

# **Methodenentwicklung zum Nachweis ausgewählter Iodlipide in der Schilddrüse**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
DOCTOR RERUM NATURALIUM  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie und Physik  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Lebensmittelchemikerin

**Mandy Koch**

geboren am 27.05.1982 in Ilmenau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Lorenz
2. Prof. Dr. Gerrit Schüürmann

Tag der Verteidigung: 20.05.2010

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2005 bis Oktober 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. W. Lorenz am Institut für Chemie im Arbeitsbereich Lebensmittel- und Umweltchemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale) angefertigt.

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, allen voran Prof. Dr. W. Lorenz für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit die Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen können.

Darüber hinaus gilt mein herzlichster Dank den Mitarbeitern und Kollegen des Arbeitsbereiches Lebensmittelchemie und Umweltchemie für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den vielen anderen Tätigkeiten, die nebenher zu erledigen waren. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Magdalena Abb für die anregenden Gespräche, die konstruktive Kritik und das geduldige Zuhören über die gesamte Zeit.

Auch schulde ich meinen Freunden meinen Dank für die Worte des Ansporns, die vielen lieben Wünsche und für ein Leben neben dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Familie, danken. Erst durch Eure Unterstützung war es möglich, dorthin zu gelangen, wo ich heute stehe. Danke, dass Ihr immer an mich glaubt.

**I. INHALTSVERZEICHNIS**

1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Zielsetzung.....	4
2.	ALLGEMEINER TEIL .....	5
2.1	Bedeutung von Iod und seiner Verbindungen .....	5
2.1.1	Metabolismus und Funktion .....	6
2.1.1.1	Interaktion verschiedener Nahrungsbestandteile .....	9
2.1.2	Wirkung der Schilddrüsenhormone .....	9
2.1.3	Schilddrüsen-induzierte Krankheiten bei Iodmangel .....	10
2.1.4	Schilddrüsen-induzierte Krankheiten bei Iodüberschuss.....	11
2.1.5	Iodlipide .....	12
2.1.5.1	Einteilung der Iodlipide .....	12
2.1.5.2	Biosynthese der Iodlipide .....	14
2.1.5.3	Metabolismus und Wirkung der Iodlipide .....	15
2.1.6	Enzymreaktionen .....	19
2.2	Analytische Grundlagen .....	22
2.2.1	Gaschromatographie und Elektroneneinfang-Detektor .....	22
2.2.2	Flüssigchromatographie und UV/VIS-Detektor .....	26
2.2.3	Massenspektrometrie .....	28
2.2.3.1	Ionisierung durch Elektronenstoß.....	30
2.2.3.2	Elektrospray-Ionisation.....	30
2.2.3.3	Massentrennung bei Quadrupol-Massenspektrometern.....	32
2.2.4	Gelpermeationschromatographie .....	34
2.2.5	Festphasenextraktion .....	34
2.2.6	Festphasenmikroextraktion.....	35
2.2.7	Kernresonanz-Spektrometrie .....	36
3.	EXPERIMENTELLER TEIL .....	38
3.1	Analysengeräte, Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und biologische Proben.....	38
3.2	Entsorgung .....	41
3.3	Messbedingungen .....	41
3.4	Synthese der Iodaldehyde .....	48

3.4.1	Synthese von n-Hexadecanal und n-Octadecanal .....	49
3.4.1.1	Methode nach H. Van den Bergen et al. ....	49
3.4.1.2	Optimierte Synthese .....	49
3.4.2	Synthese von 2-Iodhexadecanal und 2-Iodoctadecanal .....	49
3.4.2.1	Methode nach Pereira et al. ....	50
3.4.2.2	Methode nach H. Van den Bergen .....	50
3.4.2.3	Verwendete Synthesestrategie .....	50
3.5	Synthese der Iodlactone .....	50
3.5.1	Enzymatische Synthese .....	51
3.5.2	Nicht-enzymatische Synthese nach Kuklev und Smith .....	51
3.6	Aufarbeitung der biologischen Probe .....	53
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	55
4.1	Identifizierung der Iodaldehyde und Iodlactone .....	55
4.1.1	NMR-Spektren .....	55
4.1.2	Massenspektren .....	64
4.1.3	Schmelzpunkte .....	68
4.2	Methodenoptimierung .....	69
4.2.1	Syntheseoptimierung .....	69
4.2.1.1	Allgemeine Optimierungsversuche .....	69
4.2.1.2	Abhängigkeit von der Syntheszeit .....	71
4.2.1.3	Abhängigkeit von der eingesetzten Iod- und Quecksilber-II-Chlorid-Menge .....	73
4.2.2	Optimierung der GC-Analytik .....	74
4.2.2.1	Optimierung der Injektortemperatur .....	74
4.2.2.2	Optimierung der Detektortemperatur bei der GC-ECD-Messung .....	79
4.2.3	Optimierung der Aufarbeitung .....	80
4.2.3.1	Optimierung der Aufarbeitung für die Iodaldehyde .....	80
4.2.3.2	Optimierung der Aufarbeitung für die Iodlactone .....	84
4.2.3.3	Anreicherungsversuche mittels SPME .....	86
4.2.3.4	Optimierung der Probenaufarbeitung .....	87
4.2.4	Stabilitätsuntersuchungen .....	94
4.2.4.1	Stabilitätsuntersuchungen für die Iodaldehyde und Aldehyde .....	95
4.2.4.2	Stabilitätsuntersuchungen für die Iodlactone .....	99
4.2.5	Bestimmung der Reinheit der Iodlipide .....	101

