbildung 2.11.

Aus Froschretina und -pigmentepithel extrahierte Retinalisomeren; 2,0 ml/min; 98:2 Heptan / t-BME; $\lambda=317\text{nm}$



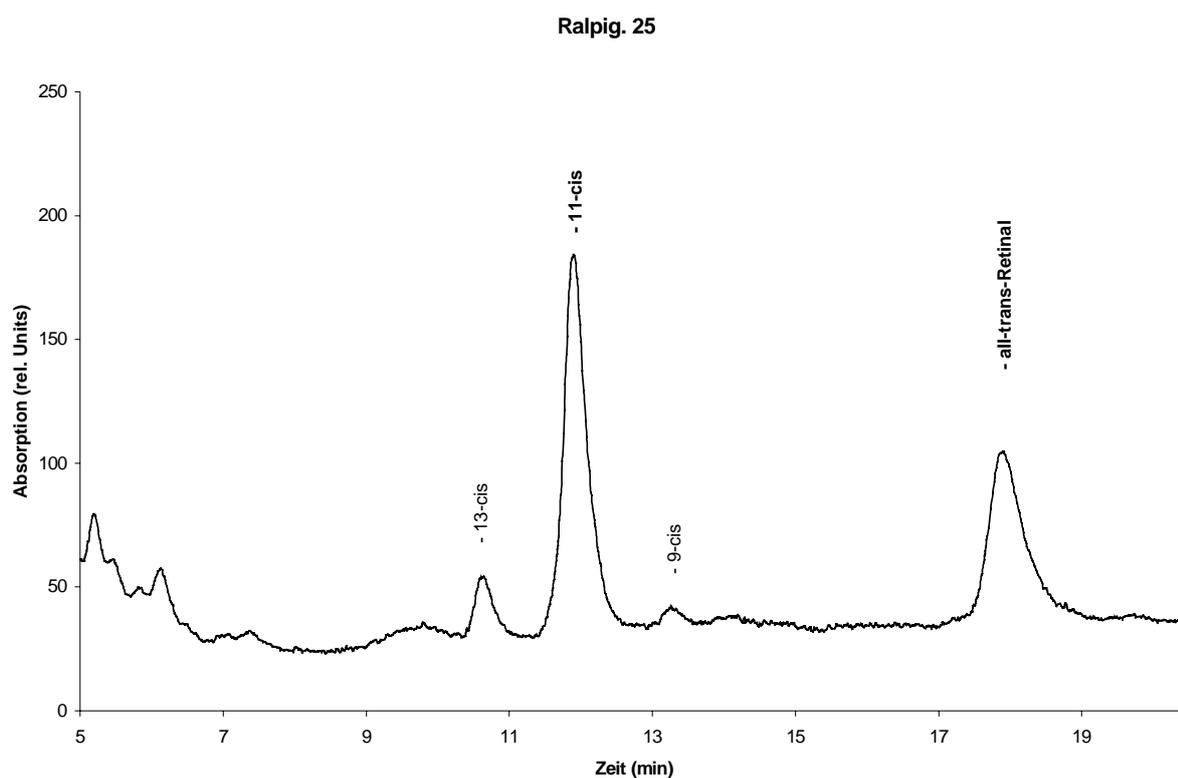
Diese Retinalisomeren sind aber weder in der Retina, noch im Pigmentepithel vorhanden, so dass diese nur als Zufallsprodukte, entweder während der Präparation der Augen aus den Augenhöhlen, dem Gefrier- bzw. Auftauvorgang oder der eigentlichen Probenaufbereitung entstanden sein konnten. Da es sich bei den von Besler (1994) verwendeten Proben jedoch ebenfalls um Augen handelte, die zunächst präpariert und dann tiefgefroren wurden und bei diesen Messungen, die allerdings unter schlechteren Trennbedingungen stattgefunden hatten, dieser Fehler nicht aufgefallen war, vermuteten wir die Fehlerquelle in der Probenaufbereitung.

Die Entnahme des Pigmentepithels samt Retina aus dem aufgeschnittenen Augenbecher erfolgte unter dem Infrarotmikroskop bei schwachem Rotlicht, so dass eine Isomerisation von 11-cis oder all-trans-Retinal hierbei völlig auszuschließen war.

Auch das Vortexen erschien uns als möglicher Grund des aufgetretenen Fehlers wenig wahrscheinlich, zumal die jeweilige mechanische Belastung der Probe nur sehr kurzfristig war und wir zwischenzeitlich die Probe immer wieder über Eis kühlten. Trotzdem entschlossen wir uns, nach dem Hinzufügen von Ethanol und Petroleumbenzin nur noch einmalig für 10 Sekunden zu vortexen, um feststellen zu können, ob hier die Ursache des Fehlers lag. Die nun hergestellte Probe unterschied sich jedoch nur unwesentlich von der zuerst hergestellten. Wieder waren 13-cis und 9-cis-Retinal in relativ hohen Mengen nachweisbar. So blieb uns als mögliche Ursache der künstlichen Isomeren nur noch die Eppendorfcentrifuge. Tatsächlich stellten wir fest, dass während der zweiminütigen Laufzeit ein erheblicher Temperaturanstieg am Zentrifugenkopf festzustellen war, den wir vorher so nicht bemerkt hatten. Wir entschlossen uns also, auf die Zentrifugation einer Probe zu verzichten und den Überstand direkt nach dem Vortexen aus dem Probengefäß abzuziehen. Es zeigte sich nun, dass in dieser Probe weitaus weniger Anteile an 13-cis- und 9-cis-Retinal enthalten waren, als bei den vorangegangenen (RALPIG Nr. 25). Somit schien zumindest die Hauptursache der bei der Präparation entstandenen, unerwünschten Isomeren geklärt zu sein.

Abbildung 2.12.

Retinaextraktion Retinalisomeren ohne mechanische Bearbeitung der Probe



Allerdings blieb in einigen weiteren Messungen ein Auftreten von geringen Mengen an den beiden o.a. Isomeren des Retinals nicht völlig aus. Diesen Umstand führten wir auf ein teilweise unsachgemäßes Überführen der Augen vom Präparationsort an der Patch-clamp-Anlage in die Tiefkühltruhe zurück, bei welchem die Augen zwar in einem Präpariergefäß, welches mit Aluminiumfolie umhüllt wurde, vor Licht geschützt waren, jedoch einige wenige Meter über einen beleuchteten Flur transportiert werden mussten.

Uns schien es wahrscheinlich, dass hierbei, durch unsachgemäße Verpackung Weißlicht an die Augen gekommen war, welches eine geringfügige Isomerisation von 11-cis oder all-trans-Retinal auf der Netzhaut bewirkt haben könnte.

Schließlich stellte sich jetzt das Problem, die Zentrifugation, welche ihren eigentlichen Sinn darin hatte, Zellpartikel aus Pigmentepithel und Netzhaut aus der Petroleumbenzinphase zu eliminieren, damit dieses Zellmaterial nicht mit auf die Säule aufgespritzt werden und sämtliche Leitungen der HPLC-Anlage verstopfen und somit Trennleistung und Retentionszeiten verfälschen konnte, durch eine ebenso wirksame Methode zu ersetzen, die jedoch weniger belastend für das Probenmaterial sein sollte im Hinblick auf ungewollte Isomerisation der Farbstoffe. Daher entschieden wir uns dazu, den Extraktionsvorgang dahingehend zu modifizieren, dass wir gänzlich auf eine Zentrifugation der Proben verzichteten und den Petroleumbenzinüberstand statt dessen filtrierten. Wir lagerten nach dem Vortexen der entsprechenden Probe diese wieder auf Eis und warteten die Trennung von Ethanol- und Etherphase ab, die obere Etherphase wurde schließlich mit einer Glaskolbenspritze (DuPont) vorsichtig abgezogen und dieses Probenvolumen durch einen 5 µm Papierfilter (DuPont) in einem Edelstahlfilterhalter (DuPont) hindurchgespritzt. Damit sollten alle größeren Verunreinigungen, Schmutzpartikel wie Zellmaterial, aus unserer Probe eliminiert sein.

Um im Hinblick auf ungewollte Isomerisierung der Retinalisomeren in den Extrakten sicher zu gehen, verzichteten wir schließlich sogar auf das Vortexen der Proben. Wir beschränkten uns lediglich darauf, die Pigmentepithel / Retinae nach dem Überschichten mit Ethanol und Petroleumbenzin mehrmals kurz von Hand zu schütteln, um die mechanische Belastung so gering wie möglich zu halten.

Danach bearbeiteten wir das gewonnene Extraktionsmaterial analog zu den ersten Versuchen dieser Reihe. Nicht verbrauchtes Probenmaterial wurde von uns nach den einzelnen Messreihen erneut unter Stickstoff getrocknet und in die Gefriertruhe überführt, um Referenzproben zur weiteren Verfügung zu haben. Die Präparate von Retina und Pigmentepithel wurden nach den Extraktionen verworfen.

2.3. Probengewinnung aus Pinealorganen von Regenbogenforellen

Im Rahmen unserer Messtätigkeiten hatten wir unverhofft die Gelegenheit zu einer weiteren Anwendungserprobung unseres modifizierten Messverfahrens, da uns die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Meissl aus dem Kerckhoff Institut Bad Nauheim um Messungen an Pinealdrüsen von Regenbogenforellen bat. Hierzu, insbesondere zur Methodik der Probengewinnung, sei auf das gesonderte Kapitel 5. zu diesem Thema verwiesen.

2.4. Apparative Ausstattung

Die Analyse der Retinal-, Retinol- und Retinylpalmitatisomeren wurde mit einem HPLC-System 400 der Firma Kontron Instruments durchgeführt, bestehend aus einem HPLC-Pumpensystem 420 und einem HPLC-Gradientenformer GF 425. Die Eluenten wurden zunächst durch ein Degasser-System der Firma Erma Inc. (ERC-3312) geleitet und dann auf der Niederdruckseite des HPLC-Systems gemischt. Zur Bestimmung der Absorptionsraten verwendeten wir einen Kontron UV-Detektor mit variabler Wellenlänge und einem photometrischen Bereich von 0,01 AUFS.

Für unsere Messungen wurde für die Retinalisomeren eine Messwellenlänge von 371,41 nm vorgewählt, entsprechend dem Absorptionsmaximum von all-trans-Retinal in n-Hexan, für die Retinolisomeren eine Wellenlänge von 325 nm, dem Absorptionsmaximum von all-trans-Retinol in n-Hexan und für die Retinylpalmitatmessungen ebenfalls eine Wellenlänge von 325 nm, bezogen auf das Absorptionsmaximum von all-trans-Retinylpalmitat [BESLER 1994]. Vom Detektor wurden die gewonnenen Daten zur Weiterverarbeitung zum Kontron 450-MT-Data System übermittelt.

Das HPLC-System war mit einem Rheodyne Injektionsventil (Modell 7125) mit einem maximalen Probevolumen von 20 µl ausgerüstet. Die Probeninjektionen wurden von Hand mit einer 5, 10 oder 25 µl Spritze der Firma Hamilton durchgeführt.

Zur Chromatographie selbst verwendeten wir durchgehend eine Säule der Firma DuPont ZORBAX SIL (ID 4,6 mm, Länge 25 cm), welche mit Si60 Partikeln mit einem Durchmesser von 5 - 6 µm gepackt war. Sämtliche im folgenden wiedergegebenen Chromatogramme wurden bei einer konstanten Temperatur von 25° Celsius und schwachem Rotlicht gemessen.

2.4.1. Reagenzien

N-Hexan, n-Heptan und tertiärer Butylmethylether zu unseren Versuchen als Eluenten der HPLC bezogen wir von der Firma MERCK (LiChrosolv), ebenso wie 2,2,2 Trifluorethanol, Ethanol und Petroleumether als Reagenzien zu unseren Experimenten. Wir gaben dem tertiären Butylmethylether den Vorzug gegenüber dem häufiger benutzten Diethylether aufgrund seines niedrigeren Dampfdruckes von 417 mbar, im Vergleich dazu beim Diethylether 587 mbar, da wir so ein Ausgasen der Etherkomponente auf der Niederdruckseite des HPLC-Systems vermindern konnten.

Palmitoylchlorid, Dichlormethan und Diethylamin für die Umwandlungsversuche zu Retinylpalmitat stammten ebenso von MERCK wie das Petroleumbenzin (LiChrosolv), Kalium- und Natriumborhydrid.

Als Ausgangsmaterialien standen uns für unsere Experimente all-trans-Retinal, all-trans-Retinol und all-trans-Retinylpalmitat als „Reinsubstanzen“ zur Verfügung, ebenso 11-cis- und 13-cis-Retinal (SIGMA, FLUKA, ALDRICH). Die übrigen Isomeren gewannen wir in der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Art und Weise.

2.5. Auswertung der Chromatogramme

Das Kontron MT-450 Data System enthält neben der Software zur Systemsteuerung und Datenspeicherung auch ein Programm zur Auswertung der Chromatogramme, welches eine automatische Flächenberechnung der Peaks ermöglicht und, unter Vorgabe entsprechender Parameter, dieser Fläche die absolute Menge an Probenmaterial zuordnen kann. Somit konnten wir sofort nach Abschluss einer Messung die absolute Menge der einzelnen gewonnenen Isomeren abrufen.

Eingerechnet wurde hierbei anschließend noch Korrekturfaktoren zum Abgleich der maximalen Absorptionsspektren der Einzelisomeren, welche uns aus den Versuchen im Forschungszentrum Jülich aus dem Jahre 1990 zur Verfügung standen (Besler 1994).

2.6. Diskussion

Die Gewinnung von Probenmaterial zur HPLC gestaltete sich aufgrund der Möglichkeit der chemischen Synthese der Palmitat- und Alkoholform des Retinals weitgehend problemlos. Der Materialverlust während der Umwandlungsschritte war durchweg sehr gering und die chemische Stabilität der Isomeren hierunter gewährleistete reproduzierbare und plausible Ergebnisse.

Während die bereits etablierte Methode zur Gewinnung von Retinol uns lediglich zum Abgleich der Ergebnisse mit früheren Messreihen diente, stellte die Synthese von Retinylpalmitat, speziell die Veresterung der verschiedenen Retinalisomeren zur Identifikation in deren Palmitatform in der Chromatografie einen neuen Aspekt in unserer Arbeit dar, da in unseren bisherigen Arbeiten die Identifikation dieser Isomeren nur anhand der Literatur durchgeführt wurde, welche zu diesem Thema nur spärliche Informationen enthält. In einem separaten Kapitel wird auf die Messungen mit Retinylpalmitat im weiteren noch näher eingegangen werden.

Problematisch gestaltete sich allerdings die Gewinnung von Sehfärbstoffisomeren aus Nativgewebe.

Im Rahmen der Anwendungserprobung unserer modifizierten HPLC-Methode führten wir verschiedene Versuche zur Identifikation der Farbstoffisomeren in Pigmentepithel und Retina von Froschaugen durch, in deren Verlauf wir feststellen mussten, dass die bisherigen Extraktionsmethoden Fehlerquellen in sich bargen, welche die Bewertung der Ergebnisse zumindest erschwerte. Wir versuchten daher eine systematische Fehleranalyse durchzuführen, die problematischen Schritte der Isomerengewinnung zu modifizieren und die Messmethodik anzupassen. Auch hierzu wird auf ein gesondertes Kapitel verwiesen.

Schwierigkeiten anderer Art traten bei der zweiten von uns durchgeführten Anwendungserprobungen in bezug auf Pinealorgane von Regenbogenforellen auf. Es gelang uns zwar, einen Isomerennachweis zu führen und eine Identifikation vorzunehmen, für weitergehende Aussagen aber waren die uns zur Verfügung stehenden Probenvolumina zu gering, beziehungsweise war unser technisches Equipment an die Grenzen seiner Leistungsfähigkeit gestoßen.

Insgesamt konnten wir in den zentralen Aspekten unserer Arbeit aber auf erprobte Methoden der Probenmaterialgewinnung zurückgreifen, so dass eine Vergleichbarkeit der neuen Messmethodik mit n-Heptan als Hauptanteil der mobilen Phase der HPLC zu bisherigen Verfahren gewährleistet war.

3. HPLC-Messungen der Retinoide

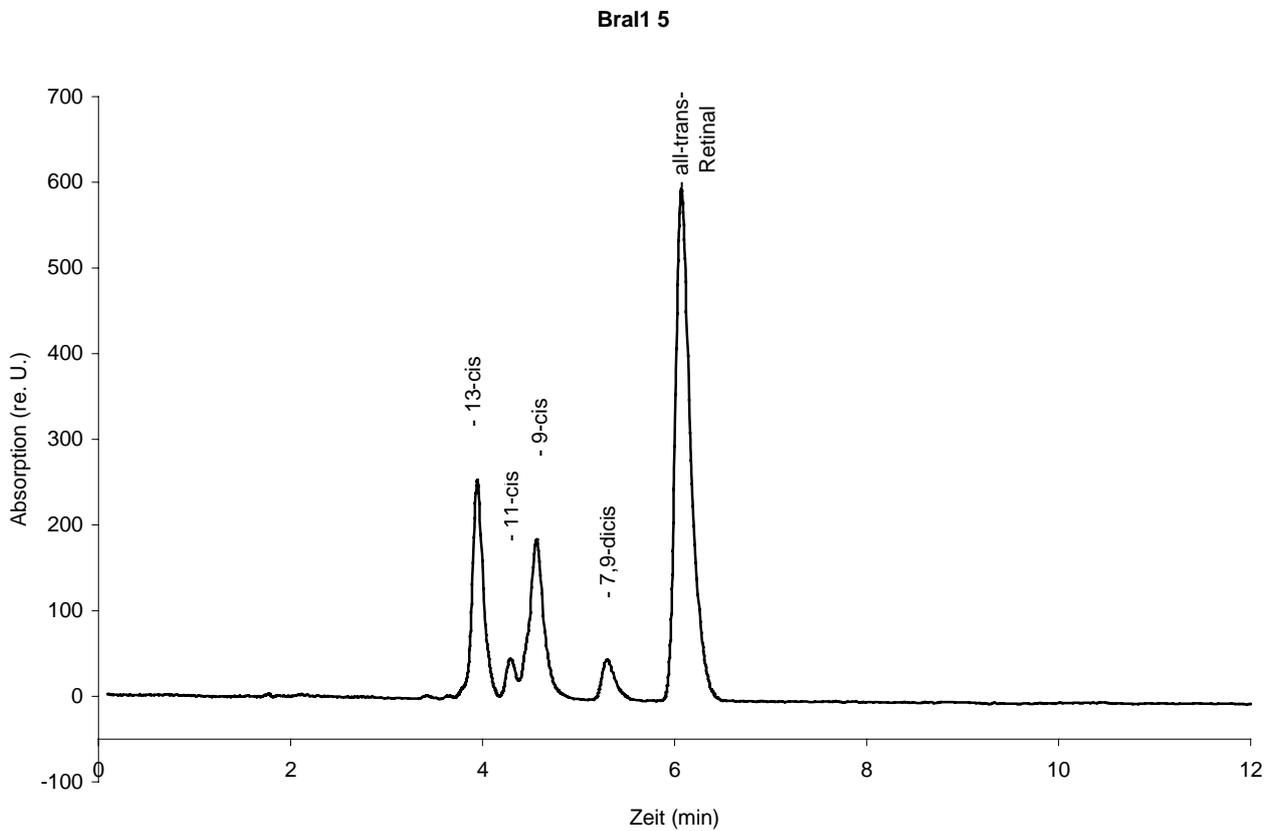
3.1. Messungen mit dem Lösungsmittel Hexan

Zur Messgrundlage aller weiteren Versuche, die wir hinsichtlich des Lösungsmittels Heptan als Laufmittel in der HPLC der Retinoide unternahmen, dienten uns die zunächst durchgeführten Experimente mit dem Laufmittel Hexan. Durch eine zwischenzeitliche Ruhephase der HPLC-Anlage bedingt, galt es zunächst diese, wie auch die Silicagel-Säule neu zu kalibrieren.

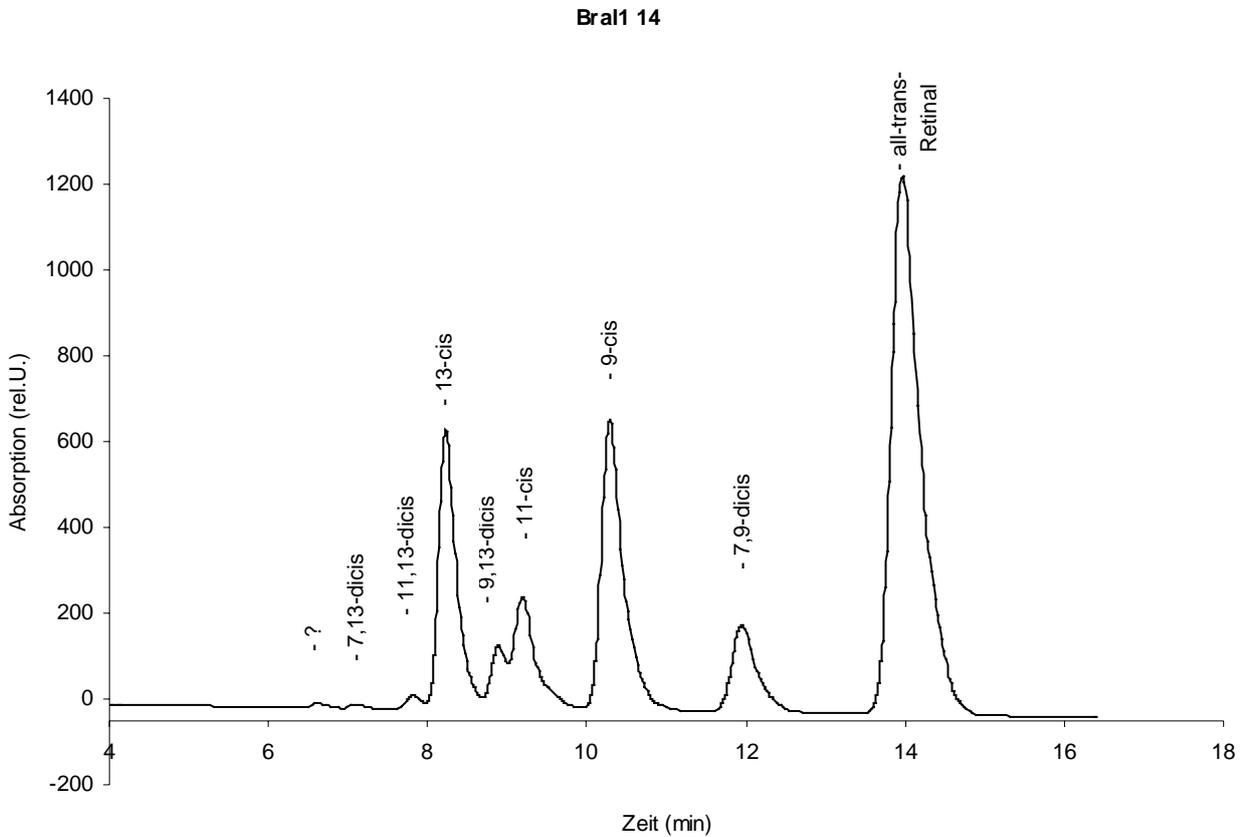
Zur Vorbereitung dessen stellten wir uns mehrere Isomerenproben her, analog zu den im Detail beschriebenen Verfahren aus dem Kapitel Isomerenherstellung. Es handelte sich um Proben von all-trans-Retinal, welche für 20, 40, 60 und 120 Minuten in 2,2,2 - Trifluorethanol und in Hexan belichtet wurden, beziehungsweise um Probenmaterial, welches nach der Belichtung gemäß dem bereits beschriebenen Verfahren in Retinol umgewandelt wurde. Als Vergleichsgrundlage dienten uns Messungen von Besler aus dem Jahre 1992, welche unter den selben Konditionen auf unserer Anlage durchgeführt wurden.

3.1.1. Messungen bei verschiedenen Laufmittelverhältnissen (Retinal)

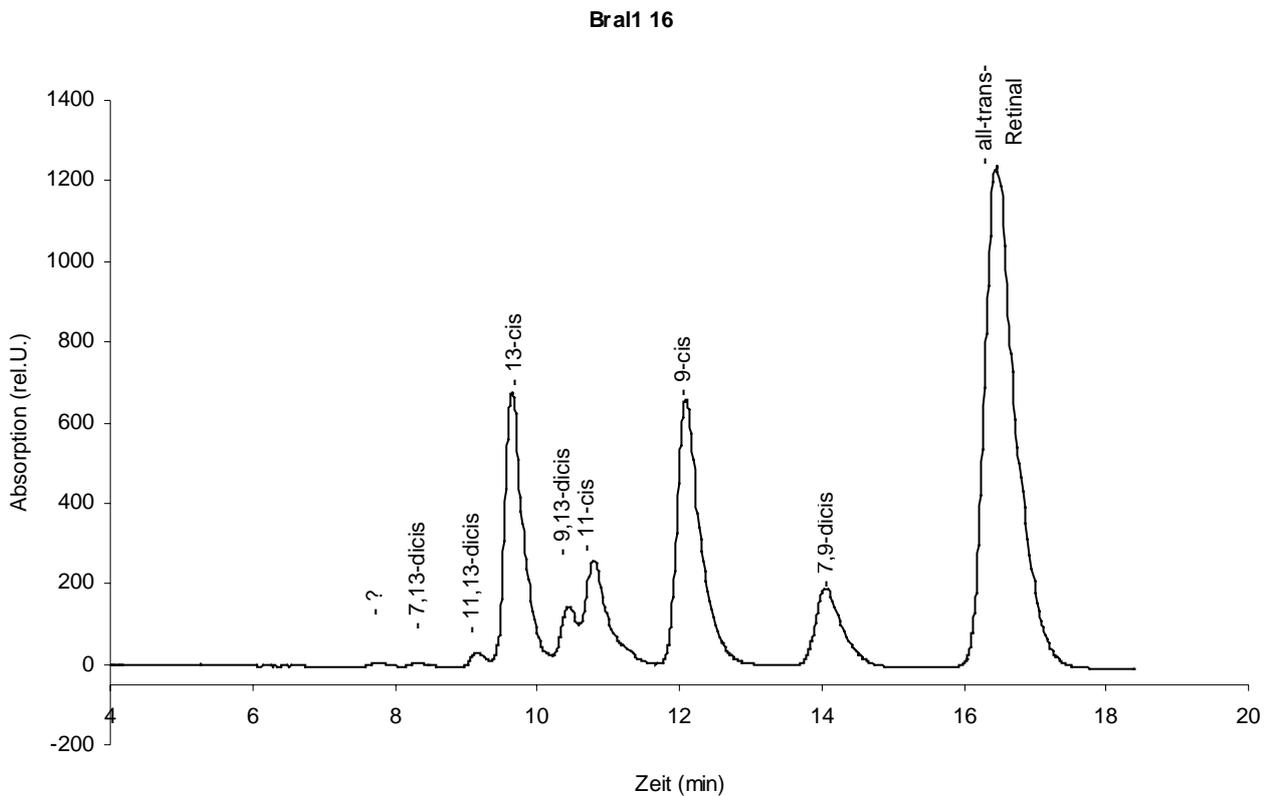
Die ersten Messungen, welche wir durchführten, beschäftigten sich noch einmal mit dem Einfluss der Mischverhältnisse der Eluenten Hexan und t-Butylmethylether auf die Gesamtdauer der Messung und die Auftrennbarkeit der Isomeren bei konstanter Pumpgeschwindigkeit. Wir wählten einen Flow von 2,0 ml/min und begannen mit einem Mischverhältnis von 90:10 (Hexan : t-BME). Der dabei gemessene Druck vor der Säule betrug im Durchschnitt 85 bar. Bei einer Messwellenlänge von 371 nm ließ sich folgende Isomerenkonstellation nachweisen. Die verwendete Probe war eine all-trans-Retinalprobe, welche für 60 min unter Weißlicht in 2,2,2 - Trifluorethanol belichtet wurde (Abb. 3.1.).

Abbildung 3.1.**Mischverhältnis 90:10**

Die Gesamtdauer der Messung betrug hierbei 6,45 min. Wie sich zeigte, war die Auftrennung der Einzelpeaks nur unzureichend und damit eine exakte Mengenermittlung schwierig. Bei sonst konstanten Bedingungen wurde für die nächste Messreihe ein Eluentenverhältnis von 92:8 vorgewählt (Abb. 3.2.), aus welchen sich folgende Daten ergaben.

Abbildung 3.2.**Mischverhältnis 92:8**

Hieraus war bereits ersichtlich, dass bei Veränderung des Laufmittelverhältnisses zugunsten des Hexans eine verbesserte Isomerenauftrennung bei gleichzeitiger Verlängerung der Gesamtmessdauer resultierte. Wir variierten das Mischverhältnis weiter, bis wir mit 98:2 ein Verhältnis von Hexan zu tertiärem Butylmethylether erreichten, bei welchem alle Peaks einwandfrei von der Baseline zu trennen waren und dabei nur noch geringe Überlappung zeigten (Abb. 3.3.)

Abbildung 3.3.**Mischverhältnis 98:2****Tabelle 3.1.**

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit (min)</u>	<u>Menge (%)</u>
unbekannt	7,76	0,2
7,13-dicis	8,30	0,17
11,13-dicis	9,18	0,59
13-cis	9,65	15,73
9,13-dicis	10,44	2,71
11-cis	10,80	7,51
9-cis	12,10	18,93
7,9-dicis	14,05	6,29
all-trans-Retinal	16,46	47,86

Zur Probe, ob sich eine weitere Messoptimierung erreichen ließ, variierten wir anschließend noch die jeweils konstante Flussgeschwindigkeit (1,0; 1,5; 3,0 ml/min), was allerdings lediglich Einfluss auf die Gesamtmessdauer hatte und ohne Auswirkung auf die Trennleistung blieb.