4.2.5.1	Reinheitsbestimmung mittels GC-MS .....	101
4.2.5.2	Reinheitsbestimmung mittels Ionenchromatographie .....	103
4.2.6	Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-Methode.....	104
4.2.6.1	Optimierung der MS/MS-Parameter.....	104
4.2.6.2	Eluentenoptimierung.....	107
4.2.7	Quantifizierung der Iodaldehyde und Iodlactone .....	111
4.2.7.1	Nachweisgrenzen der Analyte .....	112
4.2.7.2	Externe Kalibrierung.....	115
4.2.7.3	Matrixangepasste Kalibrierung.....	117
4.2.7.4	Standardaddition .....	118
4.2.7.5	Wiederfindung der Aufarbeitung.....	122
4.3	Untersuchung der Schilddrüsenproben.....	127
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	135
6.	SUMMARY AND OUTLOOK.....	138
7.	LITERATURVERZEICHNIS .....	140
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	145
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	150
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	156
II.	ANHANG .....	IV
III.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	LVIII
IV.	PUBLIKATIONEN/ POSTER .....	LIX
V.	LEBENS LAUF .....	LX

## 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

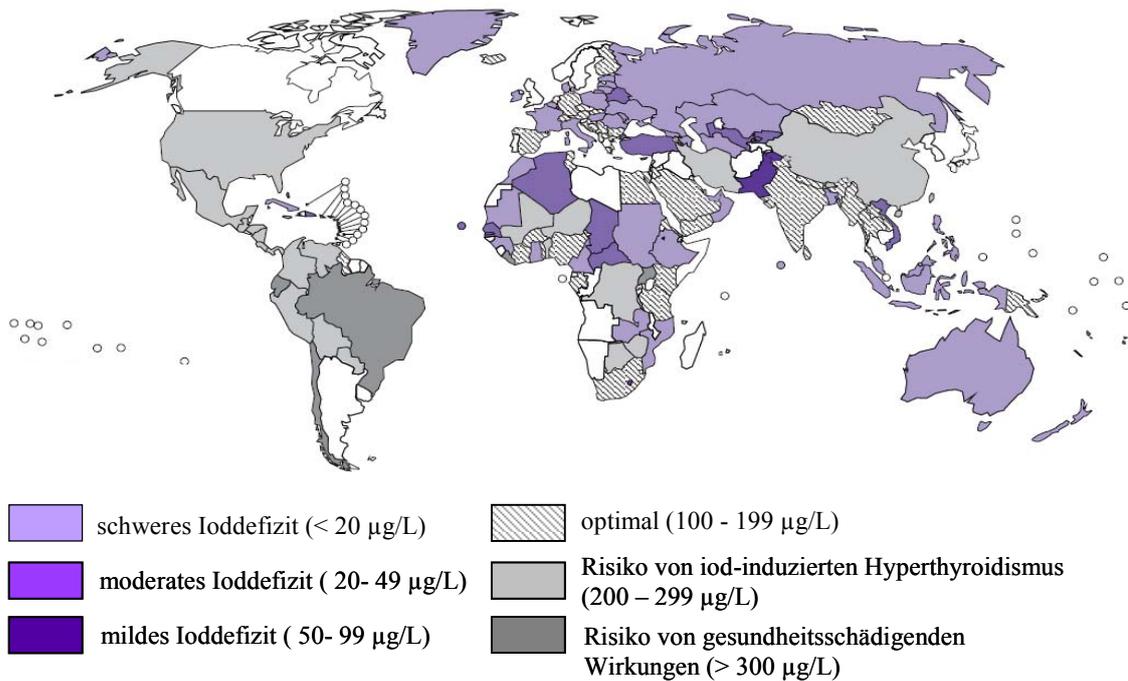
### 1.1 Einleitung

Die Schilddrüse als eine der bedeutendsten endokrinen Drüsen im menschlichen Körper, ist nicht nur der Hauptspeicherort von Iod, sondern auch der Syntheseort der bioaktiven Schilddrüsenhormone Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ). Diese beeinflussen beispielsweise die Herzfrequenz, den Blutdruck, die Bildung der roten Blutkörperchen und die Reizleitung der Muskelkontraktion und -relaxation. Die Synthese der Schilddrüsenhormone wird über den hypothalamisch-hypophysären Regelkreis und den thyreoidalen Iodgehalt reguliert. Iod stellt damit ein essentielles Spurenelement für den menschlichen Körper dar. Aufgrund der vielfältigen Wirkung der gebildeten Schilddrüsenhormone gibt es Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung für eine optimale Iodversorgung in Abhängigkeit der verschiedenen Lebensphasen (vgl. Tab. 1).

**Tab. 1: Empfohlene Zufuhr von Iod in den verschiedenen Lebensphasen**

Lebensphase	empfohlene Zufuhr von Iod
Säuglinge bis 12 Monate	80 µg/d
Kinder (1 – 4 Jahre)	100 – 200 µg/d
Erwachsene (15 – 50 Jahre)	200 µg/d
(ab 51 Jahre)	180 µg/d
Schwangere	230 µg/d
Stillende	260 µg/d

Trotz solcher Zufuhrempfehlungen leiden nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ca. 1 Milliarde Menschen weltweit unter Iodmangel und tragen damit ein erhöhtes Risiko für Iodmangelerkrankungen. Auch Deutschland zählt heute noch zu den milden Iodmangelgebieten, da eine optimale Versorgung mit Iod trotz allgemein erhältlichen iodiertem Speisesalz nicht vollständig gewährleistet werden kann [1]. Die nachstehende Abb. 1 gibt einen Überblick zur weltweiten Iodversorgungssituation.



**Abb. 1: Abschätzung der Iodversorgung weltweit anhand der mittleren unринаlen Iodausscheidung [2]**

Im Rahmen der Evolution hat der menschliche Organismus Regulationsmechanismen entwickelt, die einem Iodmangel, aber auch einer übermäßigen Iodversorgung entgegenwirken. Bei einem Iodmangel kommt es zur Größenzunahme der Schilddrüse und zu einer vermehrten Expression des Natrium-Iodid-Symporters, wodurch eine Erhöhung der Iodaufnahme gewährleistet werden soll. Ebenso existieren Regulationsmechanismen zur Verhinderung einer thyreotoxischen Krise infolge einer unsachgemäßen Iodsubstitution mit Nahrungsergänzungsmitteln oder einer Ernährung mit sehr iodreichen Lebensmitteln (Fisch und Algen), die beispielsweise in Japan zu finden ist. Hierbei werden spezifisch die Funktionen der Schilddrüse gehemmt.

Ein Teil dieser Regulationsmechanismen basieren auf der Wirkung von organischen Iodsubstanzen, die als Iodlipide bekannt sind [3 - 21].