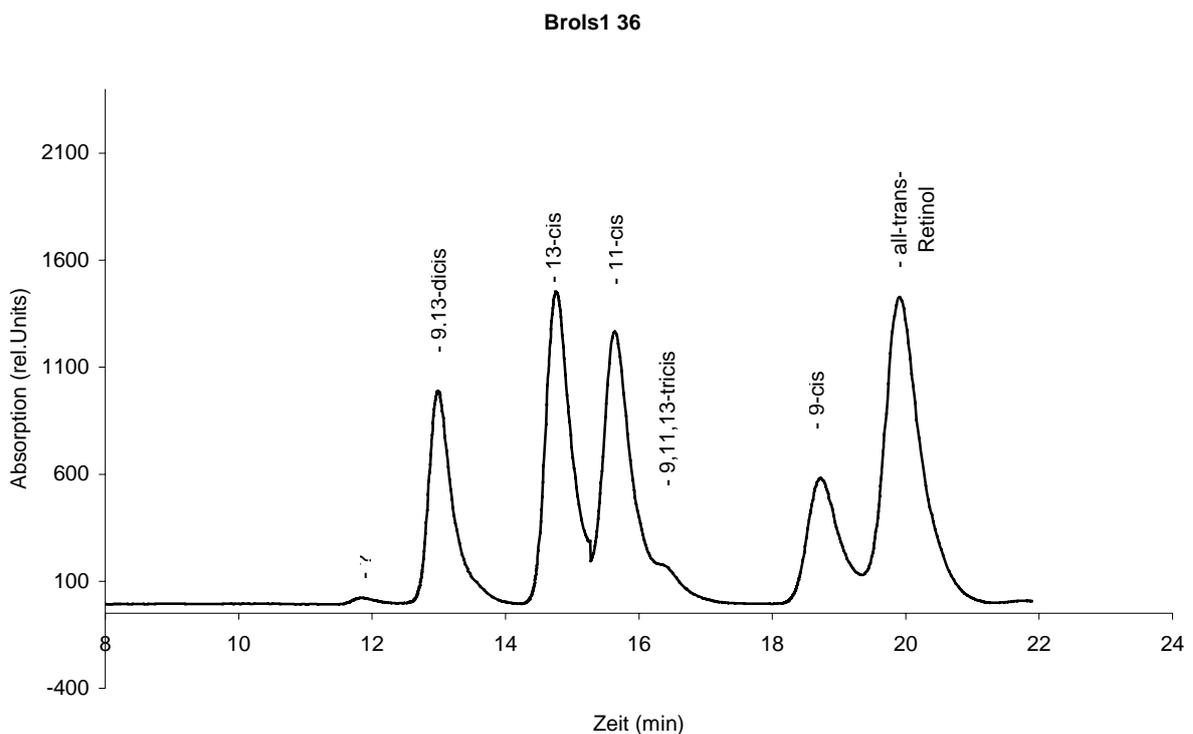
Die schon von BESLER mit Hilfe unserer HPLC-Anlage nachgewiesenen Isomeren konnten sämtlich von uns ebenfalls in gleicher Qualität bei übereinstimmenden Messbedingungen dargestellt werden.

Als nächsten Schritt führten wir analog zu den Retinalmessungen auch Versuche mit Retinol durch, um auch hier Vergleichsmaßstäbe für die künftigen Messreihen unter Verwendung von Heptan als Haupteluenten zu haben. Hier ergab sich bei einem Flow von 3,5 ml/min und einer Messwellenlänge von 325 nm ein ideales Mischverhältnis von 90 : 10 Hexan / t-BME für ein optimales Auftrennen der Einzelisomere bzw. deren Peaks. Für die Messungen wandelten wir belichtetes Probenmaterial der Retinalmessreihen gemäß dem schon beschriebenen Verfahren in die Alkoholform um und führten unsere Messreihen durch.

Als Standardchromatogramm sei hier eine Trifluorethanolbelichtung wiedergegeben (Abb. 3.4.). Abschließend führten wir noch einige Versuch zur Cochromatografie von isolierten Isomeren (13-cis und 11-cis) mit den Isomerengemischen durch, um einen Anhaltspunkt für die benötigten Mengen an Probenmaterial zu erhalten, welche zum chromatografischen Nachweis benötigt werden.

Abb. 3.4.

Retinolisomerentrennung mit Hexan; Flow 3,5 ml/min, 90:10 Hexan / t-BME; $\lambda=325$ nm



3.2. Messungen mit dem Lösungsmittel Heptan

3.2.1 Retinolmessungen

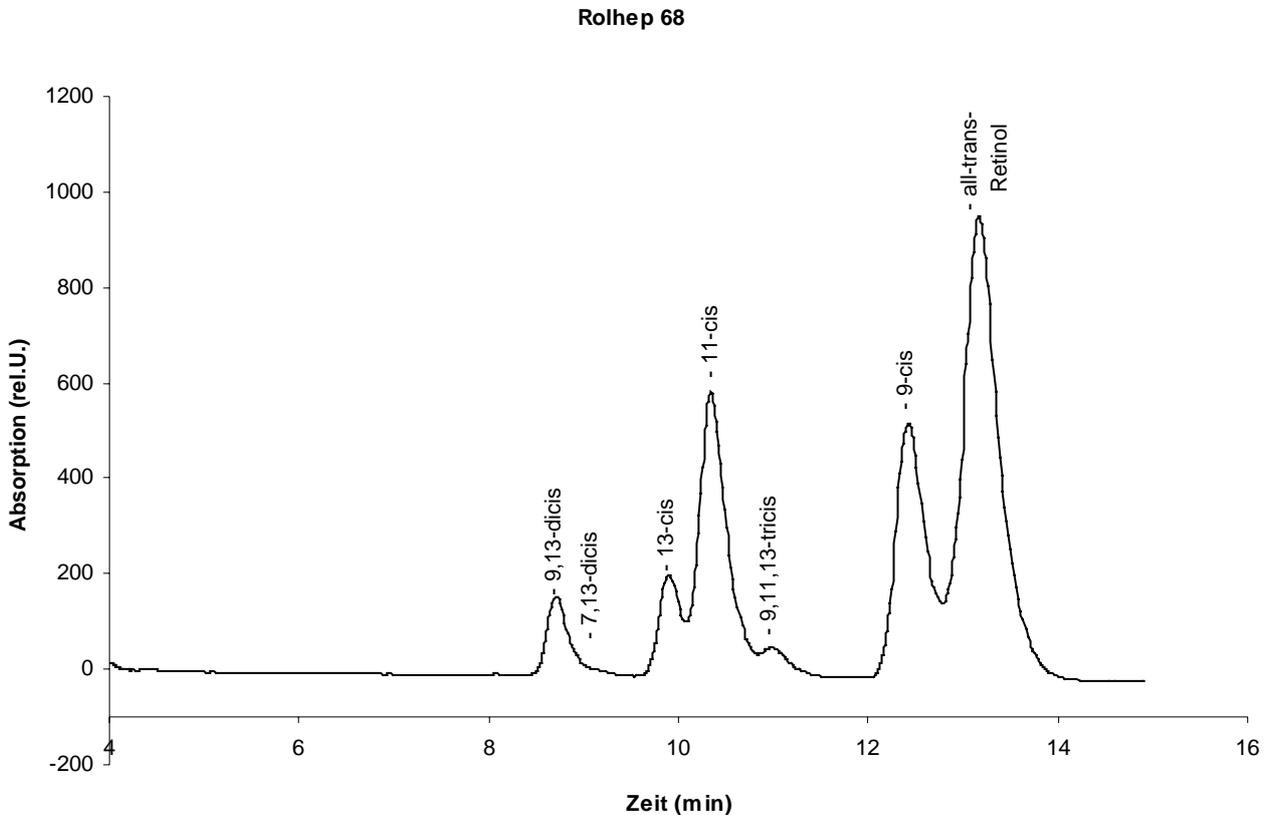
Nach Umstellung unserer Anlage auf ein Lösungsmittelgemisch von Heptan und tertiärem Butylmethylether begann nun unsere eigentliche Arbeit an der Aufgabenstellung. Nach einem Einfahren der Anlage mit einem Verhältnis von 87 : 13 (Heptan / t-BME) über mehrere Stunden war schließlich eine gerade Baseline erreicht, sodass wir mit Probemessungen beginnen konnten. Zunächst führten wir eine Messreihe unter o.g. Bedingungen durch, unter Verwendung einer Probe, welche bereits unter Hexan als Haupteluenten durchgemessen wurde, es handelte sich um eine für 40 min unter Weißlicht in Ethanol belichtete und anschließend in Retinol umgewandelte Retinalprobe. Bei sonst identischen Bedingungen für Messempfindlichkeit und -wellenlänge ergab sich ein gutes Ausgangsergebnis.

Es zeigte sich jedoch, dass durch das Mischverhältnis eine zu schnelle Elution und ein Überlagern der Peaks zustande kam. Dementsprechend änderten wir das Mischverhältnis in Prozentschritten zugunsten des Heptans (88:12 ; 89:11 ; 90:10). Den vorgewählten Flow von 2,0 ml/min änderten wir zunächst nicht.

Obwohl zur Erreichung optimaler Messungen unter Hexan wesentlich höhere Geschwindigkeiten notwendig waren, waren mit Heptan bereits bei diesem Fluss kurze Laufzeiten mit guten Trennleistungen möglich. Jedoch lagen die Drucke unter 2,0 ml/min Heptangemisch mit bis zu 140 bar vor der Säule wesentlich höher als beim Hexan, sodass wir auch aus Gründen der Materialschonung bezogen auf Pumpe und Säule auf höhere Geschwindigkeiten verzichteten. Bei einem Verhältnis von 90 : 10 Heptan / t-BME war dann eine Trennleistung erreicht, welche es ermöglichte, alle eluierten Peaks von einander bis zur Baseline hin zu differenzieren und dabei nur noch eine geringgradige Überlappung im Bereich der 9-cis und all-trans-Retinol-Peaks nachzuweisen war. In einem Mischbereich von 92 : 8 und darunter nahm diese Überlappung wieder zu, eine weitere Verbesserung der Trennleistung war nicht nachweisbar (ROLHEP1 Sample 79ff.). Somit war ein Standardverfahren mit Referenzchromatogrammen für weitere Untersuchungen zu den Retinolisomeren geschaffen. Wiedergegeben sei an dieser Stelle ein Chromatogramm unter den vorgegebenen Bedingungen.

Abbildung 3.5.

„Optimale Trennung“ der Retinolisomeren mit Heptan; 2,0 ml/min; 92:8 Heptan / t-BME

**3.2.2. Retinalmessungen**

Analog zu den beschriebenen Retinolmessungen führten wir im Anschluss hieran Experimente zur Messleistung hinsichtlich der Retinalisomeren durch. Dazu verwendeten wir, ähnlich den Versuchen zum Retinol, bereits unter Hexan durchgemessenes Probenmaterial. Als Flow wählten wir eine Geschwindigkeit von 2,0 ml / min vor.

Beginnend mit einem Mischungsverhältnis von Heptan zu tertiärem Ether von 90 : 10 korrigierten wir nach ersten Messungen (RALHEPT 1 Nr.1 - 3) zugunsten des Heptans auf 98 : 2. Damit war bei einem konstanten Druck von ~ 110 bar vor der Säule bereits eine optimale Auftrennung der Retinalisomeren erreicht, alle Peaks waren voneinander getrennt eluiert und bis zur Baseline abgrenzbar (RALHEPT 1 Nr. 5 - 10).

Eine weitere Reduktion des Etheranteils oder Veränderungen der Pumpgeschwindigkeit brachten keine Verbesserung der Trennleistung mehr, auch lag die Dauer der Einzelmessung bei den von uns im weiteren als Standard verwendeten Messparametern mit durchschnittlich 18 Minuten in akzeptablen Grenzen. Als Standardchromatogramm sei hier eine Messung mit in 2,2,2-Trifluorethanol belichtetem Retinal wiedergegeben, aus welchem auch die Elutionszeiten hervorgehen. Die Messung erfolgte bei einem Flow von 2,0 ml/min; Mischverhältnis 98:2 Heptan / t-BME.

Abbildung 3.6.

“Optimale” Trennung der Retinalisomeren; 2,0 ml/min; 98:2 Heptan / t-BME

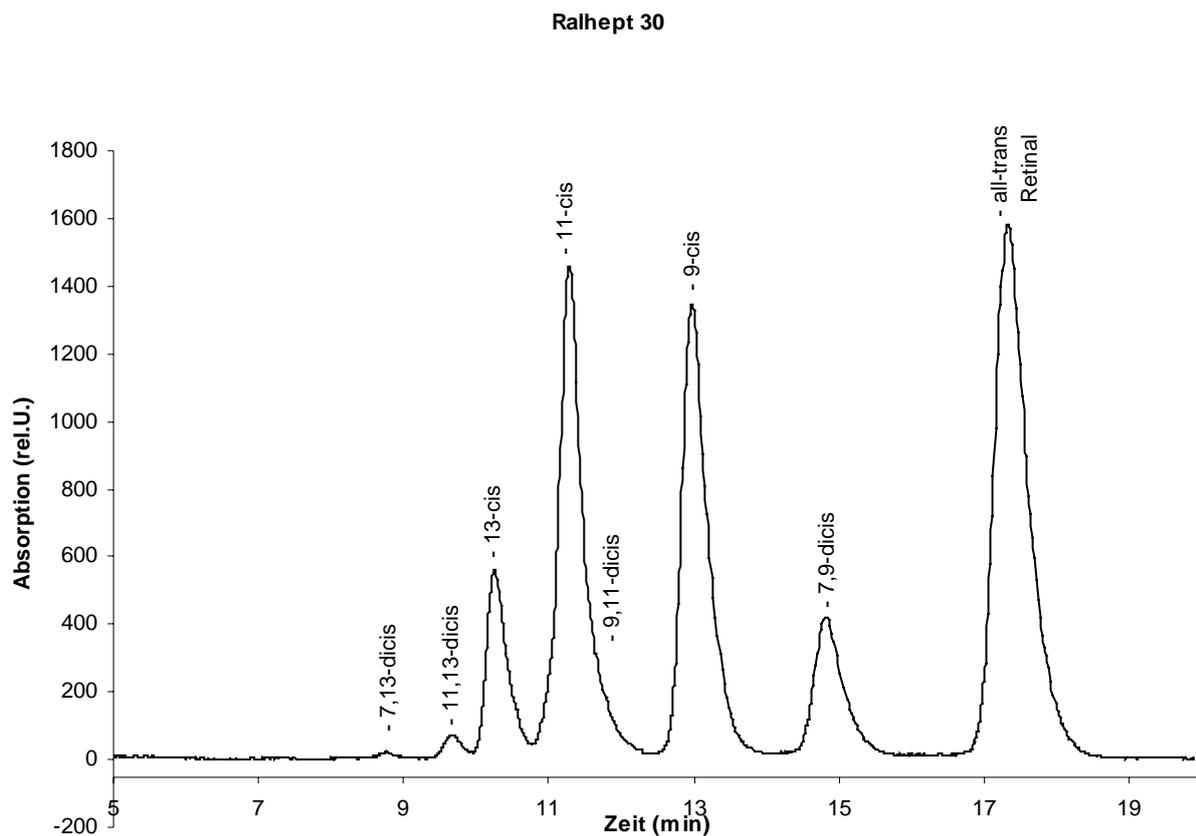


Tabelle 3.2.

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit (min)</u>	<u>Menge (%)</u>
7,13-dicis	8,81	0,09
11,13-dicis	9,70	0,18
13-cis	10,27	6,37
11-cis	10,89	22,01
9,11-dicis	11,48	2,14
9-cis	12,77	19,81
7,9-dicis	14,51	6,27
all-trans	16,76	42,90

3. 2. 3. Vergleiche mehrerer Proben unter verschiedenen Belichtungszeiten und Lösungsmitteln

Die nächsten Messreihen beschäftigten sich mit der quantitativen Ausbeute an Isomeren durch Belichtung von all-trans-Retinal unter Weißlicht in verschiedenen Lösungsmitteln. Hierzu stellten wir uns, wie schon vorher beschrieben, genügend große Probenmengen zur Belichtung in Ethanol, 2,2,2-Trifluorethanol und Acetonitril her. Wir belichteten, analog zu den Hexanmessungen, für 20, 40, 60 und 120 Minuten unter 60 Watt Weißlicht. Im weiteren werden nun die Einzelergebnisse dargestellt.

3.2.3.1 Ethanolbelichtungen

Die originale Probe von all-trans-Retinal, welche wir unseren Messungen zugrunde legten, enthielt 99 % all-trans-Retinal und 1 % 13-cis Retinal (RALHEPT 1 Nr.13). Bei der Belichtung von Retinal in Ethanol entstanden nach 20 Minuten die Isomeren 13-cis, 11-cis, 9-cis und 7,9-dicis-Retinal (in Reihenfolge ihrer Elution) bei weiterhin vorhandenem all-trans-Retinal (RALHEPT 1 Nr. 8). Bei längerdauernder Belichtung veränderten sich die Verhältnisse der Isomeren zueinander. Während die Mengen an entstandenem 13-cis und 7,9-dicis-Retinal annähernd gleich blieben, nahm der Anteil an 11-cis und all-trans-Retinal linear ab. Die Menge an 9-cis Retinal nahm mit längerer Belichtungszeit zunächst zu, erreichte bei 60 Minuten einen Höhepunkt und nahm dann wieder kontinuierlich ab (RALHEPT 1 Nr. 21-24). Hierzu siehe auch die dazugehörige Grafik. Versuche mit kürzeren Belichtungszeiten (1, 5 und 10 Minuten) erbrachten die gleiche Isomerenkonstellation wie die Probe nach 20 Minuten.

Abbildung 3.7.

Messbedingungen: Flow 2,0 ml/min, Mischung 98:2 Heptan / t-BME,

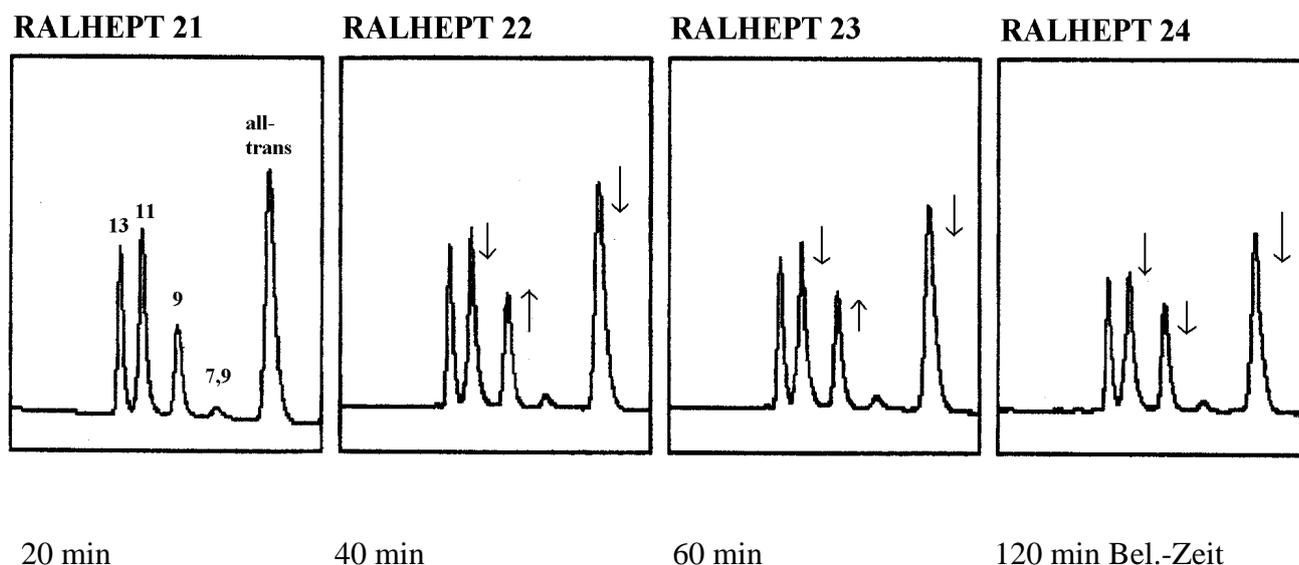


Tabelle 3.3.

<u>Name</u>	<u>Ret.(min)</u>	<u>Menge (%)</u> :	<u>20 min</u>	<u>40 min</u>	<u>60min</u>	<u>120 min</u>
			<i>Ralhept21</i>	<i>Ralhept22</i>	<i>Ralhept23</i>	<i>Ralhept 24</i>
13-cis	10,25		17,40	17,31	17,09	16,84
11-cis	11,30		23,80	24,86	24,85	24,90
9-cis	13,00		12,37	15,72	17,00	16,34
7,9-dicis	14,85		1,09	1,38	1,52	1,69
all-trans-Retinal	17,40		44,52	40,49	38,21	37,05

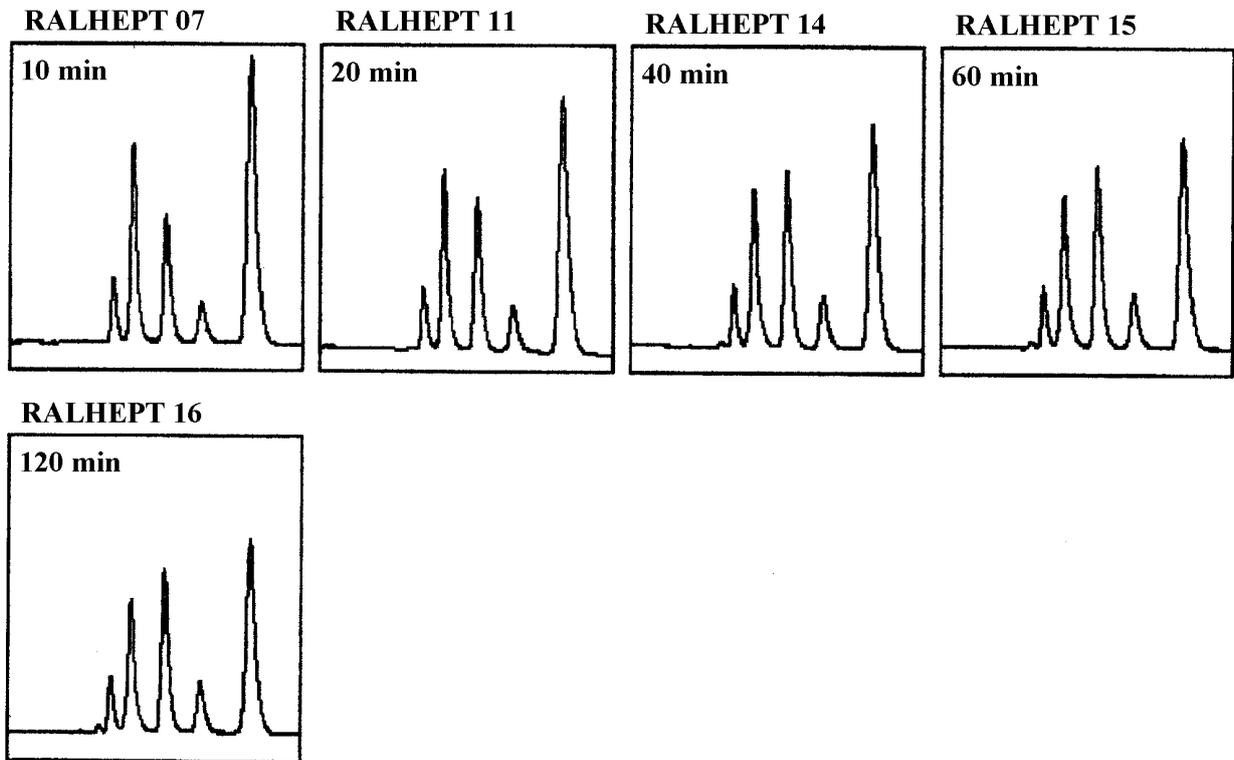
Die durchgeführten Messreihen waren in ihrer Qualität durchweg mit den bereits früher in unserem Labor angefertigten Messungen mit Hexan als Haupteluent (Besler 1994) vergleichbar.

Alle unter Hexan nachweisbaren Isomeren nach Ethanolbelichtung des Retinals konnten in gleicher Form nachgewiesen werden, eine wesentliche Verbesserung in Qualität und Quantität war nicht erkennbar.

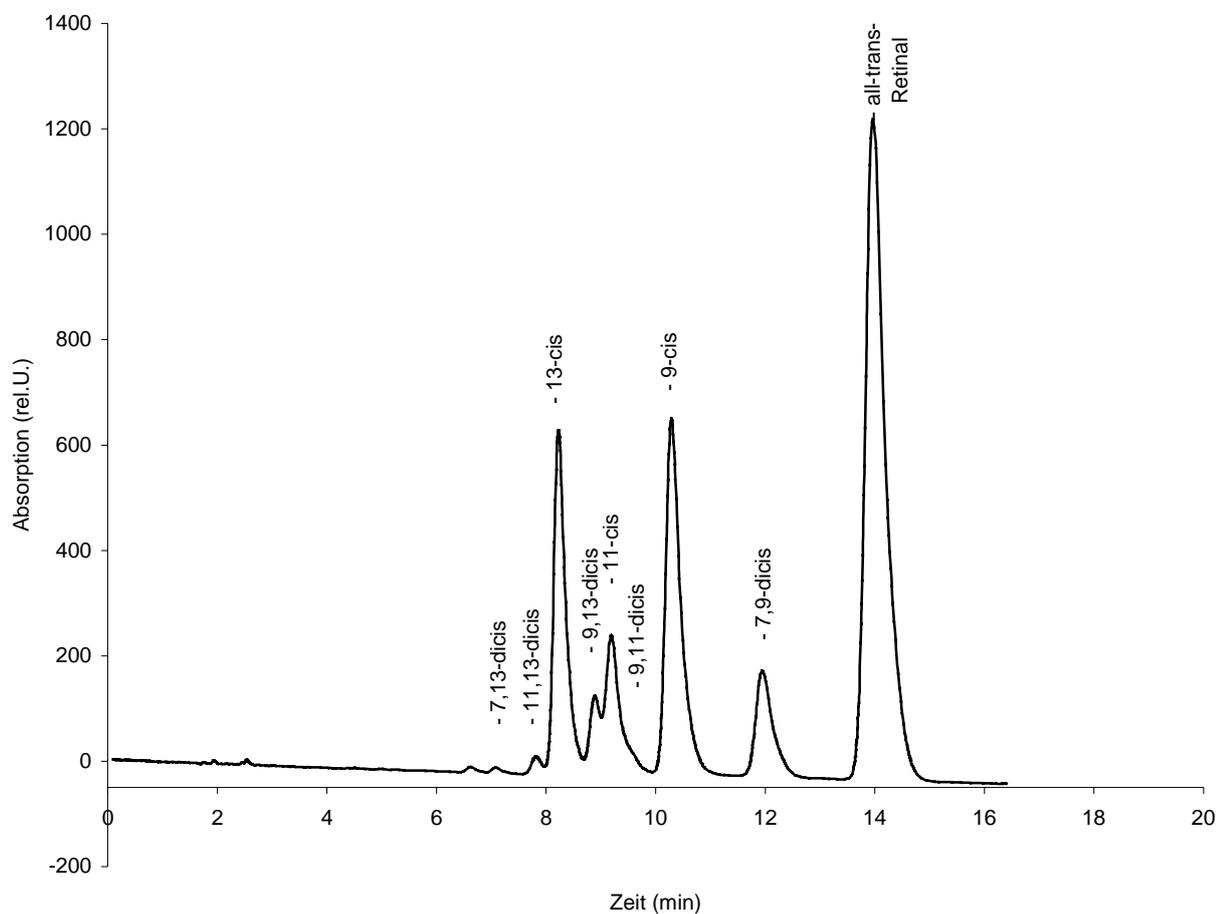
3.2.3.2 2,2,2-Trifluorethanolbelichtungen

Die nächsten Messungen beschäftigten sich mit den in 2,2,2-Trifluorethanol entstehenden Retinalisomeren. Wir belichteten auch hier für 10, 20, 40, 60 und 120 Minuten. Wesentlicher Unterschied zu den Ethanolbelichtungen waren die schon nach 20 Minuten vorhandenen dicis- und tricis-Isomeren (s.Tabelle) und die größere quantitative Ausbeute an Isomeren.

Der Anteil von entstandenem 11-cis, 9-cis und 7,9-dicis war von Anfang an höher, im Vergleich über die Belichtungszeiten war das Verhalten der Isomeren identisch zum Ethanol. Die dicis- und tricis-Isomeren in den belichteten Proben waren teilweise instabil und somit nur kurzfristig nachweisbar (RALHEPT 1 Nr. 7, sowie 11-16; Belichtung 10, 20, 40, 60, 120 min.).

Abbildung 3.8.***Vergleichende Darstellung der Trifluorethanolbelichtungen***

Die Darstellung der dicis- und tricis-Isomeren des Retinals gelang nach 2,2,2-Trifluorethanolbelichtung am besten nach einer Belichtungszeit von 20 min unter Weißlicht. Auch hierbei gab es gegenüber den Hexanbedingungen keine wesentliche qualitative Verbesserung.