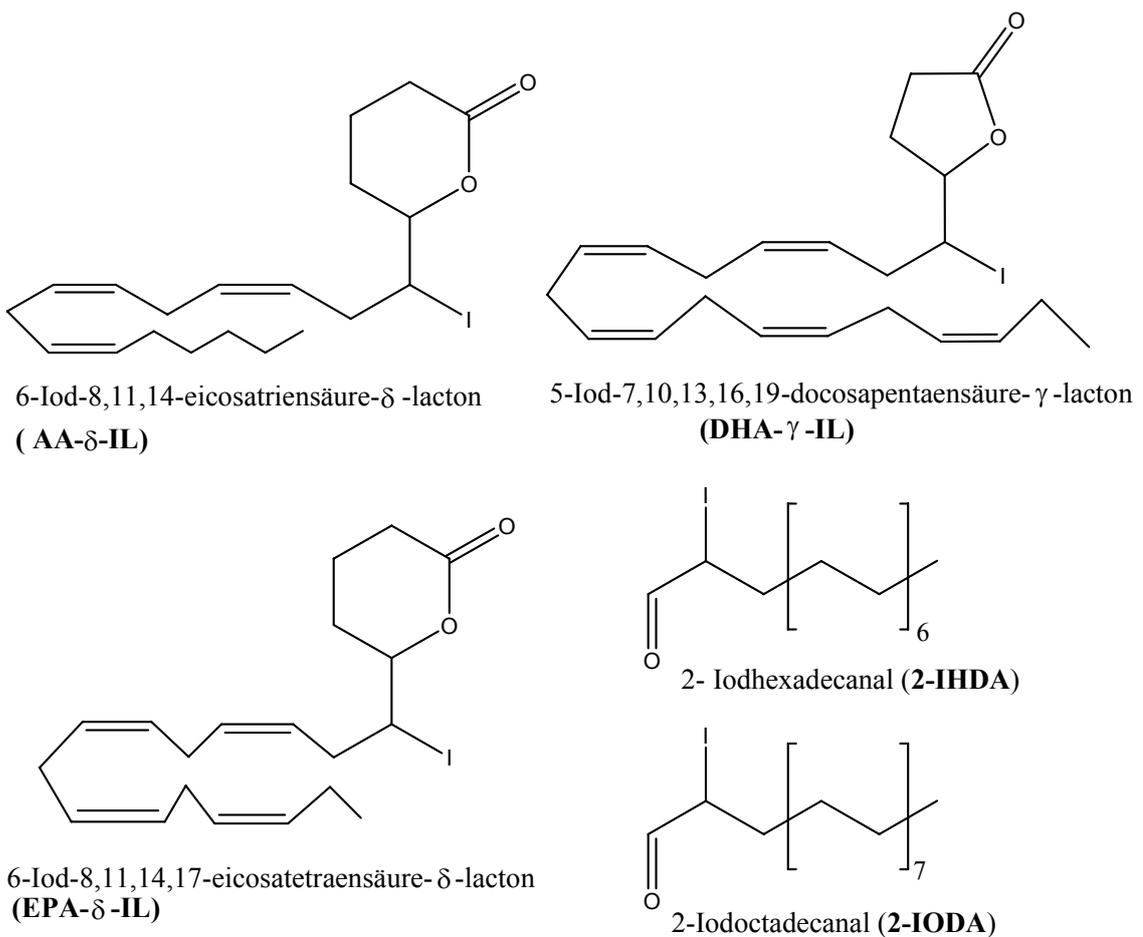
Nach Angaben der Literatur werden etwa 5 % des intrathyreoidalen Iods spezifisch in Lipide eingebaut. Die biologisch aktivsten Substanzen stammen aus der Klasse der Iodaldehyde und Iodlactone.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Analyte aus beiden Strukturklassen untersucht (vgl. Tab. 2).

**Tab. 2: Übersicht der untersuchten Iodaldehyde und Iodlactone**

Substanz	Abkürzung	Summenformel	MW [g/mol]
2-Iodhexadecanal	2-IHDA	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> IO	366,32
2-Iodoctadecanal	2-IODA	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> IO	394,17
6-Iod-8,11,14-eicosatriensäure- $\delta$ -lacton	AA- $\delta$ -IL	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> IO <sub>2</sub>	430,14
5-Iod-7,10,13,16,19-docosapentaensäure- $\gamma$ -lacton	DHA- $\gamma$ -IL	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> IO <sub>2</sub>	454,14
6-Iod-8,11,14,17-eicosatetraensäure- $\delta$ -lacton	EPA- $\delta$ -IL	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> IO <sub>2</sub>	428,12

Die chemischen Strukturen der untersuchten Analyte sind in Abb. 2 aufgezeigt.