Abbildung 3.9.***RALHEPT 24; Retinalisomeren; Trifluorethanolbelichtung (20 min)*****Tabelle 3.4.**

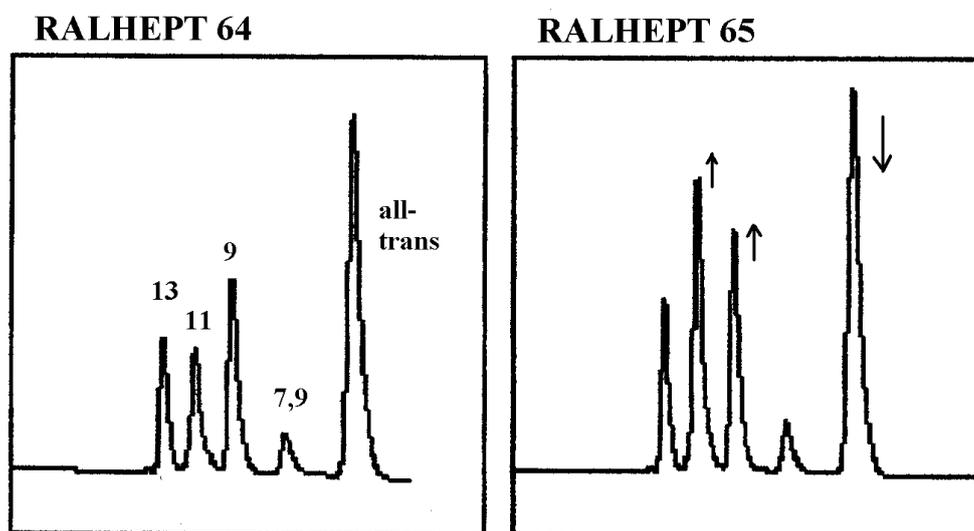
<u>Name</u>	<u>Ret.-Zeit (min)</u>	<u>Menge (%) (20 min)</u>
7,13-dicis	7,14	0,14
11,13-dicis	7,79	1,02
13-cis	8,08	16,41
9,11,13-tricis	8,77	0,27
9,13-dicis	8,84	3,28
11-cis	9,01	6,71
9,11-dicis	9,42	1,91
9-cis	10,04	17,22
7,9-dicis	11,69	8,84
all-trans-Retinal	15,75	44,9

3.2.3.3 Acetonitrilbelichtungen

In Ergänzung zu den bisherigen Messungen führten wir eine Reihe von Experimenten mit in Acetonitril belichteten Proben durch. Durch Hinweise in der Literatur ergab sich, dass bei der Verwendung von Acetonitril neben den bereits aufgezeigten Isomeren auch geringe Anteile von 7-cis-Retinal entstehen. Daneben wurde auch die Ausbeute an weiteren, teilweise instabilen Isomeren, als relativ groß angegeben.

Wir belichteten all-trans-Retinal für 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60 und 120 Minuten in Acetonitril und führten unsere HPLC-Messungen durch. Tatsächlich war zwischen den Peaks für 7,9-dicis und all-trans-Retinal ein bisher bei uns noch nicht nachgewiesener Peak darstellbar, welcher über die Literaturvorgabe als 7-cis-Retinal anzusprechen war. Der Darstellung und Identifikation dieses Peaks ist ein eigenes Kapitel gewidmet, auf welches an dieser Stelle verwiesen werden darf. Die übrige Ausbeute an Isomeren war nahezu identisch zu den Trifluorethanolmessungen. In der Abbildung sind Acetonitrilbelichtungen für 20 und 40 min. wiedergegeben, Messung bei 2,0 ml/min, Mischung 98:2 (RALHEPT 64 und 65).

Abbildung 3.10.



3.2.4. Identifikation der Retinalisomeren

Abschließend führten wir noch Messungen zur Identifikation der einzelnen Isomeren durch. Obwohl die gewonnenen Chromatogramme im wesentlichen den unter Hexan als Laufmittel erstellten entsprachen, nutzten wir die in unserem Labor vorrätigen Industrieproben an 13-cis, 11-cis und 9-cis-Retinal zur Identifikation, Proben von 7,9-dicis und 11,13-dicis Retinal standen ebenfalls zur Verfügung, hierbei handelte es sich um Restbestände aus vorangegangenen gemeinsamen Forschungsprojekten mit dem Kernforschungszentrum in Jülich. Im weiteren gelang es schließlich, alle gefundenen Isomeren in Cochromatografien zweifelsfrei zu identifizieren. Im einzelnen: 13-cis (Sample 39), 11-cis (Sample 40), 9-cis (Sample 42) und 7,9-dicis (Sample 43). Hierzu auch die grafische Darstellung.

Abbildung 3.11.

Cochromatografie 13-cis Retinal

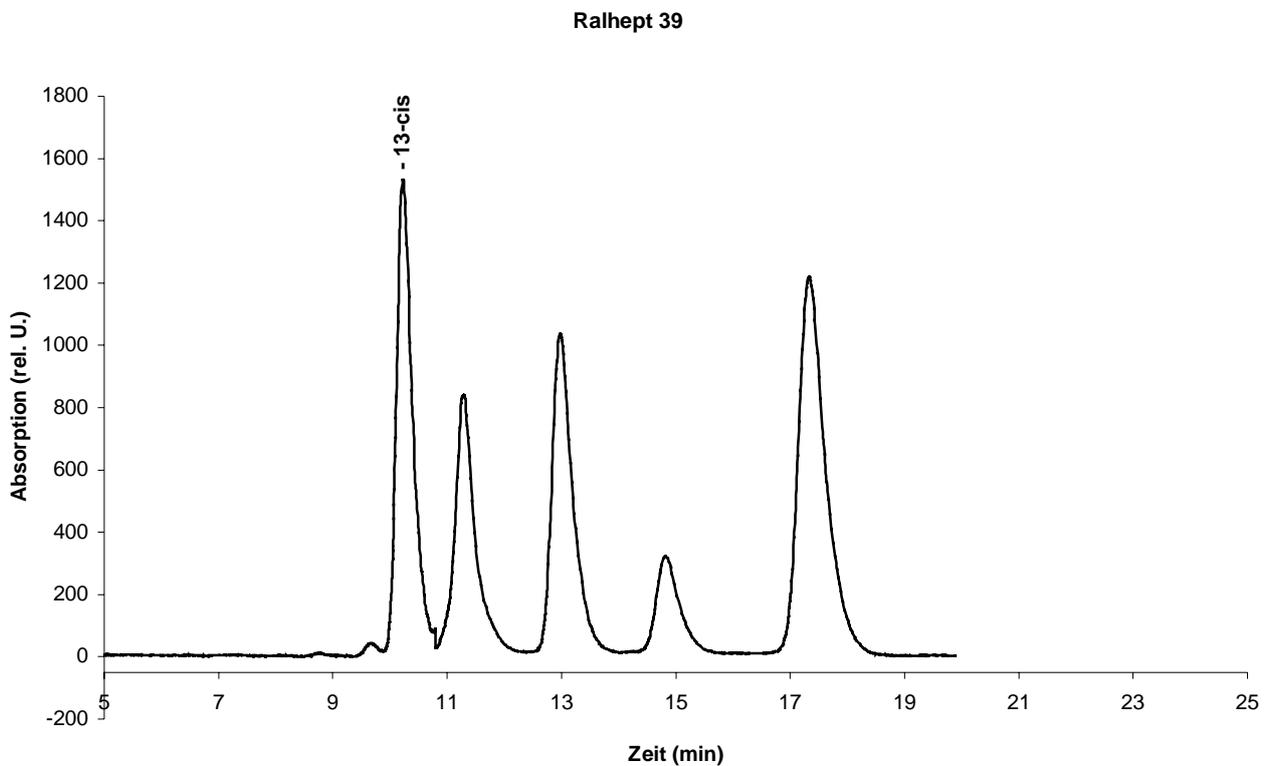


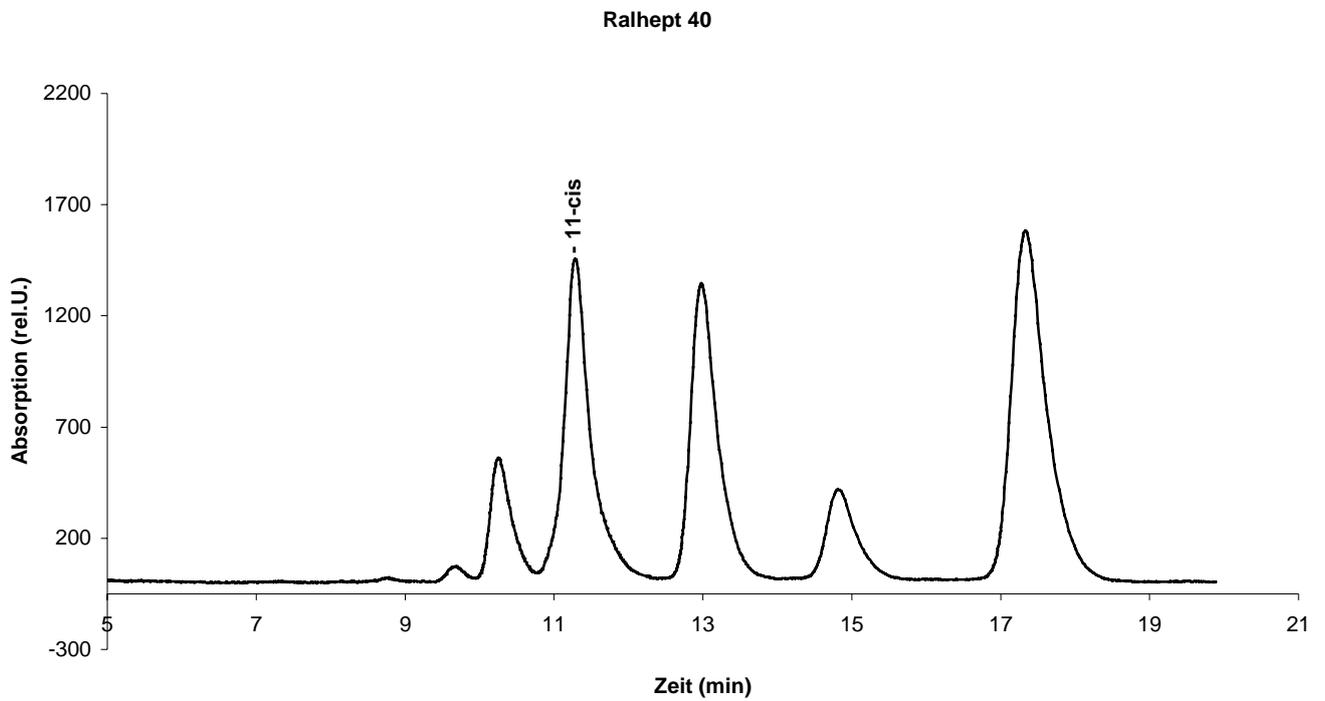
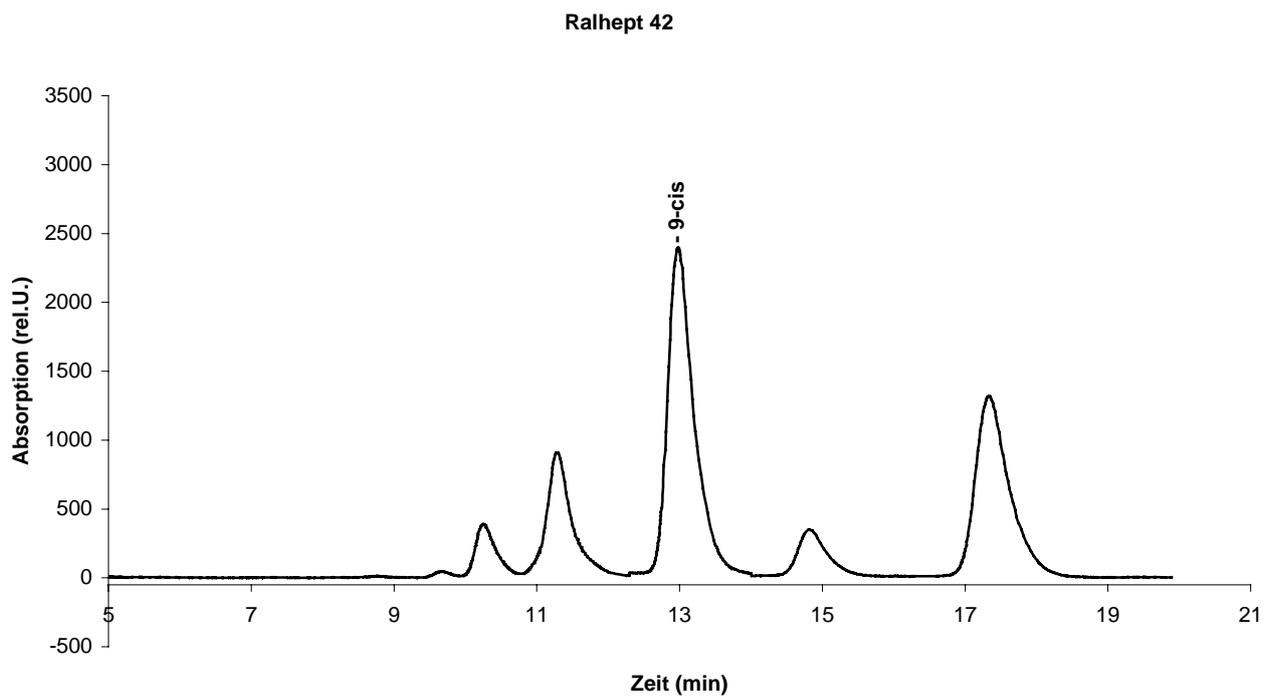
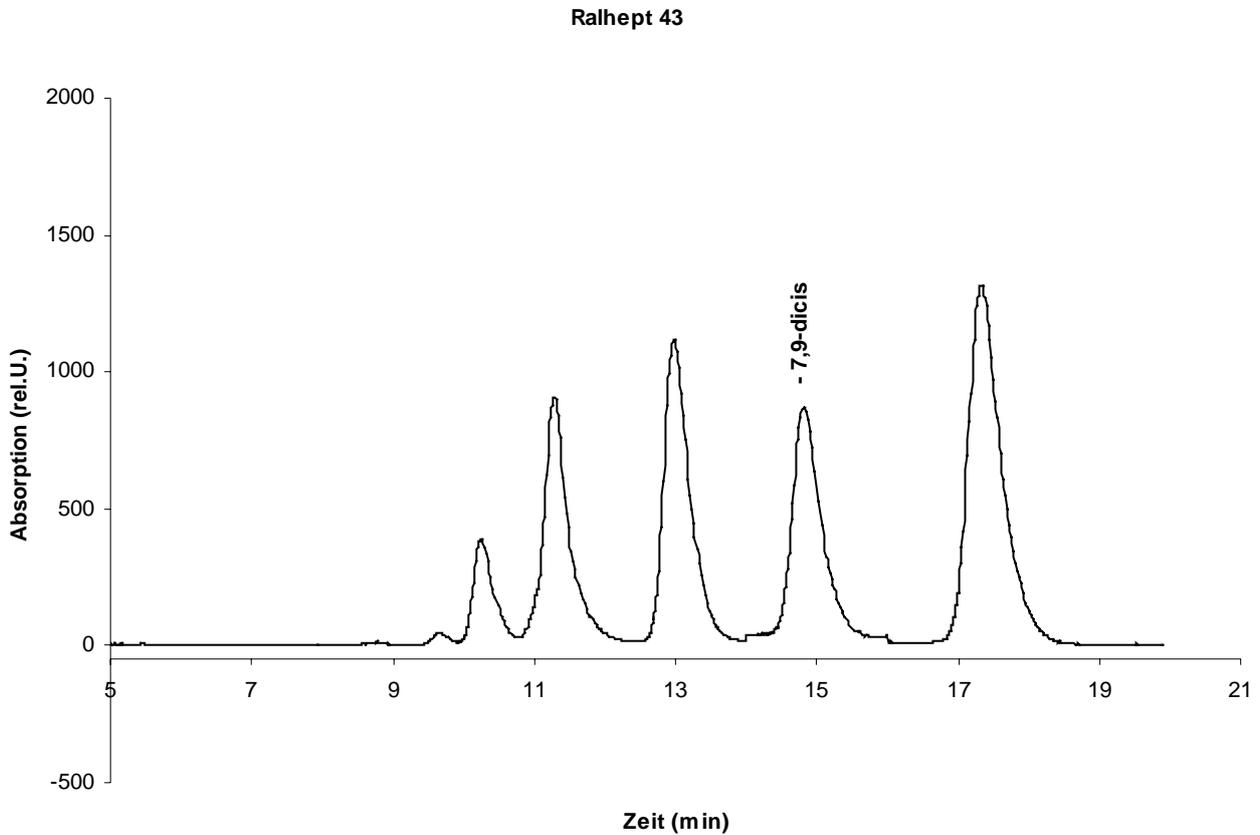
Abb. 3.12.***CoChromatografie 11-cis Retinal*****Abb. 3.13.*****Cochromatografie 9-cis Retinal***

Abb. 3.14.***CoChromatografie 7,9-dicis Retinal*****3.2.5. Retinolmessungen**

Als nächster Schritt erfolgten Messungen zum Retinol und seinen Isomeren. Wie im Kapitel Isomerenherstellung beschrieben, wandelten wir belichtete Retinalproben (in Ethanol und 2,2,2-Trifluorethanol belichtet) in die Retinolform um. An Isomeren waren nachweisbar 9,13-dicis, 13-cis, 11-cis, 9,11-dicis, 9-cis und all-trans-Retinol. Die quantitative Ausbeute je nach Belichtungsdauer ist im folgenden tabellarisch aufgeführt für Trifluorethanol (ROLHEPT 1 Nr. 66-76).

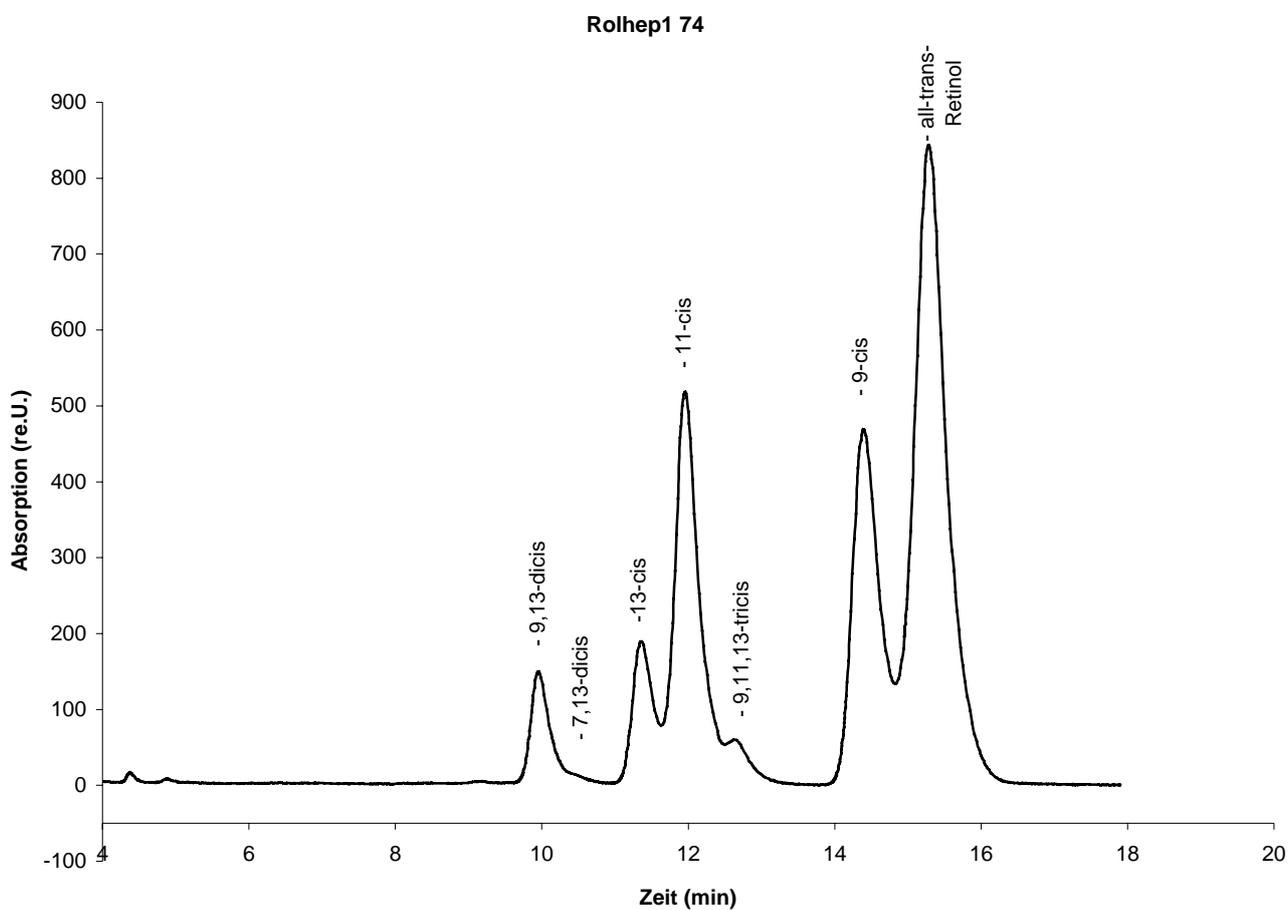
Tabelle 3.5.

<u>Name</u>	<u>(min)</u>	<u>Menge(%):</u>	<u>20 min</u>	<u>40 min</u>	<u>60 min</u>	<u>120 min</u>
9,13-dicis	8,55		4,06	4,17	4,87	7,57
13-cis	9,70		6,19	7,13	9,60	15,92
11-cis	10,09		21,94	22,09	22,85	23,68
9,11,13-tricis	10,75		0,78	1,74	2,11	2,93
9-cis	12,10		20,44	19,83	18,56	12,04
all-trans Retinol	12,84		46,54	45,92	41,50	38,54

Beispielhaft für die Messqualität unter Heptan ist hier grafisch die Messung für 120 min Belichtungsdauer in Trifluorethanol dargestellt.

Abbildung 3.12.

Retinolisomeren aus 120 min Trifluorethanolbelichtung



Wesentlich bei diesen Messungen war die Tatsache, dass die Auftrennung der einzelnen Peaks im Vergleich zu den Hexanmessungen deutlich besser gelang, bei gleichzeitig zeitlich kürzeren Einzelmessungen und geringerem Lösungsmittelverbrauch. Die quantitative Ausbeute an Isomeren war nahezu identisch. Wie auch beim Retinal führten wir ergänzend Identifikationsmessungen mittels Cochromatografie durch (ROLHEP 1 Nr. 85-88 und ROLHEP 2 Nr. 7-10), um eine zweifelsfreie Benennung der einzelnen Peaks durchführen zu können. Dabei ging es uns auch noch einmal um die separate Darstellung von 7,9-dicis Retinol. Dieses Isomer konnte zusammen mit anderen Isomeren bislang nicht identifiziert werden. 7,9-dicis Retinol eluiert nahezu zeitgleich mit all-trans-Retinol, was wir bereits aus vorangegangenen Messungen mit Hexan wissen. Eine Verbesserung der Darstellbarkeit im Isomerengemisch unter Heptan als Eluent konnte nicht erreicht werden, weder durch Variation der Pumpengeschwindigkeit, noch unter Veränderung des Lösungsmittelgradienten. Die beste Darstellung ist hier als Grafik dargestellt.

Weitere Grafiken zeigen die Identifikation von 7,9-dicis, 9,13-dicis, 11-cis- und 13-cis Retinol mittels Cochromatografie.

Abbildung 3.15.

CoChromatografie 7,9-dicis Retinol

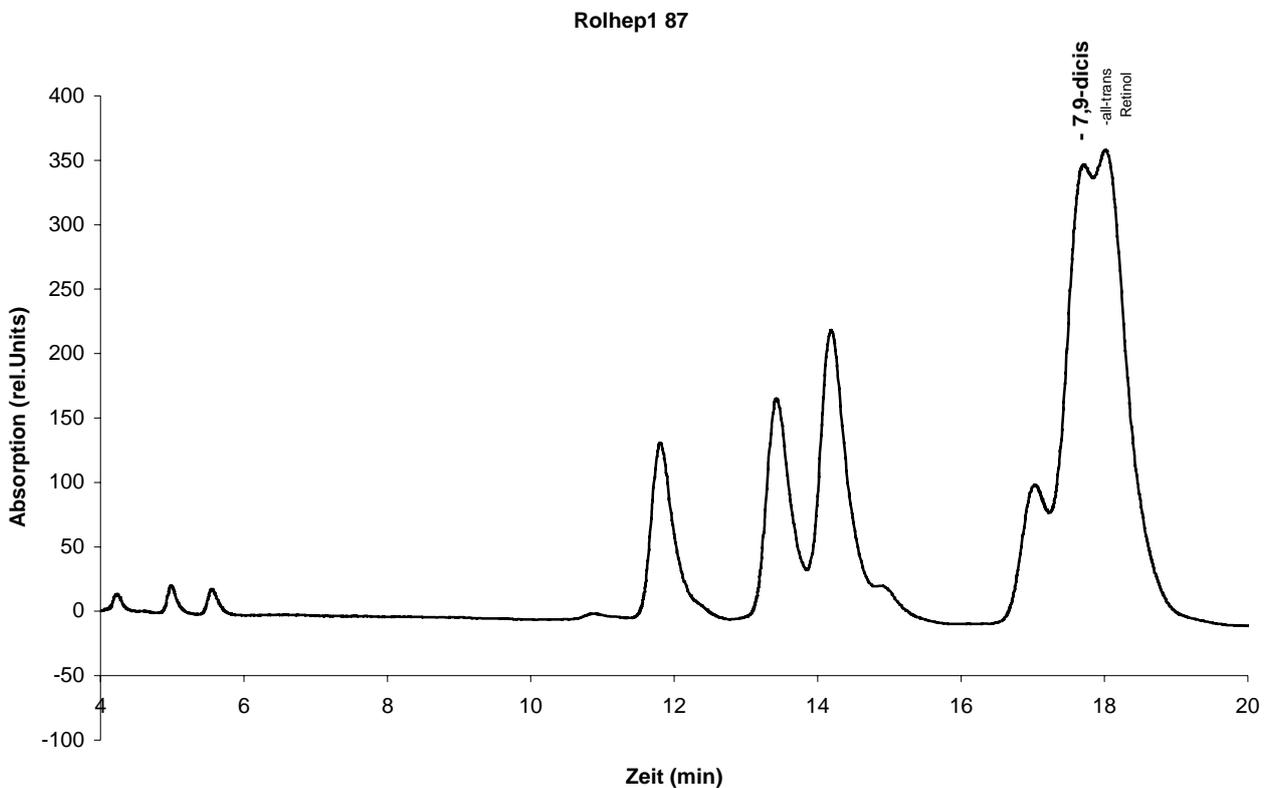


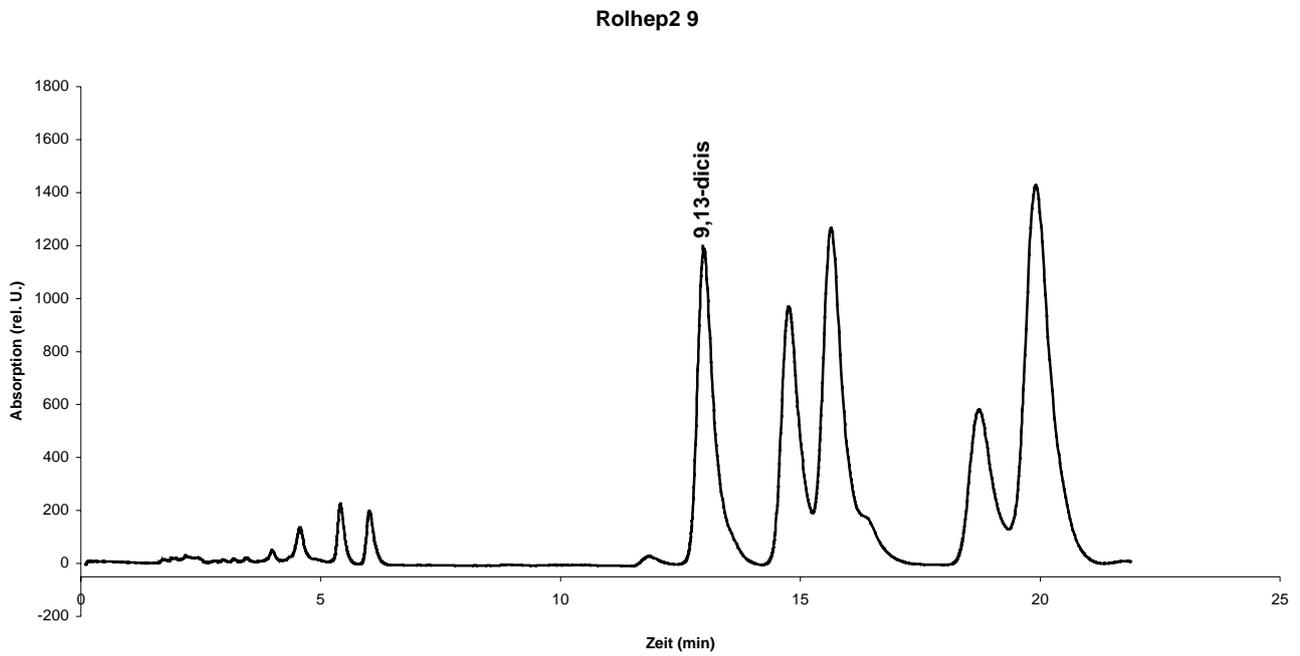
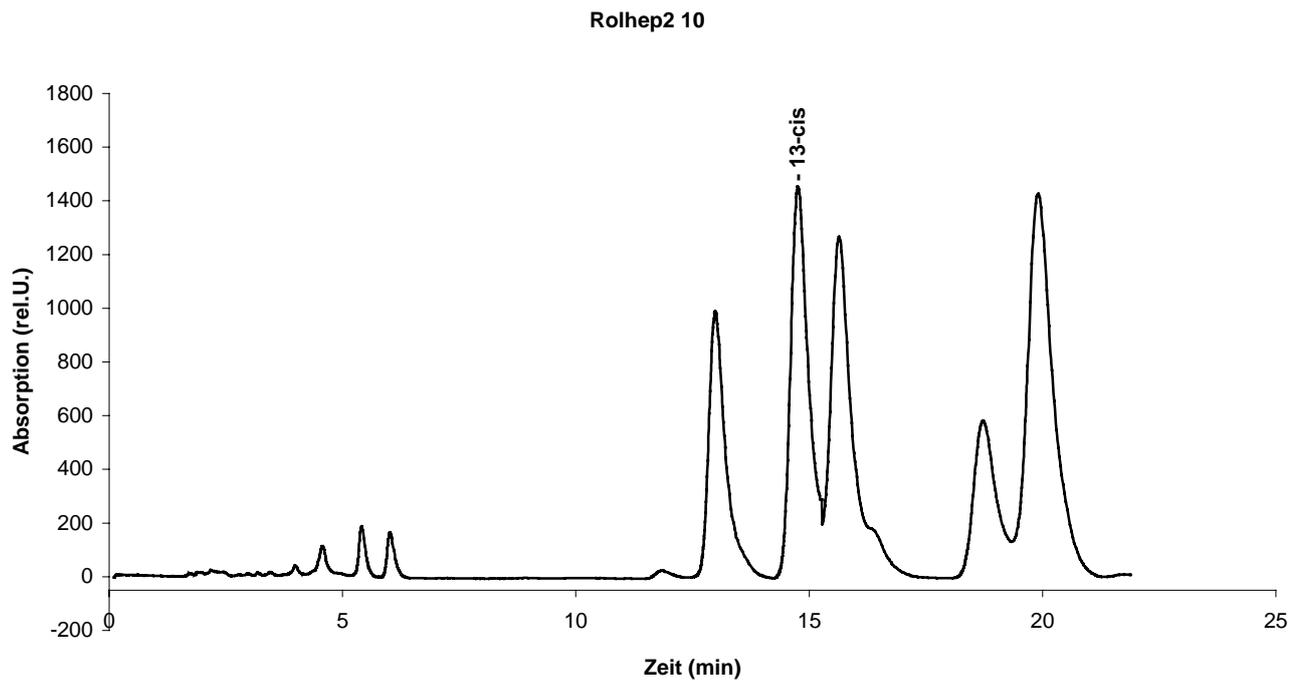
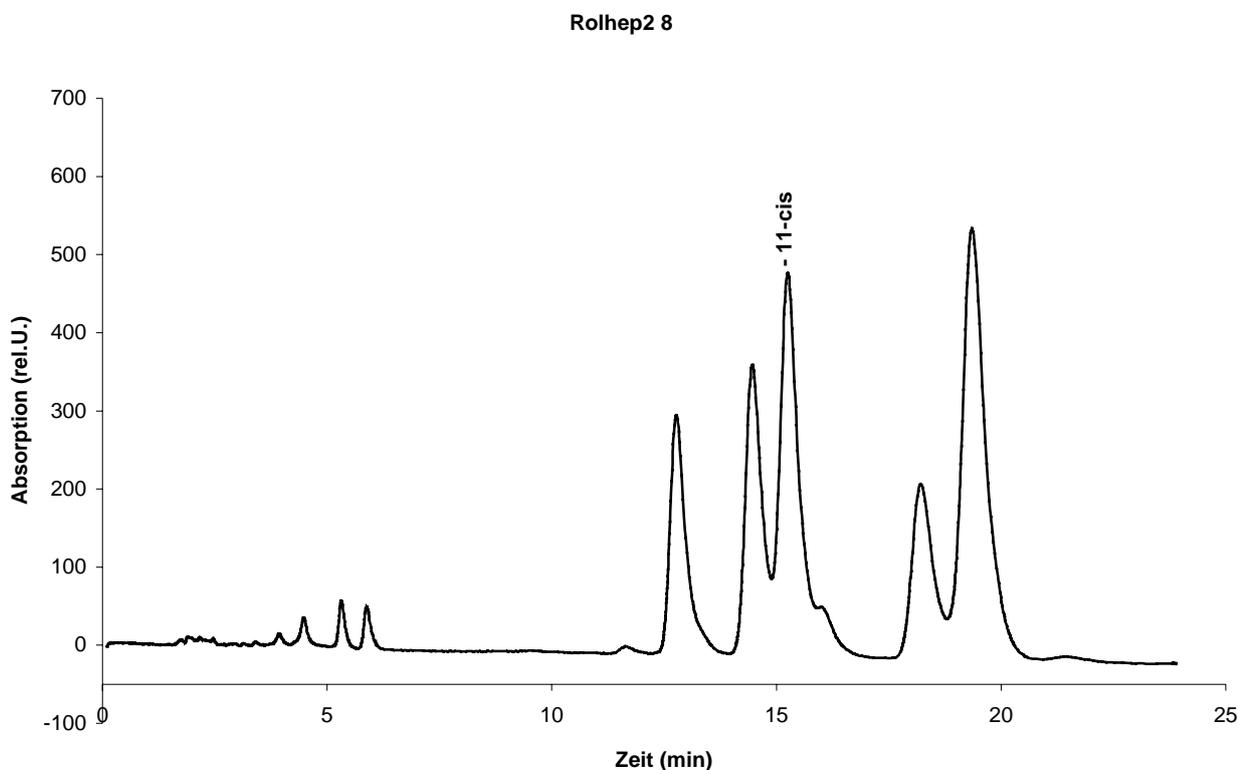
Abbildung 3.16.***CoChromatografie 9,13-dicis Retinol*****Abb. 3.17.*****CoChromatografie 13-cis Retinol***

Abb. 3.18.***CoChromatografie 11-cis Retinol*****3.3. Diskussion**

In unseren ersten Experimenten mit der neuen Laufmittelkonstellation Heptan / t-BME konnten die schon von unserer Gruppe vermuteten besseren Trennleistungen der HPLC in bezug auf Retinolisomere bestätigt werden. Im Vergleich mit den Messungen unter Hexan war die Einzeltrennung der im Gemisch vorhandenen Isomeren deutlich besser möglich und somit diese einer Mengenberechnung besser zugänglich. So konnten mit dem neuen Verfahren gerade die mengenmäßig großen Isomeren 11-cis, 13-cis und 9,13-dicis, wie auch 9-cis und all-trans ohne Überlappung dargestellt werden, was im Hinblick auf die Anwendung des Verfahrens auf Retina- und Pigmentepthelextrakte von Vorteil sein wird. Die quantitative Ausbeute an Isomeren, gerade in bezug auf dicis- und tricis-Isomeren blieb identisch.

Zum anderen brachte die Umstellung auf Heptan als Haupteluenten in der HPLC der Retinolisomeren den Vorteil, dass zum Erreichen besserer Ergebnisse im Vergleich zum Hexan der Lösungsmittelverbrauch und die Gesamtmessdauer wesentlich geringer waren. Zudem erwies sich der geringere Druck vor der Säule als ein materialschonender Nebeneffekt für Pumpe und Säule. Um genügend Vergleiche anstellen zu können, stellten wir im neuen Verfahren Isomergemische verschiedener Belichtungsstufen in unterschiedlichen Lösungsmitteln dar. Wir konnten damit auch eine hohe Kontinuität der Messbedingungen und die damit verbundene Regelmäßigkeit der grafischen Darstellungen belegen.

Bezüglich der Retinalisomeren konnte ein Vorteil der neuen Methode hinsichtlich der Trennleistung der HPLC nicht sicher nachgewiesen werden. Gegenüber den von uns durchgeführten Vergleichsmessungen unter Hexan und den bereits in unserem Labor durchgeführten Messreihen von BESLER schienen die Auftrennung und Differenzierung der einzelnen Peaks identisch gut zu sein. Zum Vergleich seien an dieser Stelle vergleichende Grafiken wiedergegeben.

Abbildung 3.19.

Retinalisomeren unter Hexan als Eluent

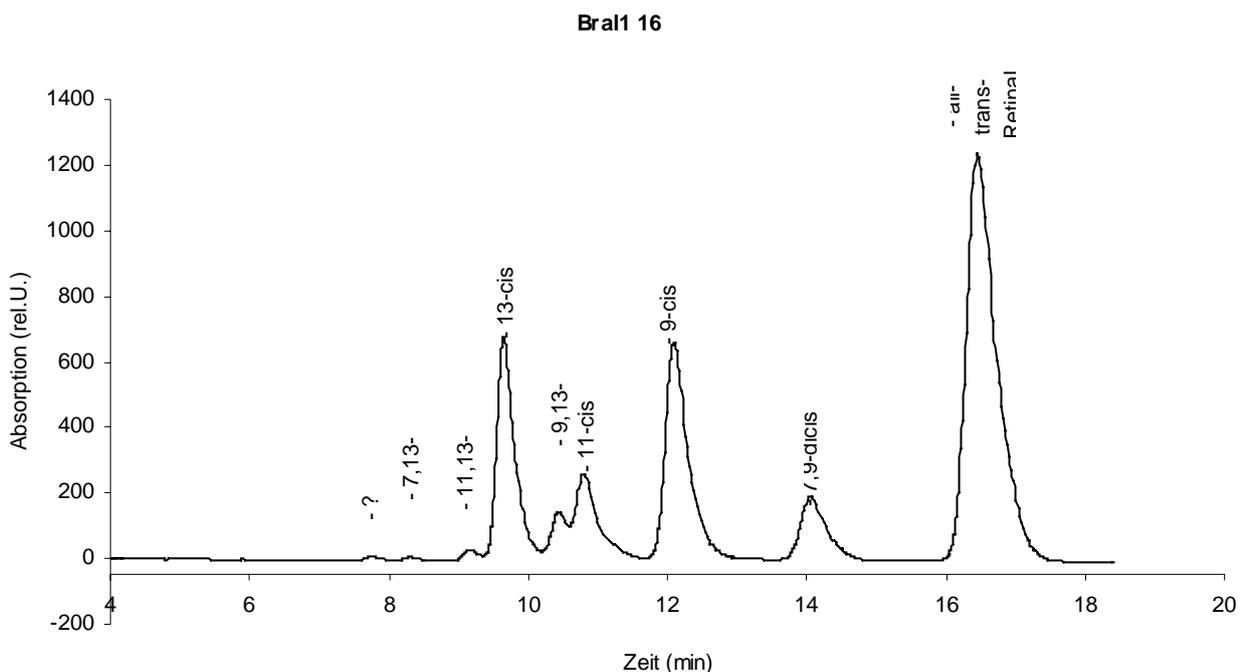
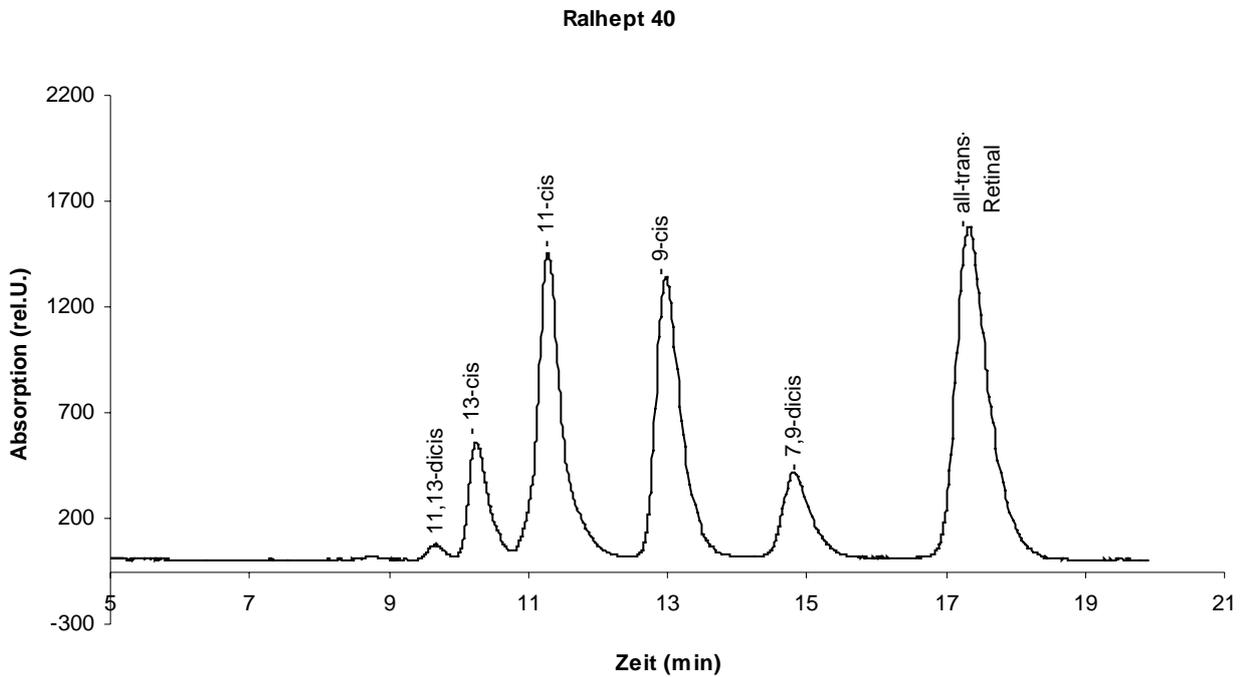


Abb. 3.20.

Retinalisomeren unter Heptan als Eluent

Wie schon erwähnt, lag der Hauptvorteil der neuen Methodik bei den Retinalmessungen in der Materialeinsparung während der Messungen. Die verwendete Lösungsmittelmenge war geringer und der Materialverschleiß der HPLC-Anlage konnte ebenfalls reduziert werden, da zum Erreichen gleich guter Ergebnisse ein wesentlich geringerer Druck auf der Hochdruckseite notwendig wurde. Auf einen weiteren Aspekt, nämlich die günstigere arbeitsmedizinische Situation, wird in einem gesonderten Kapitel noch näher eingegangen werden.

In Vorbereitung der Anwendungserprobung der neuen Messmethodik bei Retina- und Pigmentepithelproben erbrachten die durchgeführten Experimente Standardchromatogramme, welche uns als Referenz zur Isomerenidentifikation dienen würden. Dahingehend ist an dieser Stelle noch wichtig zu erwähnen, dass das Heptan-Ether-Gemisch durchweg für konstante Verhältnisse auf der Chromatographiesäule sorgte, insbesondere für einen sehr ruhigen Baselineverlauf, welcher beim Nachweis kleiner und kleinster Peaks unabdingbar ist.

4. Identifikation des 7-cis-Retinal-Isomers

4. 1. Einleitung

Während verschiedener Messungen von belichteten Retinalproben stießen wir im Rahmen des begleitenden Literaturstudiums auch auf das Lösungsmittel Acetonitril als Grundlage von Belichtungsversuchen. Um nun auch hier einen Vergleich zu unseren bisherigen Experimenten, wie zu den Messungen mit Hexan als Laufmittel zu bekommen, führten wir einige Belichtungsversuche durch. Dabei zeigte sich, dass Acetonitril als Lösungs- und Belichtungsmedium eine ähnlich hohe Ausbeute an Isomeren liefert wie das 2,2,2-Trifluorethanol, sowohl qualitativ, wie quantitativ.

Zu unserer Verwunderung allerdings konnte erstmalig bei unseren Messungen ein Peak dargestellt werden, der bei keiner der bisherigen Messungen mit in anderen Lösungsmitteln belichtetem all-trans-Retinal nachgewiesen werden konnte. Nach intensiver Literaturrecherche konnte dieser Peak dem 7-cis-Isomer zugeordnet werden. Im weiteren soll nun unsere Arbeit zur Identifikation des Isomers beschrieben werden.

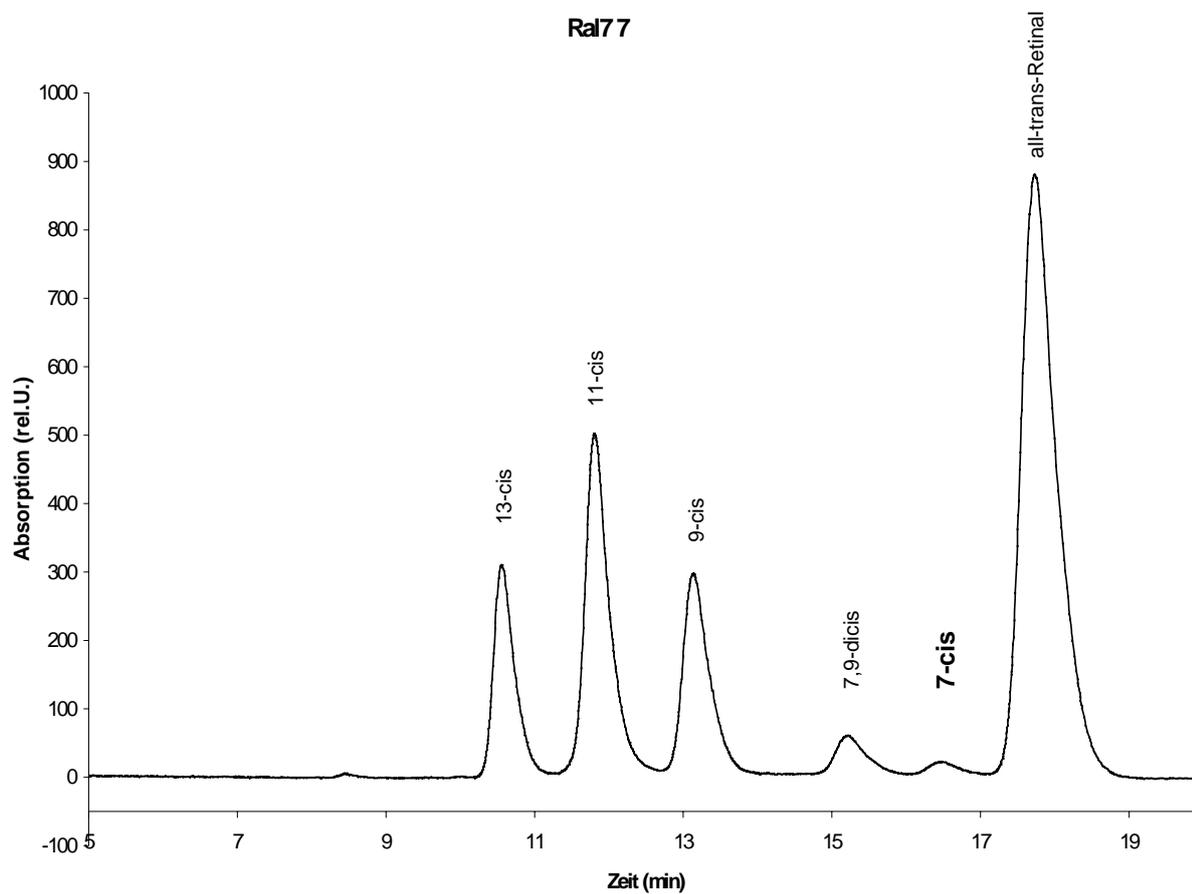
4. 2. Isomerengewinnung und Identifikation

Die Aufbereitung der Proben orientierte sich an den schon vorbeschriebenen Vorgehensweisen. Wir benutzen all-trans-Retinal, welches wir zu 20, 40, 60 und 120 Minuten in Acetonitril belichteten und dann zur Messung brachten (RAL 7 SMP. Samples 4 - 16). Wie schon vermutet, kam jetzt regelmäßig ein Peak bei 16,2 Minuten Laufzeit zur Darstellung, welchen wir nach Literaturvorlage (BESLER, 1994) als 7-cis-Retinal identifizierten.

Da nach mehreren HPLC-Läufen die Ausbeute an 7-cis-Retinal nach 120 Minuten Belichtungszeit am höchsten zu sein schien, fingen wir die 7-cis-Fraktion aus insgesamt acht Chromatogrammen ab und trockneten diese unter Stickstoffbegasung. Wiedergegeben sei an dieser Stelle Sample 7 unserer Messreihen.

Abbildung 4. 1.

7-cis Retinal aus Acetonitrilbelichtung; Flow 1,5 ml/min; 98:2 Heptan / t-BME; $\lambda=371\text{nm}$

**Tabelle 4. 1.**

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit (min)</u>	<u>Menge (%)</u>
13-cis	10,03	12,38
11-cis	11,80	19,32
9-cis	13,14	11,09
7,9-dicis	15,22	4,06
7-cis	16,24	0,80
all-trans Retinal	17,73	44,08

Anschließend resuspendierten wir unsere so aufgesammelte Probe und gaben diese mit einer 1:20 verdünnten und 120 Minuten in Acetonitril belichteten Probe mit allen Isomeren zur Coelution auf die Säule (RAL 7 , Samples 16 + 41; vgl. *Abbildung 3. 3.*).

Abbildung 4.2.

Coelution 7-cis mit Retinalisomeren aus Acetonitrilbelichtung

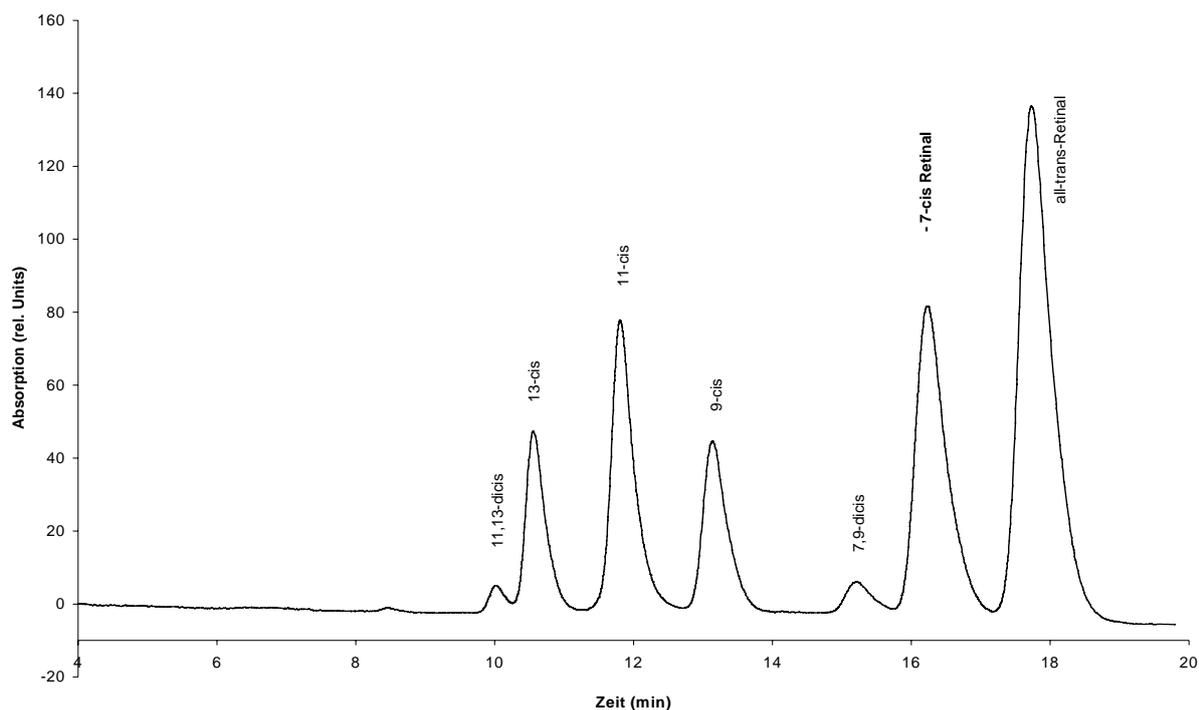


Tabelle 4. 2.

<u>Name</u>	<u>Retentionszeit(min)</u>	<u>Menge (%)</u>
11,13-dicis	10,03	0,70
13-cis	10,55	8,86
11-cis	11,80	15,92
9-cis	13,14	9,71
7,9-dicis	15,22	1,65
7-cis	16,24	23,20
all-trans Retinal	17,73	39,87

Wie auch aus der dazugehörigen Abbildung ersichtlich ist, konnte hierbei der 7-cis-Peak in seinem Verhältnis zu den anderen Isomeren eindeutig dargestellt werden.

Weitere Messungen mit den o. a. Proben an den folgenden Messtagen zeigten allerdings, dass das 7-cis-Isomer zu den äußerst instabilen Isomeren zu zählen ist, da in den zunächst getrockneten und zur Messung resuspendierten Proben im weiteren kein 7-cis-Isomer mehr nachweisbar war, während es in neu angesetzten Proben durchweg in konstanten Mengen entstand.

Um nun auch feststellen zu können, ob und zu welchem Zeitpunkt das 7-cis-Isomer in seiner Retinol- und Retinylpalmitatform nachweisbar ist, begannen wir hierzu neue Messreihen. Wir belichteten erneut all-trans-Retinal für 120 Minuten unter Weißlicht in Acetonitril und maßen die Probe durch (RAL 7 Sample 22). Danach wandelten wir das Probenmaterial wie schon im Kapitel Isomerengewinnung beschrieben in die Alkoholform um und maßen nun diese Proben unter Retinolbedingungen. In keiner unserer Messungen war im Vergleich mit vorangegangenen ein "neuer" Peak nachweisbar, selbst bei veränderten Messbedingungen (Flow 96:4) nicht, welche zu einem verstärkt getrennten Eluieren der einzelnen Peaks führte (ROL 7 SMP. Samples 4 - 10). Wir versuchten anschließend, erneut die 7-cis-Fraktion der Retinalmessungen abzufangen und isoliert umzuwandeln, doch auch hierbei war im Rahmen der Retinolmessung kein Peak nachzuweisen (ROL 7 Samples 11- 14).

Trotz des negativen Ergebnisses bei den Retinolversuchen führten wir zur Ergänzung der bisherigen Experimente auch noch Messungen zur Palmitatform des 7-cis-Isomers durch, wobei wir Retinalproben zunächst in die Alkoholform und anschließend in die Palmitatform umwandelten. Auch hierbei war eine chromatografische Darstellung eines Peaks für die 7-cis-Form nicht möglich.

4. 3. Diskussion

Im Rahmen unserer Versuche zur Darstellung des 7-cis-Isomers des Retinals, welches wir erstmals im Rahmen unserer Forschungsarbeiten nachweisen konnten, war lediglich unsere Arbeit im Hinblick auf die Retinalform erfolgreich.

Wie dargestellt, gelang uns die Isolierung des 7-cis-Peaks und dessen Darstellung im Vergleich zu den anderen Isomeren recht zufriedenstellend, so dass im Hinblick auf zukünftige Messreihen eine Vergleichsgrundlage geschaffen werden konnte. 7-cis-Retinal eluierte bei uns konstant nach 16,2 Minuten Laufzeit bei einem Lösungsmittelverhältnis Heptan zu tertiärem Butylmethylether von 98 : 2 und einer Flussrate von 1,5 ml/min und überlagerte dabei nicht mit benachbarten Peaks.

Die Identifikation der 7-cis-Form des Retinols, wie auch des Retinylpalmitats gelang nicht, was zum einen sicherlich auf die geringe Ausbeute an 7-cis-Retinal, zum anderen aber auch auf dessen Instabilität zurückzuführen sein dürfte, da die Umwandlung der isolierten 7-cis-Retinalfraktion in die Alkoholform ebenfalls nicht gelang. Aufgrund dessen war eine Darstellung der Retinylpalmitatform schon von vorneherein nicht zu erwarten, unsere Experimente bestätigten schließlich diese Vermutung. Literaturangaben zum 7-cis Retinol oder zum 7-cis-Retinylpalmitat wurden von uns nicht gefunden, so dass wir keinen Hinweis auf deren mögliche Retentionszeiten erhalten konnten.

5. HPLC-Messungen von Pinealisdrüsen von Regenbogenforellen

5. 1. Einleitung

Nach den Messungen von Pigmentepithel- und Retinaextrakten aus den Froschaugen hatten wir unverhofft die Gelegenheit zu einer weiteren Anwendungserprobung unserer Messmethode. Zielrichtung der Forschungsgruppe Prof. Dr. Meissl aus Bad Nauheim war unter anderem die Identifikation und Quantifizierung von Hormonen aus der Epiphyse der Forellen und die Klärung der Funktion dieser Hirndrüse für den gesamten Organismus.

In der Diskussion steht unter anderem die Bedeutung der Pinealdrüse für die Steuerung des Tag-/Nachtrhythmus bei Säugetieren. Bekannt ist bereits die Funktion des Pinealorgans als sogenanntes „drittes Auge“, da die Pinealdrüse Photorezeptoren enthält. In diesem Zusammenhang wurden bereits chromatographische Messungen an isolierten Pinealdrüsen durchgeführt (Tabata et al., 1985), allerdings lässt die Qualität der abgebildeten Chromatogramme bezüglich der Identifikation der Isomeren sehr zu wünschen übrig. Zudem geht aus o. a. Arbeit nicht hervor, auf welchem Wege die in den Chromatogrammen dargestellten Peaks identifiziert wurden. Auch wird eine reproduzierbare Extraktionsmethode für die Farbstoffisomeren aus den Pinealorganen nicht beschrieben.

Zielsetzung unserer Versuche war es nun, zunächst eine Extraktionsmethode zu entwickeln, bei welcher ein Maximum an Retinoidisomeren aus den Präparaten gewonnen werden kann, ohne eine Verfälschung der Ergebnisse bei der Extraktion hinsichtlich künstlich entstehender Isomeren hinnehmen zu müssen. Des weiteren sollten bei unseren Messungen Chromatogramme entstehen, welche eine eindeutige Identifikation der dann nachgewiesenen Isomeren zulässt, entweder durch Cochromatografie oder im Vergleich zu den Retinal-, Retinol- oder Retinylpalmitatmessungen unserer vorangegangenen Messreihen.

5. 2. Probengewinnung und Aufbereitung

Das uns von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Meissl zur Verfügung gestellte Probenmaterial an Pinealisdrüsen entstammte den im Kerckhoff-Institut durchgeführten Experimenten zum Nachweis von Indolaminen im Epiphysengewebe der Regenbogenforelle. Die Präparation der einzelnen Pinealdrüsen erfolgte in einem abgedunkelten, jedoch nicht völlig lichtdichten Raum bei Zimmertemperatur. Auf völlige Dunkelheit bei der Entnahme konnte seitens der Arbeitsgruppe Meissl deshalb verzichtet werden, da eine Dunkeladaptation der Pinealorgane in einem Nährmedium bezogen auf die Hormonbestimmungen auch nach Entnahme noch durchgeführt werden konnte, ohne eine Diskrepanz zu den in vivo dunkeladaptierten Fischen bzw. Retinae aufzuweisen. Das Probenmaterial wurde nach Entnahme aus den Forellen dann sofort den Hormonmessungen zugeführt, danach in Eppendorfgefäße mit Ringerlösung überführt und in der Tiefkühltruhe bei -80°C gelagert. Wir holten das Probenmaterial direkt im Kerckhoff-Institut ab, gaben die Proben in lichtdichte Behälter und lagerten diese zum Transport nach Gießen auf Trockeneis, um größere Temperaturschwankungen und möglichen Zerfall der vorhanden Isomeren zu verhindern. In unserem Labor wurde ein Teil des Materials bei -18°C gelagert, während die restlichen Pinealorgane direkt den Messungen zugeführt wurden.

Wir tauten die einzelnen Proben auf, indem wir die Behälter mit den Eppendorfgefäßen jeweils für 30 Minuten auf Eis lagerten. Nach dieser Zeit war festzustellen, dass die im Gefäß befindliche Ringerlösung vollständig verflüssigt war. Im Anschluss daran trockneten wir die einzelnen Proben unter Stickstoffbegasung. Der Trockenvorgang war abgeschlossen, wenn die Pinealdrüsen im Stickstoffstrom hin und her gewirbelt wurden.

Sämtliche Arbeitsschritte bis dahin erfolgten bei völliger Dunkelheit, die Kontrollen während des Trocknens bei schwachen Rotlicht für wenige Sekunden, um Veränderungen in der Isomerenkonfiguration der Proben durch Belichtung zu verhindern. Zur Gewinnung eines Extraktes, in welchem dann die Retinoidisomeren enthalten sein sollten, bedienten wir uns weitgehend der von uns entwickelten und modifizierten Methode zur Extraktion der Retinoide aus der Froschretina (siehe Kapitel 2). Im Folgenden wird dann für jeden einzelnen Versuch die exakte Zusammensetzung der Lösungsmittel dargestellt.

Orientierend soll hier nur erwähnt werden, dass wir, ebenso wie bei den Froschretinae, die Pineale zunächst mit Ethanol inkubierten und kurz von Hand schüttelten. Dieses Gemisch wurde für 10 Sekunden gevortext, die Ethanolphase abgezogen und unter einer Stickstoffatmosphäre getrocknet. Schließlich wurde die Probe mit einem geringen Volumen an Heptan resuspendiert, in eine Spritze aufgezogen und auf die Säule gegeben. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter schwachen Rotlicht. In der Zeit zwischen Resuspension und Messung lagerten wir die Proben auf Eis, um Isomerenbildung durch zu starke Temperaturschwankungen zu vermeiden.

5. 3. Messungen der Retinoide im Pinealorgan der Regenbogenforelle

Da uns nur eine begrenzte Anzahl von Pinealorganen für die ersten Messreihen zur Verfügung stand, galt es zunächst, die Nachweisgrenze für die enthaltenen Retinoide festzustellen, um möglichst materialsparend bestmögliche Ergebnisse zu erhalten. Schon im Vorhinein war uns klar, dass die Menge der in den einzelnen Pinealen enthaltenen Sehfärbstoffisomeren im Vergleich zur Froschretina relativ klein sein musste und wir vermuteten, dass eine einzelne Drüse, bzw. deren Extrakt zu einer Messung nicht ausreichend sein dürfte.

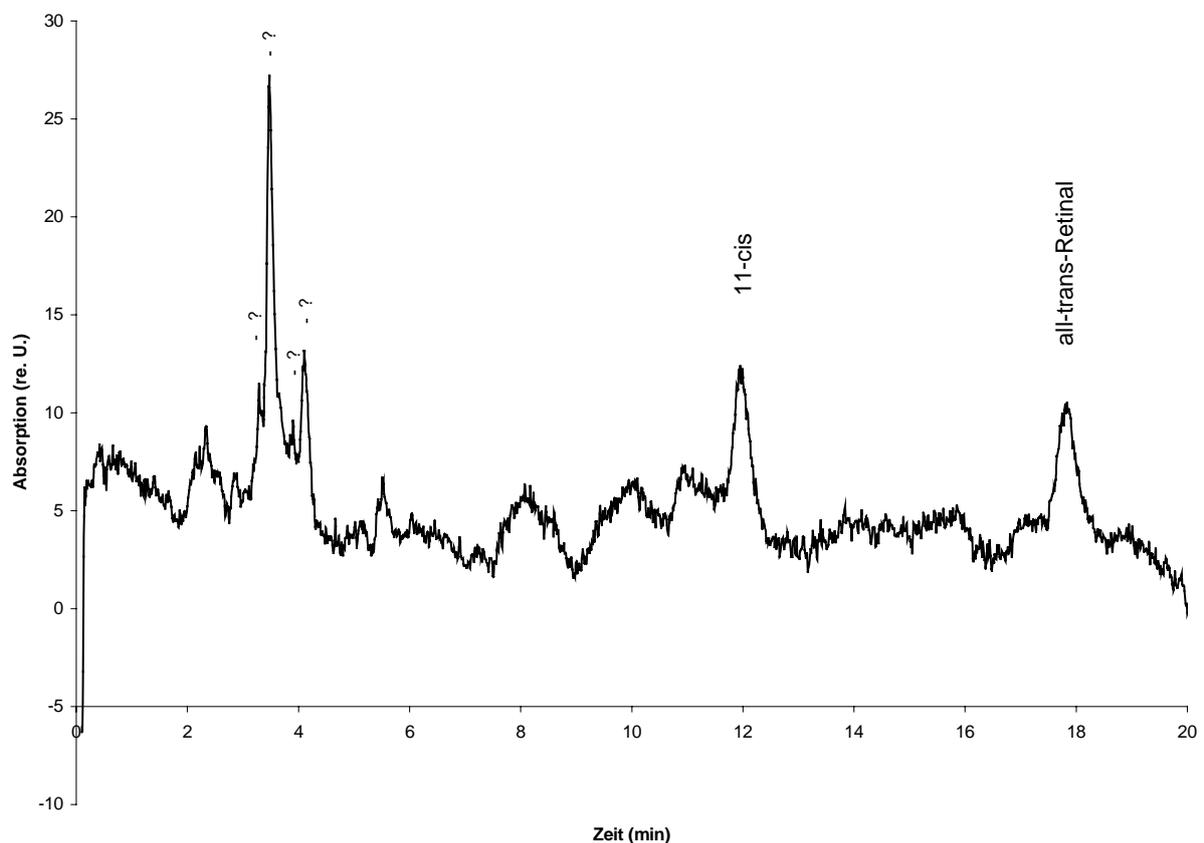
Daher verwendeten wir aus dem aus dem Kerckhoff-Institut geholten Probenmaterial, bestehend aus fünf Pinealen in einem Eppendorfgefäß, für unsere ersten Bestimmungen drei Pinealdrüsen, tauten diese unter Stickstoffbegasung auf Eis auf und extrahierten unter Zugabe von 300 µl Ethanol, zogen nach zehnssekündigem Vortexen 200 µl der Heptanphase ab, filterten sie, trockneten dann unter N₂ und resuspendierten mit 50 µl Heptan.

Den ersten Messungen stellten wir einige Vergleichsmessungen mit diversen Retinalproben voran, da zu befürchten war, dass während der Messungen von pinealem Gewebe Zellreste, Lipide oder andere gelöste Stoffe, die trotz Filtern und Vortexen nicht zu 100 % aus der Probe zu eliminieren waren, letztendlich, wenn sie auf die Silicagelsäule geraten, Veränderungen in den Elutionszeiten herbeiführen könnten. Auch am Ende der Messreihe mit Pinealisextrakt machten wir Vergleichsmessungen, um derartige Veränderungen in unseren Messreihen entdecken zu können.

Unsere erste Messung des Pinealisextraktes (TROUT1. SMP Nr. 5) erfolgte unter den Messbedingungen, wie wir sie bereits bei allen vorangegangenen Retinalmessungen herbeigeführt hatten. Mit einem Flow von 1,5 ml/min und einem Verhältnis von 97% Heptan zu 3% tertiärem-Butylmethylether, sowie 82 bar Druck, erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 371 nm und einer Säulentemperatur von 25°C. Hierunter ergab sich folgende Isomerenkonstellation.

Abbildung 5. 1.

TROUT1 05; Messung der Sehfärbstoffisomeren aus einer Extraktion von 3 Pinealorganen



Wie aus der Abbildung 5. 1. zu ersehen ist, war zwar einerseits ein Nachweis der in der Probe enthaltenen Farbstoffisomeren möglich, andererseits war deren quantitative Ausbeute, wie wir schon vor unseren Messungen vermuteten, sehr gering.

Nur die größeren Peaks, auf deren Identifikation im weiteren noch eingegangen wird, waren eindeutig gegen Schwankungen der Basislinie abgrenzbar. Kleinere Peaks, die Signale von dicis- oder tricis-Isomeren darstellen könnten, welche möglicherweise dem Nativgewebe entstammen, aber auch künstlich bei der Probenaufbereitung entstanden sein könnten, schienen dagegen bei solch geringen Mengen an Material kaum näher bestimmbar zu sein.

Ein weiteres Problem deutete sich an in bezug auf die Identifikation der Peaks, da eine aufbereitete Probe aus mehreren Pinealdrüsen nur für eine einzige Messung auszureichen schien, ein Fraktionieren derselben für mehrere Messungen von einer Probe daher nicht durchführbar erschien.

Obwohl es von der Quantität her nicht sinnvoll erschien, führten wir am folgenden Tag erneut Messungen durch, und zwar mit den beiden restlichen Pinealorganen der ersten Versuchsreihe. Die Aufbereitung und Extraktion der Probe erfolgte nach der Vorgehensweise vom Vortag, allerdings resuspendierten wir den getrockneten Extrakt lediglich mit 20 µl Heptan, um die Konzentration der Probe zu erhöhen. Das Risiko hierbei lag aber darin, dass unbeabsichtigt auch Verunreinigungen der Probe mit auf die Säule aufgespritzt werden konnten, welche aufgrund der geringen Menge an Lösungsmittel optisch nicht mehr zu erfassen wären. Gleichzeitig versuchten wir, die Probe vom Vortag, bestehend aus drei Pinealen, ein zweites Mal zu extrahieren, um feststellen zu können, wie vollständig wir mit unserer Methode die Retinoidisomeren aus dem Gewebe herauslösen konnten. Dazu inkubierten wir das getrocknete Material erneut mit 300 µl Ethanol, fügten nach kurzem Vortexen 500 µl Heptan hinzu, filtrierten und trockneten den Extrakt unter N₂-Begasung und lösten dann mit 20 µl Heptan. Die hiermit durchgeführte Messung (TROUT1. SMP; Nr. 9) ergab, dass keine Isomeren, welche sich deutlich von den Grundlinienschwankungen unterscheiden ließen, mehr nachweisbar waren. Damit schien klar, dass einerseits unsere Extraktionsmethode vom Vortag erfolgreich und andererseits die quantitative Menge an Isomeren im Pinealorgan tatsächlich sehr gering war.

Mit der neuen Probe aus den zwei weiteren Pinealdrüsen führten wir daraufhin auch eine Messung durch (TROUT1. SMP; Nr. 10), und unsere Befürchtungen wurden bestätigt.

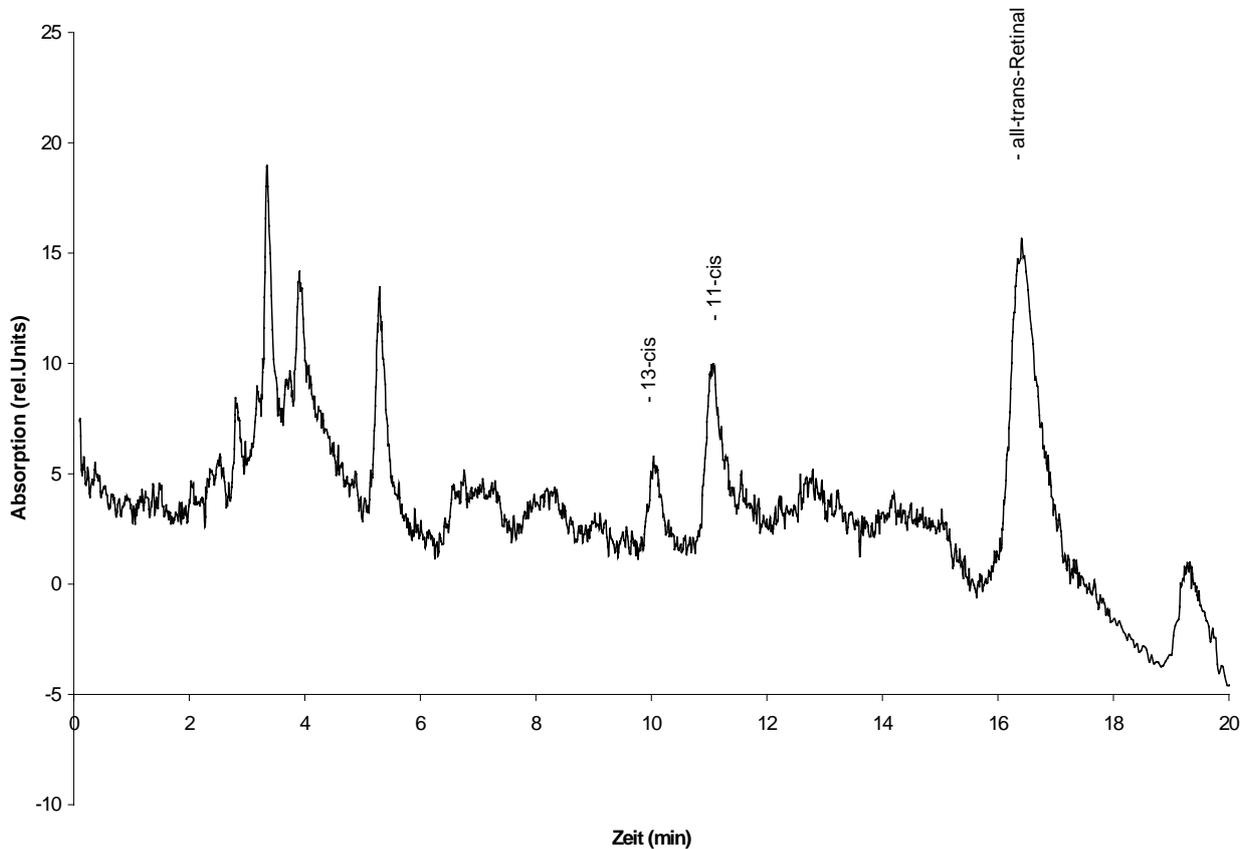
Zum einen war die Ausbeute an identifizierbaren Peaks deutlich geringer, als bei den Messungen am Vortag, zum anderen führten Verunreinigungen der Probe zu einer zunehmenden Unruhe der Basislinie und schließlich zu starken Schwankungen und Wanderbewegungen, was eine Bewertung der Messung schließlich nicht mehr zuließ. Nach ausgiebigem Freispülen der Säule mit einem Lösungsmittelverhältnis von 85% Heptan zu 15% tertiärem Butylmethylether gelang es uns schließlich, die Verunreinigungen aus der Säule herauszulösen und diese neu zu konditionieren. Hierauf durchgeführte Vergleichsmessungen mit in 2,2,2 - Trifluorethanol belichtetem all-trans-Retinal zeigten wieder eine gerade Basislinie und, im Vergleich mit älteren Messungen, konstante Elutionszeiten der einzelnen Isomeren.

Nach den ersten Messtagen zogen wir eine Zwischenbilanz. Zum damaligen Zeitpunkt stand zweifelsfrei fest, dass zu einer einzelnen chromatografischen Bestimmung zumindest 3 oder mehr Pineale als Probengrundlage herangezogen werden mussten, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten. Um schließlich auch eine Differenzierung zwischen dunkel- und helladaptierten Pinealen zu erhalten, müsste die Menge noch weiter heraufgesetzt werden. Schließlich stellte sich noch die Frage nach der Identifikation der einzelnen erhaltenen Peaks.

Wir konnten weiteres Probenmaterial erhalten, diesmal zwei Eppendorfgläser mit je 4 Pinealorganen. Sämtliche Forellen, die dazu präpariert wurden, waren für mehrere Stunden bei Weißlicht helladaptiert worden.

Nach Abgleichsmessungen mit einer alten Retinalisomerenprobe bereiteten wir eine Probe auf, indem wir vier Pineale nach Auftauen und Trocknen mit 500µl Ethanol überschichteten, vortexten, 750 µl Heptan dazugaben, erneut vortexten und die Heptanphase abzogen. Nach dem Trocknen dieses Materials resuspendierten wir mit 20µl Heptan.

Die darauffolgende Messung (TROUT1. SMP; Nr. 18) erfolgte unter Retinalbedingungen (s.u.) und bei einer Wellenlänge von 371 nm, ab der 20. Minute zum Retinolnachweis bei einer Wellenlänge von 325 nm zum Retinolnachweis. Dabei ergab sich folgende Konstellation:

Abbildung 5. 2.***TROUT1 18; Retinalisomeren aus einer Extraktion von 5 Pinealorganen***

Wie schon zu erwarten, waren die darstellbaren Peaks diesmal größer und von der Basislinie zu differenzieren. Es fanden sich erneut größere Peaks vor der fünften Minute, welche wir als Isomeren einer Retinylveresterung ansahen, zwischen der 10. und 17. Minute drei größere Peaks, die im Vergleich zu Retinalstandardmessungen deckungsgleich mit 13-cis, 11-cis und all-trans-Retinal eluieren. Signale, welche einen Retinolanteil im Farbstoffgemisch der Pinealdrüse repräsentieren würden, fanden sich nicht, zumindest keine Peaks im erwarteten zeitlichen Bereich zwischen der 20. und 35. Minute bei diesem gewählten Mischungsverhältnis der Eluenten und dem gegebenen Flow, welche von Grundlinienschwankungen zu differenzieren gewesen wären.

Ansonsten unterschied sich das Ergebnis dieses Versuches nicht wesentlich von dem der Messung von den vorangegangenen. Bilanzierend ließ sich also jetzt sagen, dass mit unserer Methodik Chromatogramme zu erstellen waren, welche vergleichbare Ergebnisse liefern konnten und in welchen zumindest zwei unterschiedliche Farbstoffanteile, eine Ester- und die Aldehydform des Sehfarbstoffes, und deren Isomeren nachweisbar waren.

5. 4. Identifikation der Isomeren

Der nächste Schritt in unseren Messversuchen mit Pinealdrüsenmaterial bestand darin, die einzelnen Peaks in den bisher erstellten Chromatogrammen, bzw. die dazugehörigen Isomeren zu identifizieren. Dazu verwendeten wir eine Probe mit sechs präparierten Pinealen, die am selben Tag noch aufgetaut, getrocknet und extrahiert wurden. Wir resuspendierten den getrockneten Extrakt mit 50 µl Heptan und teilten die Probe in drei Fraktionen von je 15 µl auf.

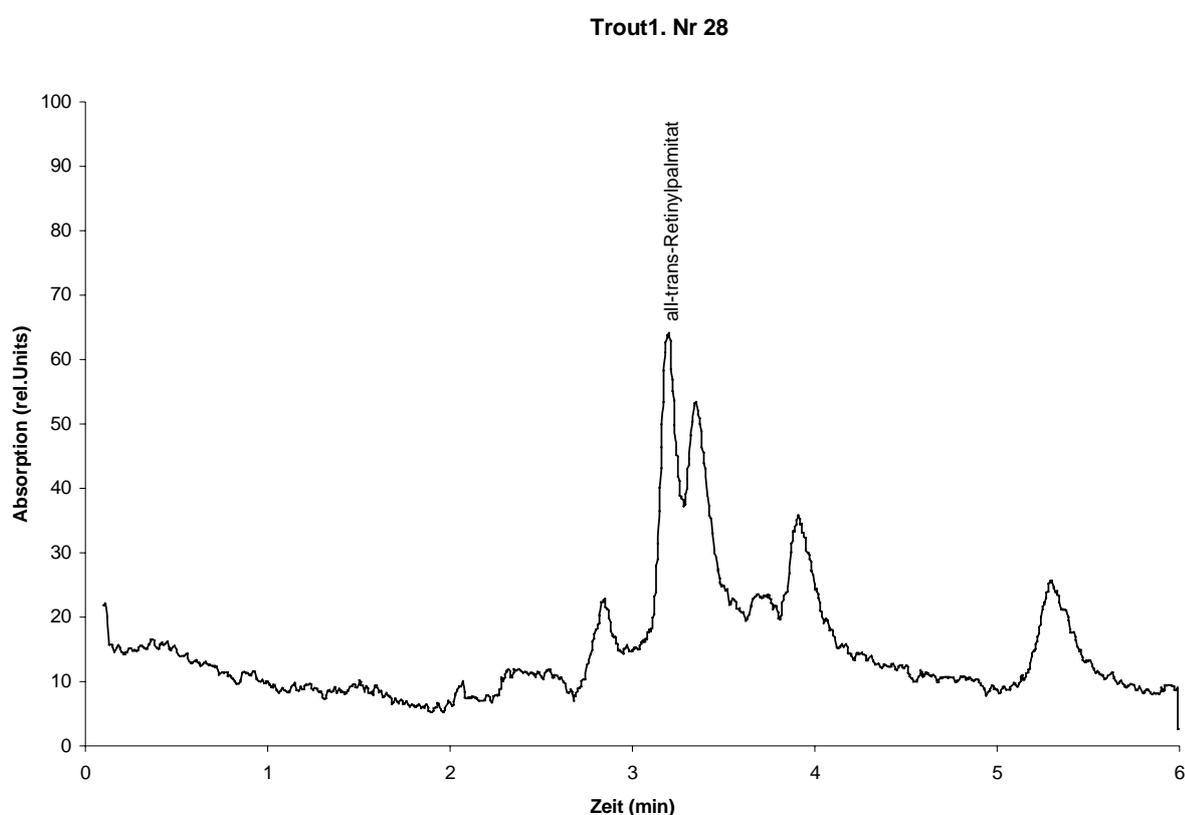
Zur Identifikation verwendeten wir nun die erste aufbereitete Probe, welche uns als Referenz zu den weiteren Messungen dienen sollte. Wie schon im Vergleich zu den am Anfang dargestellten Messungen ließen sich erneut bei konstanten Messbedingungen größere Signale zwischen der dritten und fünften Messminute, sowie zwei weitere Peaks in der 11. und 16. Minute nachweisen. Um diese Signale nun bestimmten Isomeren zuordnen zu können, coeluierten wir die zweite Probe mit einer hochverdünnten Retinalisomerenprobe (in Ethanol für 40 Minuten belichtetes all-trans-Retinal), welche als Isomeren 13-cis, 11-cis, 9-cis, 7,9-dicis und all-trans-Retinal enthielt. Mit dieser Messung konnten wir den Peak nach 11 Minuten als 11-cis und den Peak nach 16 Minuten als all-trans-Retinal identifizieren. Weitere Isomeren konnten nicht zugeordnet werden.

In der nächsten Messung (TROUT1. SMP Nr. 28) versuchten wir nun, die Signale zwischen der 3. und 5. Messminute zu identifizieren. Vom Signalmuster her vermuteten wir, dass es sich um einen Retinylester handeln könnte. So verwendeten wir als Referenz das uns zur Verfügung stehende Retinylpalmitat in seiner all-trans-Form.

Wie jedoch auch aus den Abbildungen 5.2. und 5.3. hervorgeht, fand sich das all-trans-Retinylpalmitat in dieser Messung als neuer und eigenständiger Peak wieder, so dass es sich bei den hier nachweisbaren Isomeren der Pinealisdrüsenprobe offensichtlich nicht um eine Palmitatveresterung handeln kann.

Abbildung 5.3.

Coelution von all-trans-Retinylpalmitat mit einer Pinealisprobe



Auf eine Coelution einer Pinealisprobe mit Retinolisomeren wurde von uns verzichtet, da sich im fraglichen Zeitintervall unter optimalen Messbedingungen kein von der Basislinie zu differenzierender Peak nachweisen ließ.

5. 5. Diskussion

Die von uns durchgeführten HPLC-Messungen mit aus den Pinealorganen von Forellen stammenden Extraktionsproben erbrachten insgesamt gesehen leider nicht die Ergebnisse, die wir uns aufgrund unserer Methodik erhofft hatten. Ausschlaggebend hierfür war durchweg die sehr geringe Menge des für die Versuche zur Verfügung stehenden Materials, die Gesamtmasse eines Pinealorgans beträgt ca. 1g. Es bleibt daher zunächst festzuhalten, dass aus einem einzigen Pinealorgan nicht genügend Mengen an Farbstoffisomeren für eine Messung zu gewinnen sind. Selbst die von uns verwendete Höchstmenge von 6 Pinealen für eine Probe erbrachte bei maximaler Konzentrierung nur Material für maximal drei Messungen. Da für zu vergleichende Messreihen aber mehr als nur drei dieser Messungen notwendig erschienen, war eine weitergehende Beurteilung unserer Ergebnisse so nicht möglich. Zusätzlich erhöhte sich durch unsere Art der Probenaufbereitung gleichzeitig die Gefahr, mit dem hochkonzentrierten Probenmaterial Verunreinigungen auf die Silicagel-Säule aufzubringen, welche die Messergebnisse weiter verschlechtern konnten.

Möglich war uns lediglich, einen Nachweis über im pinealen Gewebe vorhandene und von Basislinienschwankungen zu differenzierende Farbstoffisomeren zu führen und diese teilweise zu identifizieren. Mit unserer Methodik ließen sich im Bereich von der dritten bis zur fünften Messminute in allen Messungen fünf Peaks nachweisen (vgl. Abb. Nr. 5. 1 und 5. 3), von denen aufgrund ihrer Konstellation der Peak nach 3 min möglicherweise als 11-cis-Isomer und der Peak nach 4 min als all-trans-Konfiguration eines Retinylesters anzusprechen sind.

Ein Identifikationsversuch mit Coelution von all-trans-Retinylpalmitat erbrachte zumindest das Resultat, dass es sich bei der Veresterungsform nicht um das im Auge vorhandene Palmitat handeln kann. Eine weitergehende Identifikation der Isomeren schien uns zum damaligen Zeitpunkt aufgrund der geringen Mengen an Probenmaterial und fehlender technischer Voraussetzungen, sowie entsprechenden Vorgaben aus der Literatur zu Veresterung von Retinylresten mit Stearat, Oleat o. ä. nicht sinnvoll. Dies soll weiteren Arbeiten unserer Gruppe vorbehalten bleiben. Darin sollte zum einen geklärt werden, ob durch die Vergrößerung der Probenmenge bessere Ergebnisse erzielt werden können und ob durch Änderungen im Bereich der HPLC selbst eine Verbesserung der Peakdarstellung und -auflösung möglich ist.

Zu diskutieren wäre hier der Einsatz von Narrow-bore-Columns (z. B. von Hewlett-Packard), die durch den geringeren Innendurchmesser der Säule und feinere Körnung des Gels schmalere und höhere Peaks zur Darstellung bringen sollen, was bei geringem Ausgangsmaterial eindeutig von Vorteil wäre.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen der Forschungsgruppe Tabata ist nicht möglich gewesen. Dies lag zum einen an den nur spärlichen Angaben zur Methodik der Probengewinnung und zur Messmethodik. Zum anderen sind der o. a. Arbeit keine Informationen über die Identifikation der angegebenen Farbstoffisomeren zu entnehmen.

Unser ursprüngliches Ziel, eine Differenzierung der Sehfarbstoffisomeren nicht nur in bezug auf ihre Qualität, sondern auch Veränderungen hinsichtlich ihrer Quantität im Tag-/Nachtrhythmus der Forellen nachweisen zu können, konnte somit nicht erreicht werden und bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

6. HPLC der Sehfärbstoffisomere in Pigmentepithel und Retina

6.1. Einleitung

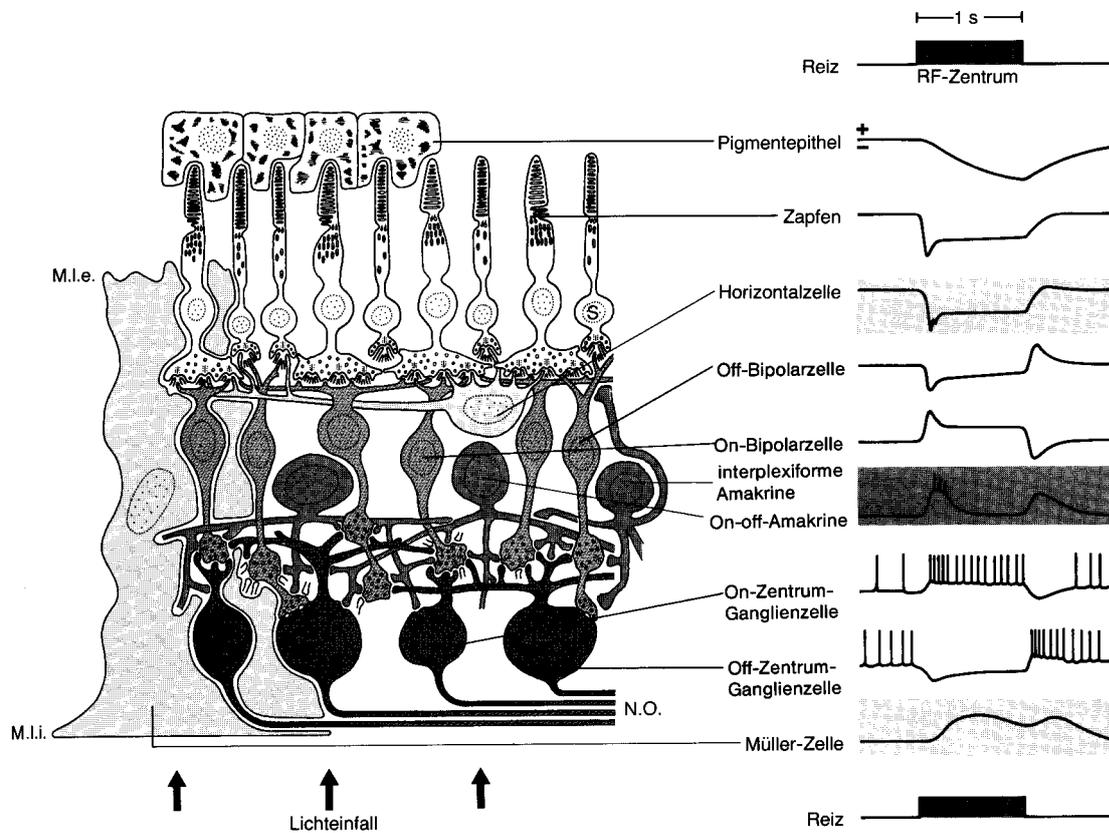
In unseren weiteren Versuchsreihen beschäftigten wir uns mit Messungen von Pigmentepithel- und Retinaextrakten von Froschaugen zur Quantifizierung und Identifikation der in ihnen vorhandenen Isomeren des Retinals und Retinols mittels der modifizierten HPLC-Methode. Unser Hauptinteresse galt dabei der Isomerenkonfiguration bei Hell- und Dunkeladaptation der Frösche, von welcher wir uns Rückschlüsse auf die Regeneration der gebleichten Retina erwarteten, speziell der enzymatisch gesteuerten Reisomerisation von all-trans in 11-cis Retinal.

Dabei galt es zunächst, die technischen Voraussetzungen für erfolgreiche Messreihen und reproduzierbare Ergebnisse zu schaffen. Wie bereits im Kapitel Methoden und Materialien beschrieben, gewannen wir unser Probenmaterial aus Augen, die den Patch-clamp-Messungen unserer Arbeitsgruppe entstammten. Sie wurden in der vorbeschriebenen Art und Weise präpariert, extrahiert und zur HPLC-Messung vorbereitet. Die Ergebnisse sind im weiteren dargestellt.

6.1.1. Anatomie des Pigmentepithels

Äußerlich erscheinen die Pigmentepithelzellen als hexagone Prismen mit einem Durchmesser von 14 μm und einer Höhe von 10 – 14 μm . Von der Zelloberfläche gehen zwei unterschiedliche Sorten von Fortsätzen aus, einerseits zylindrische Zellscheiden, welche die Spitzen der Außenglieder umgeben, zum anderen Mikrovilli, die die Räume zwischen den Photorezeptoren belegen. Kennzeichen des Zytoplasmas sind zahlreiche Melaningranula und die sogenannten Restkörper, welche mit phagozytierten Anteilen des Stäbchenaußensegmentes gefüllt sind. Weiterer bedeutsamer Anteil des Zytoplasmas ist ein agranuläres endoplasmatisches Retikulum in Form eines Netzwerkes zwischen den Granula und den Restkörpern, sowie ein Golgi-Apparat. Wiedergegeben sei an dieser Stelle eine Schemazeichnung zum Aufbau der gesamten Netzhaut der Vertebraten.

Abbildung 6.1.



Aus: Schmidt + Thews (Hrsg.), Physiologie des Menschen, Springer 1990

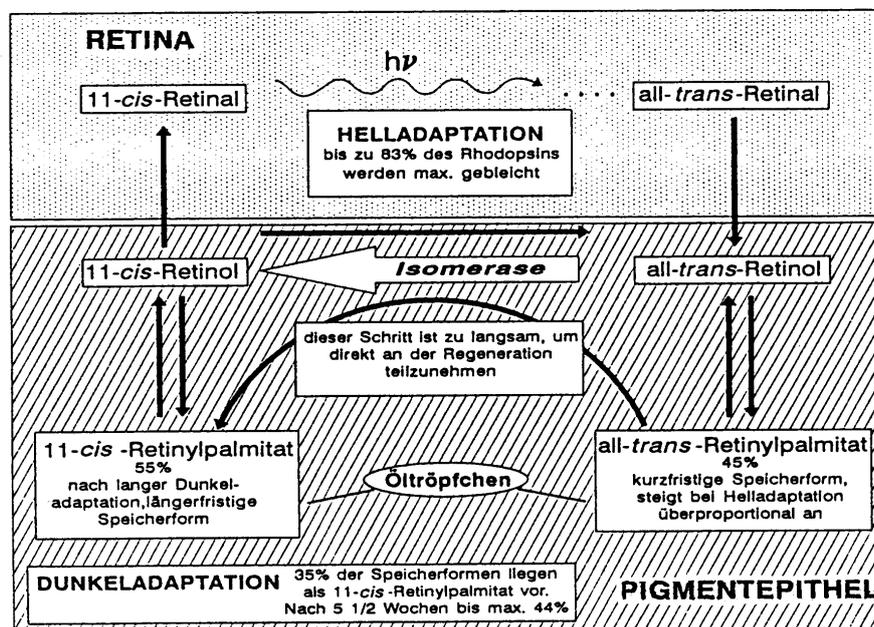
6.1.2. Biochemie des Pigmentepithels

Die im Pigmentepithel des Auges ablaufenden Stoffwechselprozesse sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Zentrales Element in diesem Zusammenhang stellt die für die Regeneration des Sehpurpurs notwendige Isomerase dar, welche die Umwandlung von all-trans-Retinol in die 11-cis-Form katalysiert. Schon 1956 stellte Hubbard in einer Übersichtsarbeit diese Isomerase zur Diskussion, aber erst in den Jahren 1982 (Perlman et al.) und 1984 (Bridges et al.) wurden Modelle des Sehzyklus unter Einschluss einer Isomerase entworfen. Unklar blieb weiterhin die Lokalisation des Enzyms. Erst 1986 wurde von Nöll ein Zyklus beschrieben, der die Isomerase in das Pigmentepithel lokalisiert.

Dieser enzymatisch gesteuerte Regenerationsweg sichert ein Fließgleichgewicht zwischen 11-cis-Retinol als Ausgangspunkt und all-trans-Retinol als Endpunkt des Zyklus, ohne dass große Materialmengen an Vitamin A zur Aufrechterhaltung des Sehvorgangs in das Pigmentepithel aufgenommen werden müssen. Als Reserve für einen höheren Verbrauch steht zusätzlich noch Retinylpalmitat in der 11-cis-Form zur Verfügung, welches nicht nur synthetisiert, sondern auch aus all-trans-Retinylpalmitat regeneriert wird. Dieser Recyclingprozeß läuft jedoch sehr langsam ab und kann somit nur einer Reservefunktion dienen. Zur besseren Übersicht ist an dieser Stelle eine schematische Darstellung der verschiedenen Zwischenschritte des Sehzyklus wiedergegeben.

Abbildung 6.2.

Sehzyklus im Froschauge



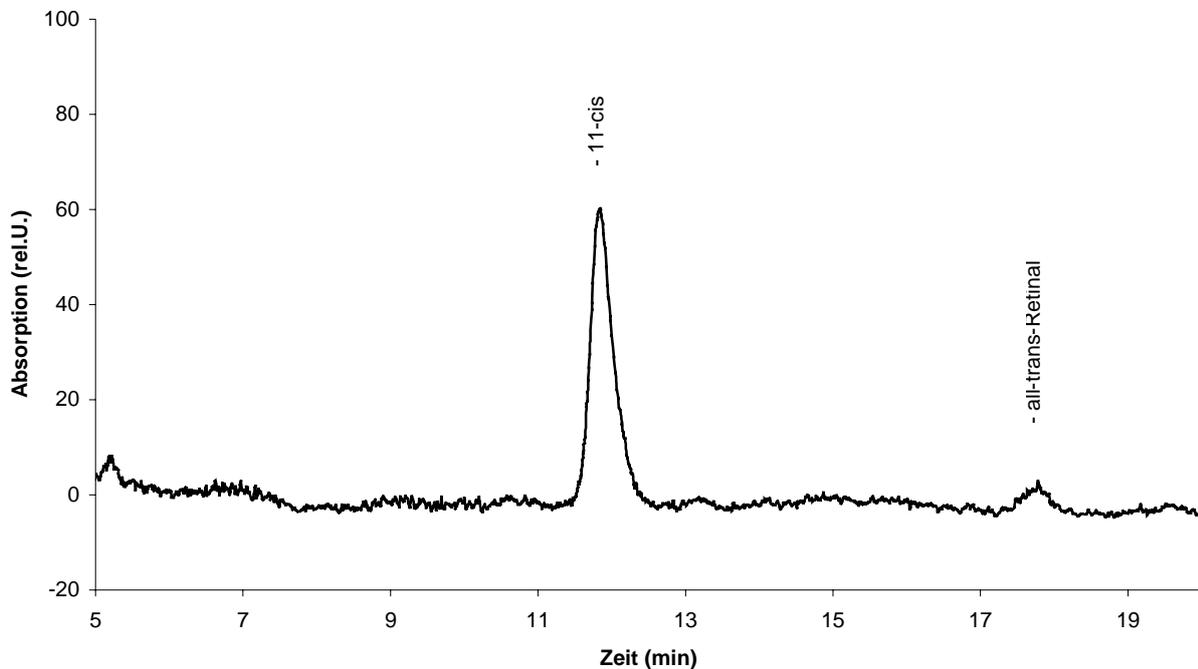
Aus: Besler 1994, Dissertation

6.2. Die Retinoide in Retina und Pigmentepithel

Ausgehend von dem angeführten Schema des Sehvorganges im Pigmentepithel versuchten wir nun unsere modifizierte HPLC-Analysemethode auf die vorhandenen Retinoidisomeren anzuwenden und zum einen deren Anwendbarkeit auf Nativgewebe zu erproben und andererseits Grundlagen in Form von Referenzchromatogrammen für weitere Untersuchungen zum Regenerationsprozess im Pigmentepithel zu schaffen. Im weiteren sind nun die Einzelergebnisse für Retinal, Retinol und Retinylpalmitat dargestellt.

6.2.1. Retinalisomeren

Das in der Retina lokalisierte Rhodopsin, bestehend aus 11-cis-Retinal und dem daran gekoppelten Opsin, ändert bei Belichtung seine Konformation. 11-cis-Retinal wird in die all-trans-Form überführt und durch Hydrolyse erfolgt die Abspaltung des Opsinrestes. Da die Photosensibilität beider Spaltprodukte nicht mehr im Bereich sichtbarer Wellenlängen liegt, stehen diese Endprodukte nicht mehr für den Sehvorgang zur Verfügung. Um ein Bild der Isomerenkonfiguration zu erhalten, extrahierten wir zunächst die Sehfärbstoffisomeren unbleichter, d.h. dunkeladaptierter isolierter Retinae von Fröschen in der bereits beschriebenen Technik. Die Messungen erfolgten unter den von uns geschaffenen Standardbedingungen mit dem Eluentengemisch aus Heptan und tertiärem Butylmethylether bei Dunkelheit. Die hier exemplarisch wiedergegebene Konfiguration konnte in mehreren einzelnen Retinae nahezu deckungsgleich vorgefunden werden.

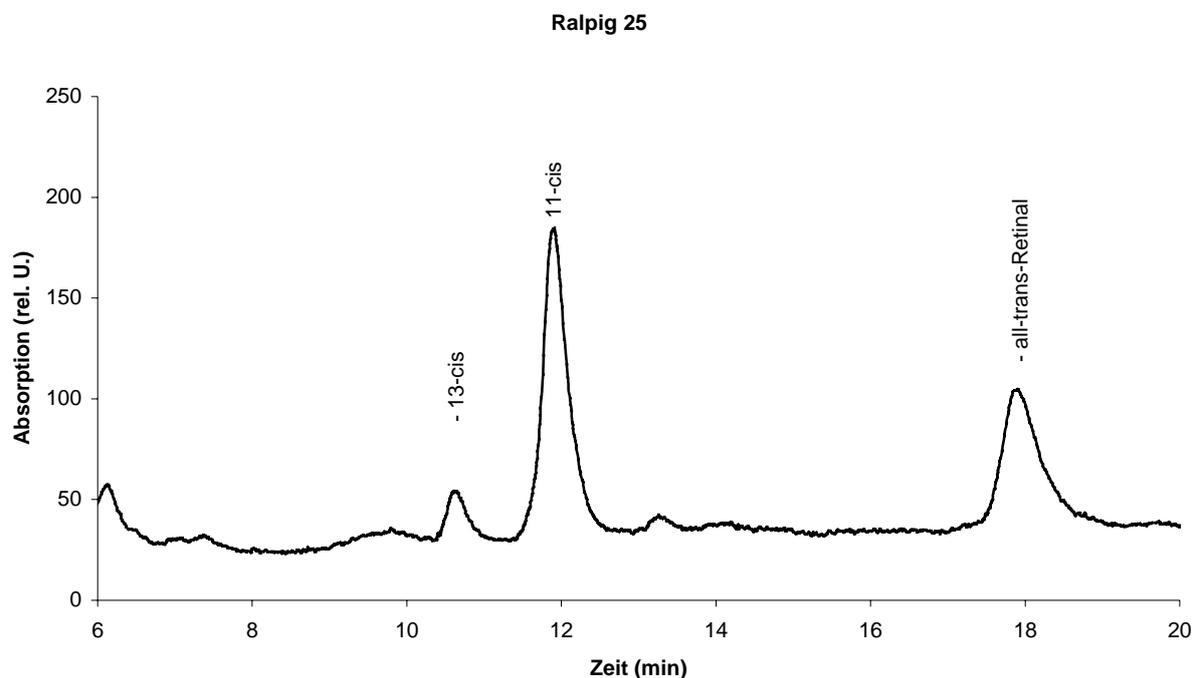
Abbildung 6.3.***RALRET 20; Retinalisomeren in der Retina; 2,0 ml/min, 98:2 Heptan / t-BME***

Der Anteil von 11-cis Retinal betrug in dieser Messung 90,2 % gegenüber einem Anteil von all-trans-Retinal von 9,8 %. In allen weiteren von uns erstellten Chromatogrammen lag der Gehalt an 11-cis Retinal durchschnittlich bei 90 bis 93 % (RALRET 18 – 25). Dies entspricht den von Nöll (1986) und Besler (1995) ermittelten Daten.

Im Vergleich hierzu chromatografierten wir anschließend gebleichte Froschretinae. Wie erwartet stieg nun der Anteil an all-trans Retinal deutlich an. Nach Alpern (1971) werden bei normalem Tageslicht maximal 5 % und bei höchst möglicher Belichtung maximal 83 % des gesamten Rhodopsins gebleicht. In unseren Experimenten ließ sich nachweisen, dass bei der Helladaptation der (lebenden) Frösche maximal 62,9 % des 11-cis Retinals in die all-trans Form überführt wurde. Hier nun die exemplarische Darstellung der Isomerenkonfiguration einer für 5 min unter Weißlicht (60 Watt) nach Isolierung aus dem Augenbecher belichteten Retina.

Abbildung 6.4.

Belichtete Retina, Messung der Retinalisomeren; 2,0 ml/min; 98:2 Heptan / t-BME



Während also der Anteil des 11-cis Isomers auf 57 % sank, stieg der Anteil an all-trans Retinal auf fast 37 %. Leider war in allen durchgeführten Messungen immer wieder ein geringer Anteil von artefiziell entstandenem 13-cis-Retinal nachweisbar, dessen Menge zwischen 3 und 6 % betrug. Wie bereits im Kapitel Isomerengewinnung ausführlich dargestellt wurde, gelang es uns nicht, die Entstehung des 13-cis Isomers vollständig zu vermeiden.

Zur Anwendung kam hier, wie schon eingangs erwähnt, unser modifiziertes HPLC-Verfahren unter den neuen Standardmessbedingungen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 2,0 ml/min, das Eluentenverhältnis 98:2 bei einer Messwellenlänge von 371 nm.

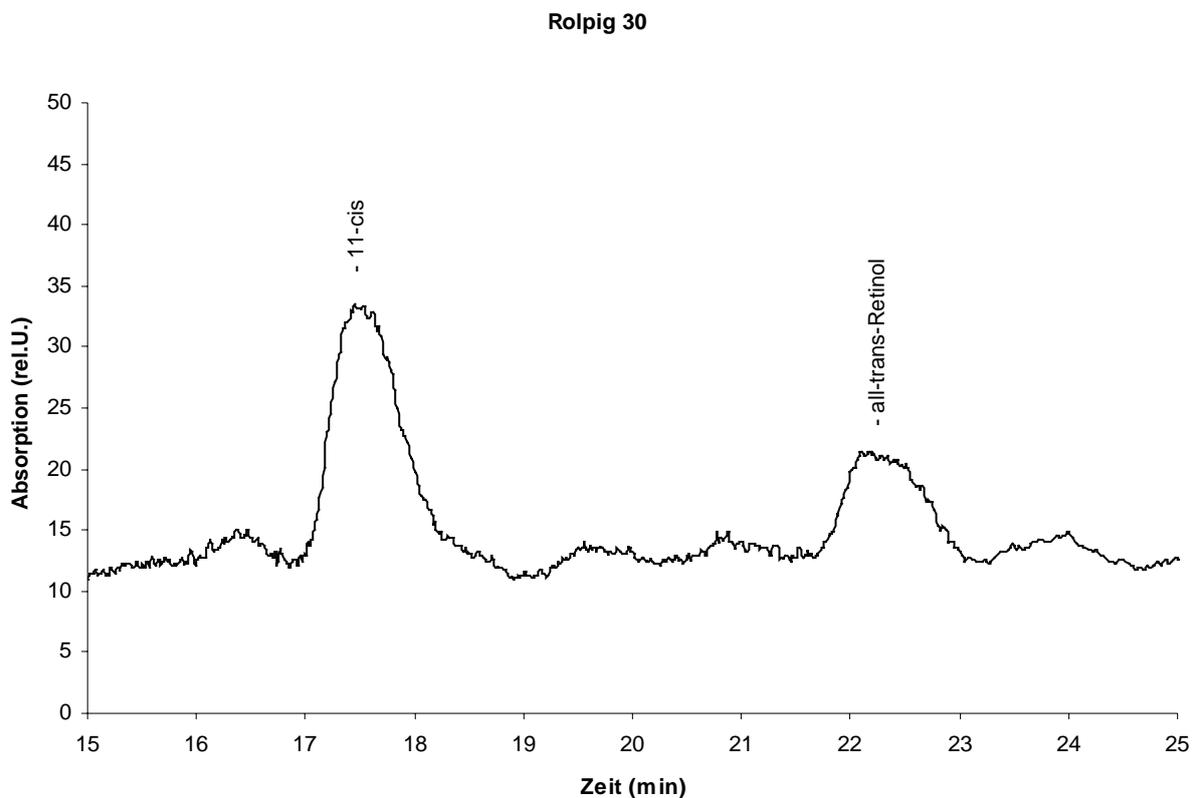
6.2.2. Retinolisomeren

Die am Sehvorgang beteiligten Isomeren des Retinols sind im Pigmentepithel lokalisiert. Sie stellen den biochemischen Schritt zwischen der Speicherform Retinylpalmitat und der lichtaktiven Form Retinal des Sehfärbstoffes dar.

Im Pigmentepithel des Frosches beträgt das Verhältnis Ester zu Alkoholform 99:1. Ausgangsprodukt für die Regeneration des Rhodopsins nach Belichtung ist das all-trans-Retinol, welches mittels einer Isomerase (Nöll 1986; Rando 1989; Besler 1994) in 11-cis Retinol transformiert und schließlich in die 11-cis-Aldehydform reduziert wird. Auch hier führten wir Vergleichsmessungen bei hell- und dunkeladaptierten Froschaugen durch, um eine Grundlage für weitere Experiment bezüglich des Regenerationsvorganges in Netzhaut und Pigmentepithel zu gewinnen. Wir isolierten das Pigmentepithel eines dunkeladaptierten Auges wie vorbeschrieben, bereiteten die Probe auf und maßen unter den von uns entwickelten Standardbedingungen für Retinol. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 1,5 ml/min, der Eluentengradient bei 92:8 bei einer Messwellenlänge von 325 nm.

Abbildung 6.5.

Pigmentepithel Frosch, Retinolisomeren; 1,5 ml/min, 92:8 Heptan / t-BME; $\lambda=325$ nm



In allen durchgeführten Messungen waren wie erwartet nur äußerst geringe Mengen Retinol nachweisbar, welche im Verhältnis zum Retinylester in der quantitativen Ausbeute noch unter 1 % der Gesamtmenge lagen. Sowohl im belichteten, wie auch im unbelichteten Probenmaterial war das Verhältnis von 11-cis zu all-trans Retinol nahezu konstant. Der 11-cis Anteil lag durchschnittlich bei 65 %, der all-trans-Anteil bei 35 %. Daher kann an dieser Stelle auf die grafische Darstellung einer Retinolprobe aus gebleichtem Pigmentepithel verzichtet werden.

Trotz der erwähnten geringen Materialmengen waren die Retinolpeaks gut von der Baseline zu differenzieren und einer Flächenberechnung zugänglich. Eventuell aufgetretene artefizielle Peaks anderer Isomeren des Retinols waren in unseren Versuchsreihen, im Gegensatz zu den Retinalmessungen, nicht nachweisbar bzw. nicht von der Baseline zu differenzieren.

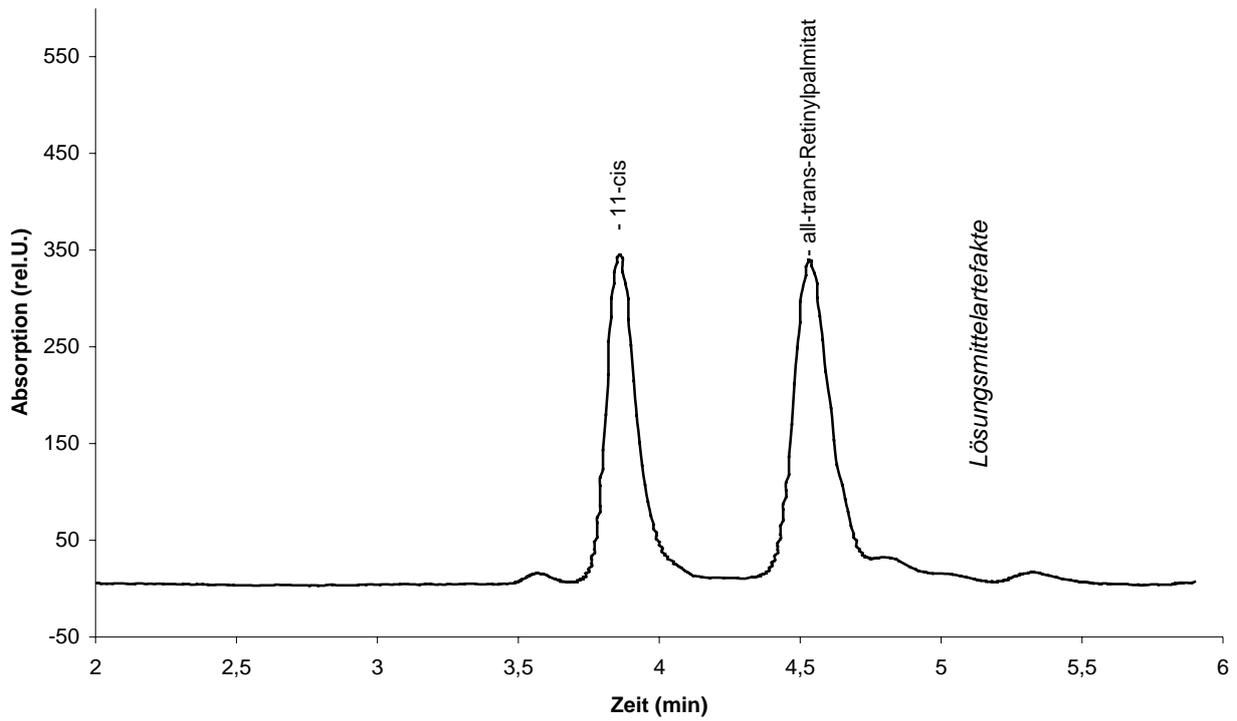
6.2.3. Retinylpalmitatisomeren

Die Isomeren des Retinylpalmitats stellen im Pigmentepithel des Froschauges den quantitativ größten Anteil aller Sehfärbstoffisomeren. In Lipidvesikeln eingeschlossen stellt das Retinylpalmitat die Speicherform des Sehfärbstoffes dar, aus welchem dann die photosensiblen Aldehydformen synthetisiert werden. Das 11-cis-Isomer ist dabei die längerfristige Speicherform, das all-trans-Isomer nur das Zwischenprodukt. Im helladaptierten Zustand nimmt daher der Anteil des all-trans-Isomers antiproportional zum 11-cis deutlich an Menge zu, der 11-cis-Anteil sinkt durch Verbrauch.

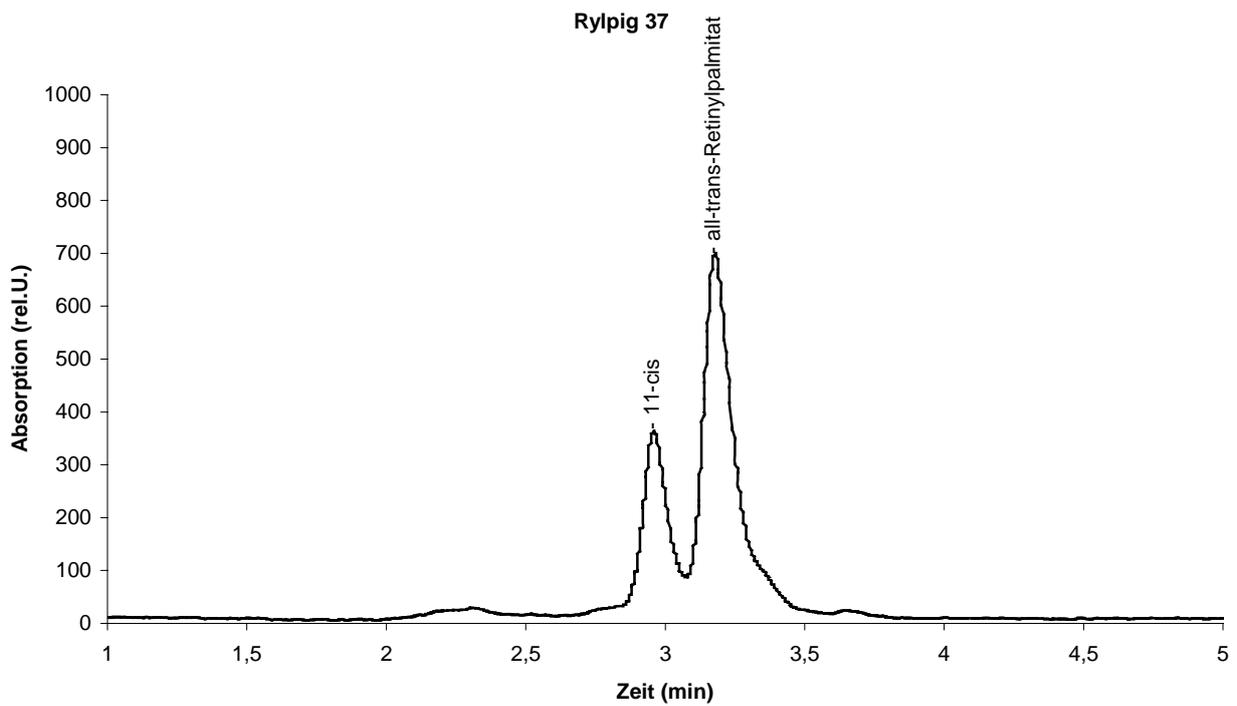
Im Zustand ausgeglichener Belichtungszustände, d.h. einem Wechsel von Belichtung und Regeneration bei normalem Tageslicht liegen beide Isomeren zu gleichen Teilen im Pigmentepithel vor. Erst bei stärkerer Ausbleichung steigt der Gehalt an all-trans-Retinylpalmitat deutlich an (Rando 1989; Besler 1994). Die hier dargestellten Chromatogramme zeigen beide angesprochenen Zustände auf. In Abbildung 6.6. ist die Isomerenkonstellation eines für einige Stunden dunkeladaptierten, in Abbildung 6.7. die eines über Stunden belichteten Auges wiedergegeben, nachdem das Pigmentepithel isoliert und extrahiert wurde. Die Messungen erfolgten gemäß unseres neuen Standards für Retinylpalmitat mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 (Abb. 6. 6.) bzw. 2,0 ml/min (Abb. 6. 7.) bei einem Gradienten von 99:1 (Heptan zu t-BME) bei einer Wellenlänge von 325 nm.

Abbildung 6.6.

RYLPIG 02; Pigmentepithel, Retinylpalmitatisomeren bei Dunkeladaption; 1,5 ml/min

**Abbildung 6.7.**

RYLPIG 37; Pigmentepithel, Retinylpalmitatisomeren bei Helladaption; 2,0 ml/min



Den höheren Flow der HPLC wählten wir im zweiten Fall aus Gründen der Zeitersparnis, da keine weiteren Retinylpalmitatisomeren, auch keine artifiziellen, nachweisbar waren, und trotzdem eine genau Flächenberechnung möglich war.

6.3. Diskussion

Im Rahmen der Anwendungserprobung unserer modifizierten Methodik führten wir Messungen an Pigmentepithel- und Retinaextrakten durch, um die dort lokalisierten Isomeren in gebleichtem und ungebleichtem Zustand zu identifizieren und zu quantifizieren.

Einerseits gelang uns der Nachweis, dass auch die modifizierte Methodik ohne Einschränkung auf diese Versuche anwendbar ist und im Vergleich zu früher erfolgten Messung mit Hexan als Eluent qualitativ identisch gute Ergebnisse liefert. Andererseits waren die Ergebnisse auch quantitativ mit den Resultaten früherer Jahre vergleichbar, so dass unsere Ergebnisse als Grundlage für noch durchzuführende Experimente bezüglich der Regeneration und Identifikation der Isomerase herangezogen werden können.

Es gelang uns zunächst nicht, unter Veränderung der Extraktionsmethodik das Entstehen von artifiziellen Isomeren, insbesondere des 13-cis Retinals, als mögliche Fehlerquelle zu eliminieren. Erst unter Verzicht auf einige mechanische Schritte in der Probenaufbereitung konnte die Menge an Artefakten auf ein Minimum reduziert werden. Letztendlich erreichten wir dadurch Ergebnisse, welche der Situation im Nativgewebe außerordentlich nah kommen dürften.

7. Arbeitsmedizinische Betrachtung zu den Laufmitteln Hexan und Heptan in der HPLC

7.1. Allgemeines

Die Vergleichbarkeit der von verschiedenen Arbeitsgruppen als Standard benutzten Chromatogramme der Retinoide lässt z. T. vieles zu wünschen übrig. Durch die Benutzung verschiedenster Laufmittel, wie Freon (Bridges,1980), Dioxan (Alvarez, 1984) oder Hexan (Besler,1993) als Haupteluenten ist durch die unterschiedlichen Trenneigenschaften ein Vergleich der erstellten Chromatogramme nur schwerlich möglich. In erster Linie interessierte uns nun, einen Eluenten zu finden, mit dem auch die exakte Auftrennung der in kleinen Mengen vorkommenden Isomeren möglich ist und gleichzeitig in einer vernünftigen Laufzeit pro Messung eine optimale Darstellung der Isomeren 13-cis, 11-cis, 9-cis und all-trans. Seit Einführung der HPLC in unser Labor richteten wir uns nach den Vorgaben einer Arbeitsgruppe um Bridges (1987), die eine Auftrennung der Retinoide mit einem Gemisch aus Hexan und Diethylether als Standard benutzte. Aus Gründen der Beständigkeit im Hinblick auf den Verdampfungsdruck und das Entstehen einer H₂O-Phase bei längerem Stehen des Diethylethers, entschlossen wir uns dann jedoch zum Einsatz von tertiärem Butylmethylether als zweitem Eluenten. Zum Vergleich schließlich zu anderen Arbeitsgruppen wurden dann auch Messungen mit Dioxan durchgeführt, um einen Eindruck von dessen Trenneigenschaften auf unserer Anlage zu bekommen (Besler, 1993).

7.2. Arbeitsmedizinische Betrachtung zu Hexan und Heptan

7.2.1. Hexan

Nach Befragung der im Institut ebenfalls tätigen Arbeitsmediziner des Instituts und der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin hinsichtlich der von uns verwendeten Lösungsmittel zur HPLC nach gelegentlichem Auftreten von Haut- und Schleimhautreizungen der Mitarbeiter, wurden von arbeitsmedizinischer Seite Einwände gegen den Einsatz von Hexan in der HPLC erhoben, zumindest sollten strengere Arbeitsschutzmaßnahmen unsererseits ergriffen werden.

Diese Hinweise auf die Gefährlichkeit von Hexan veranlassten uns, den Einsatz von Hexan generell zu überdenken. Hexan war ursprünglich von uns als Eluent gewählt worden, weil in zahlreichen arbeitsmedizinischen Berichten immer wieder auf die kanzerogenen Eigenschaften des bis dahin benutzten Dioxans verwiesen wurde und wir mit dem Einsatz von Hexan eigentlich eine Gefährdung der im Labor Tätigen vermeiden wollten. Bei näherer Betrachtung der Einwände der Arbeitsmediziner gegenüber Hexan wurde uns allerdings bewusst, dass auch Hexan nicht unbedingt die optimale Variante in bezug auf die Laufmittel sein konnte.

Hexan, chemische Summenformel C_6H_{14} , gehört zur Gruppe der aliphatischen Kohlenwasserstoffe und entsteht bei der petrochemischen Verarbeitung von Rohöl (Chemisch relevante Daten finden sich dazu in Tabelle 7. 1.). Industriell wird es als Antiklopfmittel in Motorenölen, sowie als organisches Lösungsmittel weit verbreitet genutzt. N-Hexan ist nach arbeitsmedizinischen Untersuchungen wohl die toxischste Kohlenwasserstoffverbindung aus der Reihe der Alkane. Direkter Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten führt akut oft zu Nausea, Schwindel, sowie zu bronchialen und gastrointestinalen Irritationen (Jorgensen et al. , 1981). Zusätzlich kann es nach inhalativer Aufnahme zu Kopfschmerzen und Konzentrationsstörungen kommen. Im Tierexperiment sind bei akuter Exposition auch Effekte auf das periphere und zentrale Nervensystem beschrieben worden (Patty et Yant, 1980).

Chronische Exposition und Intoxikation mit n-Hexan wurde von verschiedenen Forschungsgruppen dokumentiert (Battistini et al. , Paulson et al. , Herskowitz et al.), welche die längerfristigen Effekte des n-Hexans zu eruieren versuchten. Dabei fand sich, dass es bei chronischer Exposition hauptsächlich zu peripheren Neuropathien, zu chronischen Exanthenen und zu zirrhotischen Leberveränderungen bei den dauerhaft exponierten Personen kommen kann. Dabei scheint das mikropathologische Substrat zu den Neuropathien eine Demyelinisierung und Entmarkung des peripheren Nerven zu sein, elektrophysiologisch sind Veränderungen in den Muskel- und Nervenaktionspotentialen nachweisbar, wie auch Verlangsamungen in den Nervenleitungsgeschwindigkeiten (Iida et al., 1969; Mutti et al., 1982). Langfristig kann insgesamt das Bild der sogenannten "Hexacarbonneuropathie" entstehen, deren Kennzeichen eine distal-symmetrische, sensorische Polyneuropathie vom "Handschuh-" bzw. "Strumpf"-Muster ist.

Verantwortlich dafür sind die, beim Abbau in der Leber entstehenden, Metaboliten des n-Hexan, wie 2-Hexanol, 2-Hexanon und das hochtoxische 2,5-Hexandion (Spencer, 1982; Foa et al. , 1976). Diese entstehen in den Cytochrom-P-450-abhängigen Oxidationsprozessen, dem der Stoff in der Leber unterworfen ist. Normalerweise entstehen so aus dem lipophilen n-Hexan hydrophile Abbauprodukte, die schließlich direkt oder in glucoronidierter Form über die Nieren ausgeschieden werden. Bei Vorschädigung der Leber, beispielsweise entzündlicher oder ethyltoxischer Natur, kann dieser Abbauprozess verlangsamt oder eingeschränkt sein, so dass lipophile toxische Zwischenprodukte entstehen und in der Leber verbleiben. Diese führen durch eine zytotoxische Reaktion zu Umbauvorgängen mit reparativen Bindegewebsproliferationen und damit zu dem Bild einer Zirrhose (Perbellini et al. , 1979).

Für unseren Fall weiterhin interessant ist eine Untersuchung zu Mischexpositionen gegenüber n-Hexan und Ethanol bzw. Toluol (Dornow, 1989), in welcher sich bestätigte, dass eine kombinierte Einwirkung von n-Hexan und einem weiteren Lösungsmittel offenbar weitaus gesundheitsschädlicher ist, als bei einer isolierten Exposition. Eine Exposition gegenüber einer Reinsubstanz ist ohnehin für den Alltag in einem Labor nur von theoretischer Bedeutung, da es fast immer zur Anwendung verschiedener Substanzen gleichzeitig kommt. Dornow inaugurierte in seiner Arbeit, dass Stoffkombinationen mit Hexan dessen Toxizität potenziert, offenbar dadurch, dass Stoffe wie beispielsweise Ethanol die Stoffwechselschritte zum Hexanabbau verlangsamen und damit die Exkretion drastisch vermindern. Ob das auch im Zusammenwirken mit tertiärem Butylmethylether, mit Diethylether oder Petroleumbenzin der Fall ist, welche als gängige Lösungsmittel in unserem Labor zur Probenherstellung verwendet werden, zeigt diese Arbeit allerdings nicht auf, die dargestellten Zusammenhänge lassen aber dennoch Vermutungen in diese Richtung zu.

Leichte akute Reaktionen auf Hexanexposition konnten auch in unserem Labor bereits beobachtet werden. Obwohl bereits einige Veränderungen vorgenommen wurden, zum Beispiel wurde in unserem Labor ein zweiter Abzug installiert, unter welchem die gesamte HPLC-Anlage in einer Art Schutzummantelung installiert wurde, konnte ein völliger Schutz vor Kontakt mit Hexan nicht erreicht werden. Das liegt zum einen daran, dass zum Auffüllen der Vorratsbehälter der HPLC-Eluenten immer wieder Hexandämpfe in die Raumluft entweichen können, zum anderen das auch beim Entleeren des Auffanggefäßes nicht sicher zu vermeiden ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist außerdem, dass aufgrund der schon im vorhergehenden Teil angesprochenen Temperaturempfindlichkeit der Säule ein Öffnen der Fenster während eines Messtages zum Durchlüften im Hinblick auf konstante Messergebnisse nicht möglich ist. Auch wenn wir uns sicher sind, dass der für die Industrie definierte MAK-Wert von 50 ppm nicht oder zumindest nicht ständig in unserem Labor erreicht wird, entschlossen wir uns dennoch im Hinblick auf die oben angesprochenen gesundheitsgefährdenden Aspekte, eine Alternativsubstanz zum n-Hexan zu finden.

7. 2. 2. Heptan

Auf der Suche nach einem geeigneten Ersatzstoff orientierten wir uns zunächst an den Eigenschaften des Hexans, mit welchem ja per se gute Trennergebnisse in unseren HPLC-Messungen erreicht wurden. Wir entschlossen uns schließlich, auf n-Heptan umzusteigen, mit welchem schon kurzfristig einmal HPLC-Probemessungen in unserem Labor durchgeführt worden waren, welche den Anschein erweckten, als seien die Trenneigenschaften des Heptans in bezug auf die Retinoide nicht schlechter, was die Darstellung der kleineren Isomere betrifft (Besler 1993). Zum anderen ist für Heptan ein um den Faktor 10 höherer MAK-Wert definiert, 500 ppm, welcher uns Anlass zur Vermutung gab, dass das n-Heptan doch deutlich weniger toxische Wirkungen zeigen musste, als das Hexan bzw. diese erst in viel höheren Raumluftkonzentrationen zum Tragen kämen.

N-Heptan, chemische Summenformel C_7H_{16} , aus der Reihe der Alkane ist hinsichtlich seiner akuten und chronischen Wirkungen auf den Organismus des Menschen weitaus weniger gut untersucht als das n-Hexan. Hinsichtlich seines Einsatzgebietes gilt ungefähr das, was auch schon für Hexan dargestellt wurde. Die relevanten Eigenschaften des n-Heptans sind in Tabelle 7. 1. zusammenfassend dargestellt. Erwähnenswert sei an dieser Stelle nur, dass Heptan industriell zunehmend dort eingesetzt wird, wo Hexan durch seinen höheren Verdampfungsdruck von 160 hPa (gegenüber 48 hPa bei Heptan) nicht eingesetzt werden kann. Hinsichtlich seiner Viskosität, seiner Verdampfungswärme und, für uns sehr wichtig, seiner UV-Licht-Durchlässigkeit bestehen zum Hexan nur geringe Unterschiede (siehe auch Tabelle 7. 1.).

Aus arbeitsmedizinischer Sicht scheint das Heptan im Hinblick auf seine akuten Wirkungen im und am menschlichen Organismus nur wenig signifikante Unterschiede zum n-Hexan aufzuweisen. So wurde auch hier in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass akuter Kontakt oder Ingestion Nausea, Erbrechen, Schwindel, Kopfschmerzen und gastrointestinale Irritationen hervorrufen kann (Patty et Yant, 1980; Nelson et al., 1982). Zudem kommt es häufig schon initial zu neuropathischen Symptomen, wie gustatorischen Sensationen, feinmotorischen Koordinationsstörungen, sowie zu neuromuskulären Übertragungsstörungen im Sinne von Doppelbildern und Lichtadaptionstörungen. Direkter Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten wird als sehr schmerzhaft und als brennende Empfindung beschrieben. Alle diese Symptome sind jedoch nach Expositionsende relativ rasch vollständig reversibel. Insgesamt sind zum Auslösen solcher zentralnervöser und abdomineller Symptome wesentlich höhere Atemluftkonzentrationen bzw. Ingestionsmengen erforderlich, als beim Hexan (Sandmeyer, 1990), soweit die angewandten Tierversuchsstudien auf den Menschen übertragbar sind.

Obwohl auch für Heptan ähnliche neurotoxische Effekte diskutiert werden, wie sie bei Hexan-Exponierten gesehen wurden, konnte eine abschließende Beurteilung zu diesem Thema in der Literatur von uns nicht entdeckt werden. Aus den meisten Abhandlungen resultierte, dass beim Heptan zwar vergleichbare Akutreaktionen beobachtet werden konnten, aber chronische Wirkungen, wie sie beim Hexan beschrieben wurden, nicht in gleichem Maße auftreten können. Der Abbau des Heptans im Organismus erfolgt über dem n-Hexanabbau sehr ähnliche Wege, nämlich Cytochrom-P-450-abhängig auf oxidativem Wege. Hochtoxische Zwischenprodukte wurden dabei nicht gefunden.

In unserem Labor konnten während der Heptan-Nutzung in der HPLC keine akuten Intoxikationserscheinungen entdeckt werden. Es traten weder Kopfschmerzen auf, noch gab es lokale Effekte im Sinne von Haut- bzw. Schleimhautreizungen. Da das Heptan insgesamt weniger Tendenzen zu Ausgasung zeigt, machte sich allerdings bemerkbar, dass kaum noch Lösungsmittelgerüche im Labor wahrzunehmen waren und wir daher auch annehmen können, dass der Arbeitsplatzgrenzwert von 500 ppm in unserem Labor nicht erreicht wird.

Tabelle 7. 1.

	<u><i>Hexan</i></u>	<u><i>Heptan</i></u>
Chemische Summenformel	C₆H₁₄	C₇H₁₆
Schmelzpunkt	- 94°C	- 90°C
Siedepunkt	+ 68°C	+ 98°C
Flammpunkt	- 22°C	- 4 °C
Dampfdruck bei 20°C	160 hPa	48 hPa
Viskosität bei 20°C	0,31 mPas	0,4 mPas
Sättigungskonzentration bei 20°C	563 g/m³	196 g/m³
UV-Durchlässigkeit bei 210 nm	min. 50%	min. 50%
220 nm	min. 80%	min. 80%
245 nm	min. 96%	min. 98%
MAK - Wert (1993)	50 ppm	500 ppm

7. 3. Diskussion

Die bisher dargestellten Zusammenhänge sollten nur als Nebenaspekte der HPLC-chromatografischen Trennung von Retinoidisomeren verstanden werden. Allerdings ergibt sich aus den dargestellten Zusammenhängen eindeutig, dass chronische Lösungsmittlexpositionen auch in solchen Fällen, wie wir sie in unserer täglichen Arbeit erleben, so weit wie möglich vermieden werden sollten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Heptan aus arbeitsmedizinischer Sicht, natürlich nur unter dem Blickwinkel des heutigen Forschungsstandes, eindeutig Vorteile in der Anwendung als HPLC-Eluent aufweist. Zum einen sind die Auswirkungen auf den Organismus bei Exposition, besonders im Hinblick auf chronische Gesundheitsschäden, offenbar deutlich geringer als beim Hexan.

Zum anderen sind akute toxische Effekte nur bei höheren Wirkstoffkonzentrationen zu beobachten, was sich schließlich auch in einem wesentlich höher angesiedelten MAK-Wert niederschlägt.

Trotz zum Teil erheblicher Bedenken gegen die Definition der MAK-Werte und deren Interpretation seitens unserer Pharmakologie bleibt doch festzuhalten, dass bestimmte Grenzwerte auch für den begrenzten Arbeitsbereich Labor wie in unserem Falle Beachtung finden sollten, um das Risiko einer Gefährdung der im Labor tätigen Personen möglichst zu minimieren, gerade wenn es sich dabei um Stoffe handelt, die eine hohe Affinität zu biologischem Gewebe besitzen. Daneben besitzt das Heptan als Laufmittel in der HPLC Eigenschaften, welche eine bessere Auftrennung der Isomeren von Retinal, Retinol und Retinylpalmitat ermöglicht, was schon im vorangegangenen Kapitel dargestellt wurde.

Es konnte somit von unserer Seite aus ein doppelt positiver Effekt erzielt werden: Erstens die von uns gewünschte Optimierung der Peakauftrennung bei unverändertem Säulenmaterial und zweitens der Ersatz eines de facto gefährlichen Arbeitsstoffes durch einen zumindest mindergefährlichen. Auf einen weiteren Aspekt, nämlich die Laufmittlersparnis und eine damit verbundene Kostenreduktion pro erfolgter Messung wird in der Diskussion der Gesamtarbeit noch eingegangen werden.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse

8. 1. Einleitung

Da vorliegende Arbeit aus vielen Teilaspekten besteht und daher zu jedem Kapitel eine separate Diskussion erfolgt ist, soll an dieser Stelle zur besseren Übersicht noch einmal eine Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse erfolgen.

Das Hauptaugenmerk bei unseren Untersuchungen lag auf der Qualität der Messergebnisse nach dem Ersatz von n-Hexan durch n-Heptan als Haupteluent der HPLC der Retinoide, da wir, gestützt auf frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, verbesserte Trenneigenschaften des n-Heptans bei Retinolmessungen beobachten konnten und nun Untersuchungen für Retinal und Retinylpalmitat durchführen wollten. Hauptziel war dabei die Erfassung der Trennleistungen und die damit verbundene Schaffung neuer Standards, nebenbefundlich sollte aber auch die Wirtschaftlichkeit und arbeitsmedizinische Verträglichkeit der modifizierten Methodik untersucht werden.

Als zweiter Schritt erfolgten anschließend Untersuchungen zur Isomerenkonfiguration im Nativgewebe (Froschaugen, Pinealorgane), zum einen als Anwendungserprobung der neuen Methodik, zum anderen zur Beurteilung der Isomerenkonfiguration bei Hell-/Dunkeladaptation des Gewebes zur weiteren Erforschung des Sehvorganges.

8. 2. Qualität der neuen Messstandards mit dem Eluenten n-Heptan

Ausgehend von den Ergebnissen von Besler und Nöll (1994), führten wir zunächst Messreihen mit Retinolisomeren durch, um die in diesen Arbeiten vermuteten verbesserten Trennleistungen unter n-Heptan zu kontrollieren. Hierbei ließ sich feststellen, dass die erstellten Chromatogramme im Vergleich zu n-Hexan-Messungen von besserer Qualität waren. Sämtliche Peaks waren bis zur Baseline hin vollständig voneinander zu trennen und damit die Substanzmenge der Einzelsomeren einer exakten Berechnung zugänglich. Besonders deutlich wird das in bezug auf das 9-cis-Isomer, bei welchem vorher eine komplette Trennung vom all-trans Retinol-Peak nicht möglich war. Die Ausbeute an Einzelsomeren blieb gegenüber den Messungen mit n-Hexan identisch, ebenso die Reihenfolge ihrer Elution.

Zu Messungen von Retinalisomeren mit dem neuen Eluenten n-Heptan lagen bislang noch keine Daten vor. Wir begannen daher unsere Untersuchungen mit Messungen unter Verwendung von n-Hexan, welche wir als Vergleichsgrundlage benutzen konnten. Nach der Schaffung dieser Standards stellten wir die HPLC-Anlage auf n-Heptan um. Gravierende qualitative Unterschiede der Chromatogramme konnten nach erfolgter Kalibrierung der Anlage auf die neuen Bedingungen im Vergleich der beiden Lösungsmittel nicht sicher nachgewiesen werden. Wie schon bei den n-Hexan-Messungen konnten auch jetzt sämtliche bereits vorher bekannten Isomeren nachgewiesen werden, die Reihenfolge ihrer Elution war unverändert. Eine Verbesserung der Trennleistung, im Sinne von besserer Separation der Peaks voneinander war in diesem Fall nicht nachweisbar.

Vergleichende Aussagen zur Trennqualität bezüglich des Retinylpalmitats und seiner Isomeren sind an dieser Stelle nicht möglich, da in unserem Labor zuvor keine weitergehenden Untersuchungen zu deren chromatografischen Trennung durchgeführt wurden. Zu den vorliegenden Messergebnissen ist zusammenfassend zu sagen, dass uns der Nachweis und die Identifikation der für uns relevanten Isomeren in den Chromatogrammen ausreichend gelang und als Grundlage zu weiteren Untersuchungen bezüglich der Palmitatisomeren im Nativgewebe dienen kann. Durch Optimierung des derzeitigen technischen Equipments scheint eine weitere Verbesserung der Chromatogramme auf jeden Fall möglich zu sein.

Insbesondere wären durch den Einsatz eines leistungsfähigeren Gradientenformers Verbesserungen der Trennleistung zu erreichen, da das optimale Mischungsverhältnis von Heptan zu Ether jenseits von 99:1 liegen muß. Zwar versuchten wir, wie bereits im Kapitel Methodik beschrieben, durch eine manuelle Mischung einen Gradienten von 99,5:0;5 zu erhalten, dieser ließ sich aber aufgrund von Ausgasung des Etheranteils nicht konstant halten und stellte außerdem noch immer kein Optimum dar. Eine Elution der Isomeren unter Verwendung von 100% Heptan gelang nicht, so dass ein minimaler Anteil Ether absolut notwendig erscheint.

Eine weitere Möglichkeit zur besseren Trennung der Retinylpalmitatisomeren wäre die Verwendung einer modernen „Narrow-bore“-Säule, welche durch ihren extrem kleinen Innendurchmesser und ihre spezielle Gelbeschickung dafür sorgt, dass außerordentlich hohe und schlanke Peaks zur Darstellung kommen. Eventuell ist sogar eine Kombination beider Techniken notwendig, um das gewünschte Trennergebnis zu erreichen.

Insgesamt ergeben sich aus diesem Zusammenhang Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten, da zu der Identifikation der Palmitatisomeren bislang ohnehin nur spärliche Informationen in der Literatur zu finden sind.

8. 3. Technische Aspekte der Trennleistung unter Verwendung von Heptan

Während bezüglich der Qualität und Quantität der Trennung der Isomeren unter dem neuen Eluenten Heptan die Unterschiede zum Hexan nur punktuell sichtbar wurden, hat sich auf der technischen Seite doch einiges an Veränderungen gezeigt, die hier noch einmal zusammengefasst werden sollen.

Im Vergleich zum Hexan fiel schon zu Beginn unserer Untersuchungen ein verändertes Verhalten des Heptans bezüglich der entwickelten Drucke vor der Chromatografiesäule auf. Da wir am Hardwareequipment der HPLC-Anlage, inklusive der Silicagelsäule, nichts veränderten, mussten die auffälligen Druckwerte den differenten physikalischen und chemischen Eigenschaften zugeschrieben werden (siehe auch Tabelle 8. 1.).

Schon bei niedriger Flussgeschwindigkeit (0,5 bzw. 1ml/min) lagen die Druckwerte um fast 25 bar höher als unter Hexan. Dies wiederum hatte direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Elution der einzelnen Peaks. Unter der Verwendung von Heptan konnten die Gesamtlaufzeiten der Messungen bei identischer Qualität deutlich reduziert werden, insbesondere beim Retinol.

Während, bei optimaler Trennung aller Peaks, die Laufzeit bis zur vollständigen Elution des all-trans-Peaks des Retinols unter Hexan durchschnittlich 25 min betrug, konnte diese unter Heptan auf durchschnittlich 19 min verkürzt werden. Ähnliches galt in gleicher Weise für die Retinalmessungen. Zur besseren Übersicht sind diese Daten hier in tabellarischer Form dargestellt.

Tabelle 8. 1.

	Hexan			Heptan		
	<i>Flow</i> (ml/min)	<i>Druck</i> (bar)	<i>Elutionszeit</i> <i>all-trans-Peak</i>	<i>Flow</i> (ml/min)	<i>Druck</i> (bar)	<i>Elutionszeit</i> <i>all-trans-Peak</i>
Retinal	2,0	84	18 min	1,5	83	16 min
Retinol	4,0	179	25 min	2,5	141	19 min

Aus diesen veränderten physikalischen Verhältnissen resultierte somit eine deutliche Materialeinsparung bei gleichzeitiger Verkürzung der einzelnen Messung. Dies erscheint uns gerade vor dem Hintergrund der arbeitsmedizinischen Aspekte als wichtiges Ergebnis dieser Arbeiten (vgl. Kapitel 7).

8. 4. Die Retinoide im Nativgewebe

Während die Anwendung der neuen Methodik auf die Messungen von Isomerenextrakten aus nativem Gewebe völlig problemlos war, gestaltete sich deren Aufbereitung durchaus problematisch. Trotzdem konnten wir mit unserer Arbeit gute Vorbedingungen für weitere Untersuchungen zu dieser Thematik schaffen.

Mit den Proben aus den Pinealorganen von Regenbogenforellen versuchten wir zum einen, die nur unvollständigen Literaturvorgaben zu analysieren. Von besonderem Interesse war dabei, welche Mengen an Probenmaterial notwendig sind, um verwertbare Chromatogramme erstellen zu können. Auch hierzu waren den bereits angegebenen Literaturquellen keine präzisen Informationen zu entnehmen. Wie wir nachweisen konnten, waren zum Isomerenachweis mindestens drei Pinealorgane bzw. deren Extrakte für eine sinnvolle Darstellung erforderlich. Aber selbst bei dieser Gewebemasse konnten mit unserem Equipment nur winzige Mengen an Isomeren, insbesondere Retinalisomeren, nachgewiesen werden. Zu besserer Darstellung reichte unsere Hardware jedoch nicht aus, so dass für die Zukunft der Einsatz von anderem Säulenmaterial zu diskutieren ist.

Die weitere Differenzierung der Isomeren des Pinealorgans sollte unbedingt Gegenstand weiterer Experimente sein, da sich eventuell Ansatzpunkt für die Entwicklung von Pigmentepithel und Retina daraus ableiten lassen. Auch ist die Frage nach der Regeneration des Sehfärbstoffes der Pinealdrüse noch unbeantwortet.

Die erstellten Chromatogramme zur Isomerenkonstellation in Pigmentepithel und Retina der Froschaugen waren eine weitere Anwendungserprobung für uns. Die hier erstellten Vorlagen zu hell- und dunkeladaptierten Augen dienen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Isomerase im Pigmentepithel und zu zukünftigen Inkubationsversuchen.

8. 5. Isomerenidentifikation

Zwei wichtige Aspekte unserer Arbeit sollen abschließend noch besprochen werden. Zum einen gelang uns eine sehr gute isolierte Darstellung des 7-cis-Retinalisomers nach Belichtung von all-trans-Retinal in Acetonitril. Unter Verwendung von Hexan als Laufmittel konnte eine Darstellung des 7-cis-Isomers ohne Überlappung mit dem all-trans-Peak nicht erreicht werden, dies war nun unter Heptan problemlos möglich.

Zum anderen gelang die Identifikation von insgesamt sechs monocis- und dicis-Isomeren des Retinylpalmitats mittels Cochromatografie durch Verbesserung der Trennleistung des HPLC. Eine vergleichbare Darstellung und Benennung lag bislang in der bestehenden Literatur nicht vor. Dabei scheint eine noch bessere Auflösung der Peaks und die Identifikation weiterer Isomeren durch eine Anpassung der Hardware der HPLC in der Zukunft erreichbar. Wünschenswert wäre hierzu ein Photodiodenarray, um in einem Lauf unterschiedliche maximale Absorptionen der Retinoide berücksichtigen und deren Trennung damit vereinfachen zu können. Untersuchungen hierzu sollen weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

9. Literaturverzeichnis

- Alvarez, R. A. , Bridges, C. D. B. & Fong, S. -L. (1981). High-pressure liquid chromatography of fatty acid esters of retinol isomers. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 20, 304 - 313.
- Barry, R. J. , Canada, F. J. & Rando, R. R. (1989). Solubilization and Partial Purification of Retinyl Ester Synthetase and Retinoid Isomerase from Bovine Ocular Pigment Epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, No. 16, 9231-9238.
- Barua A. B. , Olson J. A. (2000). Beta-carotene is converted primarily to retinoids in rats in Vivo. *J. Nutr.* 130, 1996-2001.
- Barua A. B. , Olson J. A. (1998). 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. *J Chromatogr B* 707, 69-79
- Bernstein, P. S. (1987). Biochemistry and pharmacology of rhodopsin regeneration in the vertebrate eye. *PhD dissertation Harvard University, U. S. A.*
- Bernstein, P. S. , Law, W. C. & Rando, R. R. (1987a). Isomerization of all-*trans*-retinoids to 11-*cis*-retinoids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* , 84, 1849-1853.
- Bernstein, P. S. , Law, W. C. & Rando, R. R. (1987b). Biochemical Characterization of the Retinoid Isomerase System of the Eye. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, No. 35, 16848-16857.
- Besler, K. (1993). Die Retinoide im Pigmentepithel des Auges von Frosch und Rind (Untersuchungen zur Regeneration des Rhodopsins). *Thesis, Justus-Liebig Universität Giessen, Germany.*

- Besler, K. & Nöll, G. N. (1992). HPLC of retinoids: Replacement of toxic 1, 4-dioxane And *n*-hexane by *tert*-butylmethylether and *n*-heptane. *Pflügers Archiv*, 420, R48, 189.
- Besler, K., Knecht, U. & Nöll, G. N. (1994). Replacement of toxic mobile phases commonly used in high performance liquid chromatography of retinoids. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 350, 182-184.
- Bhat, V. , DeLuca, L. M. & Wind, M. L. (1980). Reverse phase high pressure liquid Chromatography separation of retinoids, including retinyl phosphate and mannosyl retinyl phosphate. *Analytical Biochemistry*, 102, 243-248.
- Bhat, P. V. & Lacroix, A. (1991). Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol deficient diet. *Canadian Journal of Physiological Pharmacology*, 69, 826-830.
- Bhat, P. V. , Thanh, Co H. & Lacroix, A. (1983). Effect of 2-alkanols on the separation of geometric isomers of retinol in non-aqueous high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 260, 129-136.
- Blackshaw S. , Snyder S. H. (1997). Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. *J Neurosci*. 17 (21), 8074-82
- Borhan B., Souto M. L., Imai H. , Shichida Y., Nakanishi K . (2000). Movement of retinal along the visual transduction. *J. path. Science*. 288 (5474):2209-12
- Bownds, D. & Wald, G. (1965). Reaction of the Rhodopsin chromophore with sodium borohydride. *Nature*, 205, 254-257.
- Bridges, C. D. B. (1975). Storage, distribution and utilization of vitamin A in the eyes of adult amphibians and their tadpoles. *Vision Research*, 15, 1311-1323.

- Bridges, C. D. B. (1976 a). Vitamin A and the role of the pigment epithelium during Bleaching and regeneration of rhodopsin in the frog eye. *Experimental Eye Research*, 22, 435-455.
- Bridges, C. D. B. (1976b). 11-*cis* vitamin A in dark-adapted rod outer segments is a probable source of prosthetic groups for rhodopsin biosynthesis. *Nature*, 259, 247-248.
- Bridges, C. D. B. (1984). Retinoids in Photosensitive systems. In Sporn, M. B. , Roberts, A. B. & Goodman, D. S. (Eds), *The Retinoids*, 2, (pp. 125-176). Academic Press, Orlando.
- Bridges, C. D. B. (1990). High-Performance Liquid Chromatography of Retinol Isomers: An Overview. *Methods in Enzymology*, 189, 60 - 69.
- Bridges, C. D. B. & Alvarez, R. A. (1982). Measurement of the Vitamin A Cycle. *Methods in Enzymology*, 81, 463-485.
- Bridges, C. D. B. & Alvarez, R. A. (1987). The visual cycle operates via an isomerase acting on all *trans*-retinol in the pigment epithelium. *Science*, 236, 1678-1680.
- Bridges, C. D. B., Alvarez, R. A., Fong, S. -L., Gonzales-Fernandez, F., Lam, D. M. K. & Liou, G. I. (1984). Visual cycle in the mammalian eye: Retinoid-binding proteins and the distribution of 11-*cis*-retinoids. *Vision Research*, 24, No. 11, 1581-1594.
- Bridges, C. D. B. , Fong, S. -L. & Alvarez, R. A. (1980a). Separation by programmed-gradient high-pressure liquid chromatography of vitamin A isomers, their esters, aldehydes, oximes and vitamin A₂: Presence of retinyl ester in dark-adapted goldfish pigment epithelium. *Vision Research*, 20, 355-360.
- Bruening R. C. , Derguini F und Nakanishi K. (1986): Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of retinal mixtures. *Journal of Chromatography* 361, 437-441.

- Canada, F. J. , Law, W. C. , Rando, R. R. , Yamamoto, T. , Derguini, F. & Nakanishi, K. (1990). Substrate specificities and mechanism in the enzymatic processing of vitamin A into 11-*cis*-retinol. *Biochemistry*, 29, 9690-9697.
- Chan C. , Leung I. , Lam K. W. , Tso M. O. (1998). The occurrence of retinol and carotenoids in human subretinal fluid. *Curr Eye Res.* 17, 890-5
- Chase G. W. Jr. , Eitenmiller R. R. , Long A. R. (1999). Analysis of beta-carotene in medical food by liquid chromatography with matrix solid-phase dispersion. *J AOAC Int.* 82, 663-5
- Chen H. , Howald W. N. , Juchau M. R. (2000). Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from all-trans-retinol: catalysis of all-trans-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. *Drug Metab Dispos.* 28, 315-22
- Chichili G. R. , Nohr D. , Schaffer M. , von Lintig J. , Biesalski H. K. (2005). Beta-Carotene conversion into vitamin A in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* ; 46(10), 3562-9.
- Cia D. , Bonhomme B. , Azim M. , Wada A. , Doly M. , Azais-Braesco W. (2000). A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method to analyze retinal isomers. *J Chromatogr A.* 864, 257-62
- Craft N. E. , Haitema T. , Brindle L. K. , Yamini S. , Humphrey J-H. , West K. P. Jr. (2000). Retinol analysis in dried blood spots by HPLC. *J Nutr.* 130, 882-5
- De Leenheer, A. P, Nelis, H. J. , Lambert, W. E. & Bauwens, R. M. (1988). Chromatography of fat-soluble vitamins in clinical chemistry. *Journal of Chromatography*, 429, 3-58.
- Deigner, P. S. , Law, W. C. , Canada, J. & Rando, R. R. (1989). Membranes as the Energy Source in the Endergonic Transformation of Vitamin A to 11-*cis*-Retinol. *Science*, 244, 968-971.

- Di Pierro D. , Tavazzi B. , Lazzarino G. , Galvano M. , Bartolini M. , Giardina B. (1997). Separation of representative lipid compounds of biological membranes and lipid derivatives from peroxidized polyunsaturated fatty acids by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Free Radic Res.* 307-17
- Dornow, R. (1989) Zur Gefahrstoffkinetik von n-Hexan bei kombinierter oder konkurrierender Einwirkung von Toluol und Ethanol. *Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*
- Engelhardt, H. (1977). Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Springer-Verlag, Berlin.
- Evans B. L. , Smith S. B. (1997). Analysis of esterification of retinoids in the retinal pigmented epithelium of the Mitf-vit (vitiligo) mutant mouse. *Mol Vis.* 24, 3-11
- Fischer A. J. , Wallman J. , Mertz J. R. , Stell W. K. (1999). Localization of retinoid Binding proteins, retinoid receptors, and retinaldehyde dehydrogenase in the chick eye. *J Neurocytol.* 28, 597-609
- Fishkin N. E. , Sparrow J. R. , Allikmets R. , Nakanishi K. (2005) Isolation and characterization of a retinal pigment epithelial cell fluorophore: an all-trans-retinal dimer conjugate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 102(20), 7091-6.
- Fong, S. -L. , Bridges, C. D. B. & Alvarez, R. A. (1983). Utilization of exogenous retinol by frog pigment epithelium. *Vision Research*, 23, 47-52.
- Frolik, C. A. & Olson, J. A. (1984). Extraction, Separation, and Chemical Analysis of Retinoids. In Sporn, M. , Roberts, A. B. & Goodman, D. S. (Eds), *The Retinoids*, 1 (pp. 181-233). Academic Press, Orlando.
- Fulton, B. S. & Rando, R. R. (1987). Biosynthesis of 11-*cis*-Retinoids and Retinyl Esters by Bovine Pigment Epithelium Membranes. *Biochemistry*, 26, 7938-7945.

- Furr H. C., (2004) Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *J Nutr.* ;134(1):281S-285S.
- Gilardi, R. , Karle, I. L. , Karle, J. & Sperling, W. (1971). Crystal structure of the visual chromophores, 11-cis and all-*trans* retinal. *Nature*, 232, 187-189.
- Grobner G. , Choi G. , Burnett I. J. , Glaubitz C. , Verdegem P. J. , Lugtenburg J. , Watts A. (1998). Photoreceptor rhodopsin: structural and conformational study of its chromophore 11-cis retinal in oriented membranes by deuterium solid state *NMR*. *FEBS Lett.* 422, 201-204
- Groenendijk, G. W. T. , Jansen, P. A. A. , Bonting, S. L. & Daemen, F. J. M. (1980). Analysis of Geometrically Isomeric Vitamin A Compounds. *Methods in Enzymology*, 67, 203-219.
- Gundersen T. E. , Blomhoff R. (1999). On-line solid-phase extraction and isocratic separation of retinoic acid isomers in microbore column switching system. *Methods Enzymol.* 299, 430-41
- Gundersen T. E. , Lundanes E. , Blomhoff R. (1997). 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. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 691, 43-58
- Hollmann, P. , Slangen, J. , Wagstaffe, P. , Faure, U. , Southgate, D. , Finglas P. (1993). Intercomparison of Methods for Determination of Vitamins in Foods. *Analyst* , 118, 475-480.
- Janebova M. , Zima T. (1997). Methods for determination of vitamins A and E our simple HPLC assay. *Sb Lek.* 195-208.

- Jang G. F. , McBee J. K. , Alekseev A. M. , Haeseleer F. , Palczewski K. (2000). Stereoisomeric specificity of the retinoid cycle in the vertebrate retina. *J Biol Chem.* 275, 28128-38
- Kusmic, C. , Barsanti, L. , Passarelli, V. , Gualtieri, P. (1993). Photoreceptor Morphology and Visual Pigment Content in th Pineal Organ an in the Retina of Juvenile and Adult Trout, *Salmo irideus*. *Micron.* , 24, 279-286.
- Landers, M. (1990). High-Performance Liquid Chromatography of Retinoid Isomers. *Methods in Enzymology*, 189, 70-80.
- Landers, G. M. & Olson, J. A. (1984). Statistical solvent optimization for the separation of geometric isomers of retinol by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 291, 51-57.
- Lane J. R. , Webb L. W. , Acuff R. V. (1997). Concurrent liquid chromatographic separation and photodiode array detection of retinol, tocopherols, all-trans-alpha-carotene, all-trans-beta-carotene and the mono-cis isomers of beta-carotene in extracts of human plasma. *J Chromatogr A.* 787, 111-8
- Li Z. , Zhuang J. , Corson D. W. (1999). Delivery of 9-Cis retinal to photoreceptors from bovine serum albumin. *Photochem Photobiol.* 69, 500-4
- Lin S. W. , Sakmar T. P. (1999). Colour tuning mechanisms of visual pigments. *Novartis Found Symp.* 224:124-35; discussion 135-41, 181-90. Review
- Lin Z. Y. , Li G. R. , Takizawa N. , Si J. S. , Gross E. A, Richardson K. , Nickerson J. M. (1997). Structure-function relationships in interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). *Mol Vis.* 30;3-17.

- von Lintig J. , Vogt K. (2000). Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem.* 275, 11915-20
- Liou, G. I. , Bridges, C. D. B. , Fong, S. -L. , Alvarez, R. A. & Gonzales-Fernandez, F. (1982). Vitamin A transport between retina and pigment epithelium - an interstitial protein carrying endogenous retinol (interstitial retinol-binding protein). *Vision Research*, 22, 1457-1467.
- Liou G. I. , Matragoon S. , Chen D. M. , Gao C. L. , Zhang L. , Fei Y. , Katz M. L. , Stark W. S. (1998). Visual sensitivity and interphotoreceptor retinoid binding protein in the mouse: regulation by vitamin A. *FASEB J.* , 129-38
- Livrea, M. A. & Tesoriere, L. (1989). All-*trans* to 11-*cis*-Retinol isomerase activity in Nuclear membrane of bovine retinal pigment epithelium from the eyes. *Manuscript, personal communication.*
- Livrea, M. A. , Tesoriere, L. & Bongiorno, A. (1991). All-*trans* to 11-*cis*-retinol isomerization in nuclear membrane fraction from bovine retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, 52, 451-459.
- Mata N. L. , Villazana E. T. , Tsin A. T. (1998). Colocalization of 11-*cis* retinyl esters and retinyl ester Hydrolase activity in retinal pigment epithelium plasma membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 1312-9
- Max M. , Surya A. , Takahashi J. S. , Margolskee R. F. , Knox B. E. (1998). Light-dependent activation of rod transducin by pineal opsin. *J Biol Chem.* 273, 26820-6
- McBee J. K. , Kuksa V. , Alvarez R. , de Lera A. R. , Prezhdo O. , Haeseleer F. , Sokal I. , Palczewski K. (2000). Isomerization of all-*trans*-retinol to *cis*-retinols in bovine retinal pigment epithelial cells: dependence on the specificity of retinoid-binding proteins. *Biochemistry.* 39, 11370-80.

McCaffery et al.(2002) Retinoid quantification by HPLC. *J Lipid Res.* 43 (7), 1143-1149

McCormick, A. M. , Napoli, J. L & DeLuca, H. F. (1978). High-Pressure Liquid Chromatographic Resolution of Vitamin A Compounds. *Analytical Biochemistry*, 86, 25-33.

McCormick, A. M. , Napoli, J. L. & DeLuca, H. F. (1980). High-Pressure Liquid Chromatography of Vitamin A Metabolites and Analogs. *Methods in Enzymology*, 67, 220 - 233.

Mertz J. R. , Shang E. , Piantedosi R. , Wei S. , Wolgemuth D. J. , Blaner W. S. (1997). Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis-retinol oxidation. A possible role in 9-cis-retinoic acid formation. *J Biol Chem.* 272, 11744-9

Murayama A. , Suzuki T. , Matsui M. (1997). Photoisomerization of retinoic acids in ethanol under room light: a warning for cell biological study of geometrical isomers of retinoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 167-76

Moise AR et al. Identifikation of all-trans-retinol : alltrans 13, 14-dihydroretinol saturase, *J Biol Chem.* 2004 55 (3), 233-252

Nakamura A. , Kojima D. , Imai H. , Terakita A. , Okano T. , Shichida Y. , Fukada Y. (1999). Chimeric nature of pinopsin between rod and cone visual pigments. *Biochemistry.* 38, 14738-45

Nöll, G. N. (1986). Über die Regeneration des Sehfärbstoffes in den Stäbchen der Vertebratennetzhaut. R. G. Fischer Verlag, Frankfurt.

Nöll G. N. , Becker C. (2000) High-performance liquid chromatography of non-polar retinoid isomers. *J Chromatogr A.* 881, 183-8

- Noy N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J.* 3:481-95.
Review
- Okajima T. L. , Pepperberg D. R. (1997). Retinol kinetics in the isolated retina determined by retinoid extraction and HPLC. *Exp Eye Res.* 65, 331-40
- Ostroy S. E. (1998). Altered rhodopsin regeneration in diabetic mice caused by acid conditions within the rod photoreceptors. *Curr Eye Res.* 17, 979-85
- Paanakker, J. E. & Groenendijk, G. W. T. (1979). Separation of geometric isomers of retinyl esters, retinal and retinol, pertaining to the visual cycle, by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 168, 125-132.
- Paik J, Vogel S, Piantedosi R, Sykes A, Blaner WS, Swisshelm K. (2000). 9-cis-retinoids: biosynthesis of 9-cis-retinoic acid. *Biochemistry.* 39, 8073-84
- Parry J. W. , Bowmaker J. K. (2000). Visual pigment reconstitution in intact goldfish retina using synthetic retinaldehyde isomers. *Vision Res.* 40, 2241-7.
- Pottek M. , Weiler R. (2000). Light-adaptive effects of retinoic acid on receptive field properties of retinal horizontal cells. *Eur J Neurosci.* 12, 437-45
- Qian H. , Sheng M. (1998). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr A.* 825, 127-33
- Rademska, R. , Dubrucki, M. (2000). The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters. *Int J Pharm.* 196, 131-4
- Rando, R. R. (1990). Die Chemie des Vitamins A und des Sehvorgangs. *Angewandte Chemie*, 102, 507-526.

- Rattner A, Smallwood P. M. , Nathans J. (2000). Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem.* 275, 11034-43
- Redmond T. M. , Yu S. , Lee E. , Bok D. , Hamasaki D. , Chen N. , Goletz P. , Ma J. X. , Crouch R. K. , Pfeifer K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet.* 20, 344-51
- Saari, J. C. (1982). Isolation of Cellular Retinoid-Binding Proteins from Bovine Retina with Bound Endogenous Ligands. *Methods in Enzymology*, 81, 819-826.
- Saari, J. C. & Bredberg, D. L. (1988). CoA- and Non-CoA-dependent Retinol Esterification in Retinal Pigment Epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, No. 17, 8084-8090.
- Saari, J. C. , Bredberg, L. & Garwin, G. G. (1982). Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, No. 22, 13329-13333.
- Saari J. C. , Garwin G. G. , Van Hooser J. P. , Palczewski K. (1998). Reduction of all-trans-retinal limits regeneration of visual pigment in mice. *Vision Res.* 38, 1325-33
- Saari, J. C. , Bunt-Milam, A. H. , Bredberg, D. L. & Garwin, G. G. (1984). Properties and immunocytochemical localization of three retinoid-binding proteins from bovine retina. *Vision Research*, 24, No. 11, 1595-1603.
- Sakhi A. K. , Gundersen T. E. , Ulven S. M. , Blomhoff R. , Lundanes E. (1998). Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection. *J Chromatogr A.* 828, 451-60

- Salo, M. , Vuorela, H. , Halmekoski, J. (1993). Effect on the organic Modifier on the Retention of Retinoids in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 36, 147-151.
- Serbecic N., Ehmann AK. (2004), Reduction of lipid peroxidation and apoptosis in corneal endothelia cells. *Ophthalmologie* 2004 Nov 10
- Shimizu T. , Ishiguro S. , Tamai M. (1998). Isomerization of 11-cis-retinol to all-trans-retinol in bovine rod outer segments. *J Biochem (Tokyo)*. 123, 953-8
- Schraermeyer U. , Heimann K. (1999). Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res.* 12, 219-36
- Schwieter, U. , Englert, G. , Rigassi, N. & Vetter, W. (1970). Physical organic methods in carotenoid research. *Pure Applied Chemistry*, 20, 365-420.
- Shintaku T. , Murata T. , Yamaguchi K. , Makita T. (1998). Detection of retinyl palmitate and retinol in the liver of mice injected with excessive amounts of retinyl acetate. *J Vet Med Sci.* 60, 471-7
- Soderpalm A. K. , Fox D. A. , Karlsson J. O. , van Veen T. (2000). Retinoic acid produces rod photoreceptor selective apoptosis in developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 937-47
- Sperling, W. , Carl, P. , Rafferty, Ch. N. & Dencher, N. A. (1977). Photochemistry and Dark Equilibrium of Retinal Isomers and Bacteriorhodopsin Isomers. *Biophysics of Structure and Mechanism*, 3, 79-94.
- Srivastava R. , Goldsmith T. H. (1997). On the mechanism of isomerization of ocular retinoids by the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Biol.* 200 (Pt 3), 625-31

- Stancher, B. & Zonta, F. (1982a). Comparison between straight and reversed phases in the high-performance liquid chromatographic fractionation of retinol isomers. *Journal of Chromatography*, 234, 244-248.
- Stancher, B. & Zonta, F. (1982b). High-performance liquid chromatographic determination of carotene and Vitamin A and its geometric isomers in foods. *Journal of Chromatography*, 238, 217-225.
- Stancher, B. & Zonta, F. (1984a). High-performance liquid chromatography of the unsaponifiable from samples of marine and freshwater fish: fractionation and identification of retinol (Vitamin A₁) and dehydroretinol (Vitamin A₂) isomers. *Journal of Chromatography*, 287, 353-364.
- Stecher H, Gelb M. H. , Saari J. C. , Palczewski K. (1999). Preferential release of 11-cis-retinol from retinal pigment epithelial cells in the presence of cellular retinaldehyde-binding protein. *J. Biol Chem.* 274, 8577-85
- Stecher H. , Prezhdo O. , Das J. , Crouch R. K. , Palczewski K. (1999). Isomerization of all-trans-9- and 13-desmethylretinol by retinal pigment epithelial cells. *Biochemistry.* 38, 13542-50
- Sun J. (1999). Liquid chromatographic determination of carotenoids and vitamins A and E in multivitamin tablets. *JAOAC Int.* 82, 68-72
- Surya A. , Knox B. E. (1998). Enhancement of opsin activity by all-trans-retinal. *Exp Eye Res.* 66, 599-603
- Tabata, M. , Suzuki, T. , Niwa, H. (1985). Chromophores in the extraretinal photoreceptor (Pineal organ) of teleosts. *Brain Research Elsevier*, 173-177.

- Tanumihardjo S. A. (2000). Vitamin A Status Assessment in Rats with (13)C(4)-Retinyl Acetate and Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry. *J Nutr.* 130, 2844-2849.
- Timmers, A. M. M. (1987). Bovine retinal pigment epithelium studied in vitro. *PhD dissertation, University of Nijmegen, The Netherlands.*
- Timmers, A. M. M. & de Grip, W. J. (1990). Analysis of the Visual Cycle by Short-Term Incubation of Isolated Retinal Pigment Epithelial Cells. *Methods in Enzymology*, 190, 3-17.
- Timmers, A. M. M. , Dratz, E. A. , De Grip, W. J. & Daemen, F. J. M. (1984). A New Isolation Procedure for Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 25, No. 9, 1013-1018.
- Timmers, A. M. M. , van Groningen-Luyben, D. A. H. M. & de Grip, W. J. (1991). Uptake and Isomerization of all-*trans*-Retinol by Isolated Bovine Retinal Pigment Epithelial Cells: Further Clues to the Visual Cycle. *Experimental Eye Research*, 52, 129-138.
- Trevino S. G. , Villazana-Espinoza E. T. , Muniz A. , Tsin A. T. (2005) Retinoid cycles in the cone-dominated chicken retina. *J Exp Biol.* ; 208 (Pt 21), 4151-7.
- Tsukamoto H. , Terakita A. , Shichida Y., (2005) A rhodopsin exhibiting binding ability to agonist all-*trans*-retinal. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102(18), 6303-8.
- Tsukida, K. , Kodama, A. & Ito, M. (1977). Simultaneous Determination of *cis-trans* isomeric retinals by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 134, 331-336.
- Tsukida, K. , Kodama, A. , Ito, M. , Kawamoto, M. & Takahashi, K. (1977). The Analysis of *cis-trans* isomeric Retinols by high-speed liquid chromatography. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 23, 263-264.

- Ulven S. M. , Gundersen T. E. , Weedon M. S. , Landaas V. O. , Sakhi A. K. , Fromm S. H. , Geronimo B. A. , Moskaug J. O. , Blomhoff R. (2000). 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. *Dev Biol.* 220, 379-91.
- Van Breemen R. B. , Nikolic D. , Xu X. , Xiong Y. , van Lieshout M. , West C. E. , Schilling A. B. (1998). 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. *J Chromatogr A.* 794, 245-51
- Van Breemen R. B. , Huang C. R. (1996). High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of retinoids. *FASEB J.* 10, 1098-101
- Vecchi, M. , Vesely, J. & Oesterhelt, G. (1973). Applications of high-pressure liquid chromatography and gas chromatography to problems in vitamin A analysis. *Journal of Chromatography*, 83, 447-453.
- Vogel S. , Mendelsohn C. L. , Mertz J. R. , Piantedosi R. , Waldburger C. , Gottesman M. E. , Blaner, W. S. (2000). Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol. *Journal of Biol Chem.* 5
- Wang Y. , Xu X. , van Lieshout M. , West C. E. , Lugtenburg J. , Verhoeven M. A. , Creemers A. F. (2000). A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of bioavailability and bioconversion of beta-carotene to retinol in humans. *Anal Chem.* 72, 4999-5003.
- Weiler R. , Pottek M. , He S. , Vaney D. I. (2000). Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. *Brain Res Brain Res Rev.* 32, 121-9. Review.

- Williams, R. C. , Schmit, J. A. & Henry, R. A. (1972). Quantitative Analysis of the Fat-Soluble Vitamins by High-Speed Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science, Vol. 10*, 494-501.
- Wingerath T. , Kirsch D. , Spengler B. , Stahl W. (1999). Analysis of cyclic and acyclic analogs of retinol, retinoic acid, and retinal by laser desorption ionization-, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and UV/Vis spectroscopy. *Anal Biochem. 272*, 232-42
- Winston A. , Rando R. R. (1998). Regulation of isomerohydrolase activity in the visual cycle. *Biochemistry 2044-50*
- Wolf G. (1998). Transport of retinoids by the interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Nutr Rev. 56*, 156-8
- Wyss, R. (1990). Chromatography of retinoids. *Journal of Chromatography, 531*, 481-508.
- Wyss, R. & Bucheli, F. (1988). Quantitative analysis of retinoids in biological fluids by high-performance liquid chromatography using column switching. *Journal of Chromatography, 424*, 303-314.
- Wyss R. , Bucheli F. (1997). 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. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 700*, 31-47.
- Ye L. , Landen W. O. , Eitenmiller R. R. (2000). Liquid chromatographic analysis of all-trans-retinyl palmitate, beta-carotene, and vitamin E in fortified foods and the extraction of encapsulated and nonencapsulated retinyl palmitate. *J Agric Food Chem. 48*, 4003-8.
- Yoshikami, S. & Nöll, G. N. (1978). Isolated retinas synthesize visual pigments from retinol congeners delivered by liposomes. *Science, 200*, 1393-1395.

Zonta, F. & Stancher, B. (1984). High-performance liquid chromatography of retinals, retinols (Vitamin A₁) and their dehydro homologues (Vitamin A₂): improvements in resolution and spectroscopic characterization of the stereoisomers. *Journal of Chromatography*, 301, 65-75.

10. Anhang

10.1. Zusammenfassung / Summary

Die enzymatische Umwandlung von all-trans in 11-cis Retinol im Rahmen des Sehzyklus ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Um ein modifiziertes Nachweisverfahren der Sehfärbstoffe mittels HPLC zu etablieren, ersetzten wir das als HPLC-Lösungsmittel gängige n-Hexan durch n-Heptan aufgrund der Tatsache, dass eine frühere Arbeit der Forschungsgruppe Hinweise auf eine deutlich bessere Trennqualität erbrachte und führten hierzu Untersuchungen an den in-vitro entstehenden Isomeren des Retinals, des Retinols und des Retinylpalmitats durch. Hierbei gelang die Identifizierung des 7-cis Isomers, die Darstellung der häufigsten dicis- und tricis-Isomeren, sowie die Cochromatografie der Isomeren des Retinylpalmitats. Bei Untersuchungen im Nativgewebe konnten wir die Isomerenkonstellation in der hell- und der dunkeladaptierten Vertebratennetzhaut darstellen und auch Fehlerquellen in der Probenaufbereitung beschreiben. Mit Einschränkungen gelang auch die Darstellung von Sehfärbstoffisomeren in Pinealisdrüsen von Regenbogenforellen. Die Gesamtarbeit wurde ergänzt durch eine vergleichende Darstellung der HPLC-Messungen unter n-Hexan und n-Heptan als Haupteluenten und um eine arbeitsmedizinische Betrachtung zum Einsatz dieser Lösungsmittel in der HPLC.

The enzymatic transformation from all-trans in 11-cis-retinaldehyde in visual cycle is subject of intensive investigation. To establish a modified method for identification of retinoid isomers with high performance liquid chromatography, we replaced the usual solvent in HPLC, n-hexane, to n-heptane, because a former study in our team showed the possibility of a better separation of the retinoid isomers. We performed HPLC-investigation on in-vitro isomers of retinaldehyde, retinol and retinylpalmitate, in which we reached the identification of 7-cis retinaldehyde. It was also possible to figure the frequent dicis and tricis isomers and to perform co-chromatography of the isomers of retinylpalmitate. In then investigating retinae of vertebrates, we were able to figure the retinoid isomers in light- and darkadapted retinae and to describe some errors in preparing the samples. Additionally we took some samples from trout pineal organs to isolate retinoid isomers. Finally we added a comparing abstract of all samples in using n-hexane and n-heptane as main solvent in HPLC of retinoids and a biochemical/medical review in using these solvents in HPLC.

10.2. Abkürzungen

Nachfolgend aufgelistet sind die im Text verwendeten Abkürzungen und Symbole.

Aqua dest.	Aqua destillata
BME	Butylmethylether
hPa	Hektopascal (Druck)
HPLC	High performance liquid chromatography
KBH_4	Kaliumborhydrid
NaBH_4	Natriumborhydrid
nm	Nanometer
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
mbar	Millibar (Druck)
min	Minute
ml	Milliliter
ppm	parts per million
rel.U.	relative Units
t-BME	tertiärer Butylmethylether
λ	Lambda (Wellenlänge)
μg	Mikrogramm
2,2,2 TFE	2,2,2 Trifluorethanol

10.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation eigenständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 27.09.2006

Christian Becker

Wichtige Teile dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Nöll G., Becker C., (2000) High-performance liquid chromatography of non-polar retinoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 881 (2000), 183-188

10.4. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Christian Theodor Becker
 Anschrift: Am Burggarten 6
 61209 Echzell
 Geburtsdatum: 03. Februar 1968
 Geburtsort: Friedberg (Hessen)
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1974-1978 Grundschule an der Kurt-Moosdorf-Schule, Echzell
 1978-1987 Internatsgymnasium Institut Lucius, Echzell

Grundwehrdienst

1987-1988 4./Panzerbataillon 64, Wolfhagen

Hochschulbildung

1989-1995 Studium der Humanmedizin an der
 Justus-Liebig-Universität Giessen

Abschluss Staatsexamen, Gesamtnote: gut

Beruflicher Werdegang

1995-1996 Arzt im Praktikum in der Chirurgischen Abteilung
 des Kreiskrankenhauses Giessen in Lich

Approbation als Arzt

- 1996-1997 Assistenzarzt in der Nephrologischen Praxis
Drs. Keim und Fink in Darmstadt und Dieburg
- 1997-1999 Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Krankenhauses
Balsersische Stiftung in Giessen.
- 1999-2001 Assistenzarzt in der allgemeinmedizinischen Praxis
Manfred Henrich in Grünberg
Facharztprüfung zum Facharzt für Allgemeinmedizin, Frankfurt/Main
- seit 2001 Niedergelassener Facharzt für Allgemeinmedizin in
Gemeinschaftspraxis mit Manfred Henrich in Grünberg

Veröffentlichungen

Nöll G., Becker C., (2000) High-performance liquid chromatography of non-polar retinoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 881 (2000), 183-188

10.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gottfried Nöll für die Überlassung des Promotionsthemas und seine wertvolle, unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit, sowie den Mitarbeitern des Physiologischen Instituts.

Ich danke meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter, die mir meine Ausbildung erst ermöglicht hat.