**Abb. 2: Strukturen der untersuchten Iodaldehyde und Iodlactone**

Trotz der Bedeutung dieser Strukturen existiert derzeit kaum Fachliteratur für eine qualitative und quantitative Bestimmung der Iodlipide in Schilddrüsen. Die Identifizierung

der Iodlipide erfolgte entsprechend der Literatur mittels Massenspektrometrie, NMR-Spektrometrie und IR-Spektrometrie. Für die Quantifizierung der Iodaldehyde waren bisher zwei veröffentlichte Methoden bekannt. Zum Einen wurde eine GC/MS-Methode mit einer 1,5 m x 0,25 mm CP-Wax 52CB Kapillarsäule verwendet, zum Anderen eine GC/ECD-Methode mit einer 6 Zoll x 0,25 Zoll x 2 mm 5 % CP-Wax 51, mit einer Nachweisgrenze von 0,3 ng/µl. Angaben hinsichtlich einer Quantifizierung der Iodlactone in Schilddrüsengewebe sind allerdings nicht bekannt. Es konnten lediglich Hinweise zu Dosis-Wirkungsbeziehungen erhalten werden. So zeigten Gärtner et al. beispielsweise eine vollständige Inhibierung der EGF-induzierten Zellproliferation ab einer Konzentration von 0,8 µM Arachidonsäure-δ-Iodlacton [6, 9, 12, 14, 18, 22, 23]. Die beschriebenen Wirkungen wurden allerdings ausschließlich durch eine exogene Zufuhr von Iodlipiden hervorgerufen.

## **1.2 Zielsetzung**

Ziel dieser Dissertation ist der Nachweis von ausgewählten Iodlipiden in Schilddrüsen. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf die Substanzklassen der iodierten Aldehyde und Lactone. Um dies realisieren zu können, müssen zunächst die Standards synthetisiert und identifiziert werden. Anschließend sollen die chromatographischen Methoden soweit optimiert werden, dass ein Nachweis der beiden Substanzklassen im Gewebe innerhalb physiologischer Konzentrationen möglich ist. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Optimierung der methodenspezifischen Parameter, sowie der Probenaufarbeitung, gelegt. Die gewonnenen Ergebnisse werden abschließend auf Realproben angewendet.

## 2. ALLGEMEINER TEIL

### 2.1 Bedeutung von Iod und seiner Verbindungen

Iod, abgeleitet vom altgriechischen „*ioeides*“ (veilchenfarbig) wurde 1811 von Bernard Courtois erstmal aus der Asche von Braunalgen gewonnen. Die Wirkung dieses chemischen Elementes war aber bereits im Altertum bekannt. So wurden Kropfkranken in dieser Zeit iodhaltige Schilddrüsen von Schafen oder Aschen von Meeresschwämmen verabreicht [24].

Iod steht in der 7. Hauptgruppe des Periodensystems und zählt zu den Halogenen (Salzbilder). Es besitzt eine relative Atommasse von 126,90 g/mol und ist in allen Aggregatzuständen ein I<sub>2</sub>-Molekül. Iod kommt in der Natur mit einer Häufigkeit von 100 % als das stabile Isotop <sup>127</sup>I vor. Weitere Bedeutung haben die weniger stabilen radioaktiven Iod-Isotope <sup>123</sup>I (Halbwertszeit 13 Stunden), <sup>128</sup>I (Halbwertszeit 25 Minuten) und <sup>131</sup>I (Halbwertszeit 8 Tage). Sie werden bzw. wurden (<sup>131</sup>I) in der Medizin für die Diagnostik und Therapie der Schilddrüse eingesetzt.

Iod ist wie alle Halogene chemisch sehr reaktiv und ist somit nicht elementar vorzufinden. Die wichtigsten auf der Erde vorkommenden anorganischen Iodverbindungen sind Natriumiodat (NaIO<sub>3</sub>) als Begleitsubstanz des Chilesalpeters, Natriumperiodat (NaIO<sub>4</sub>) und Lautarit (Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Die mittlere Iodkonzentration in Meerwasser beträgt circa 60 ppb, ist aber starken Schwankungen unterlegen [25].

In der Biosphäre kommen organische Iodverbindungen vor allem in marinen Lebewesen, wie Algen, Tangen, Schwämmen und Korallen vor, so dass über die Nahrungskette auch Meeresfische einen größeren Anteil an Iod enthalten.

Ein weiterer Eintrag von Iod in den menschlichen Organismus stellt iodiertes Speisesalz dar. Zur Nahrungsergänzung dürfen nach der europäischen Richtlinie 2002/46/EG vom 10. Juni 2002 nur Natriumiodid, Kaliumiodid, Natriumiodat und Kaliumiodat eingesetzt werden, während zur Iodierung von Speisesalz nach der Zusatzstoff-Verkehrsverordnung vom 10. Juli 1984 nur die Iodate verwendet werden dürfen [26].

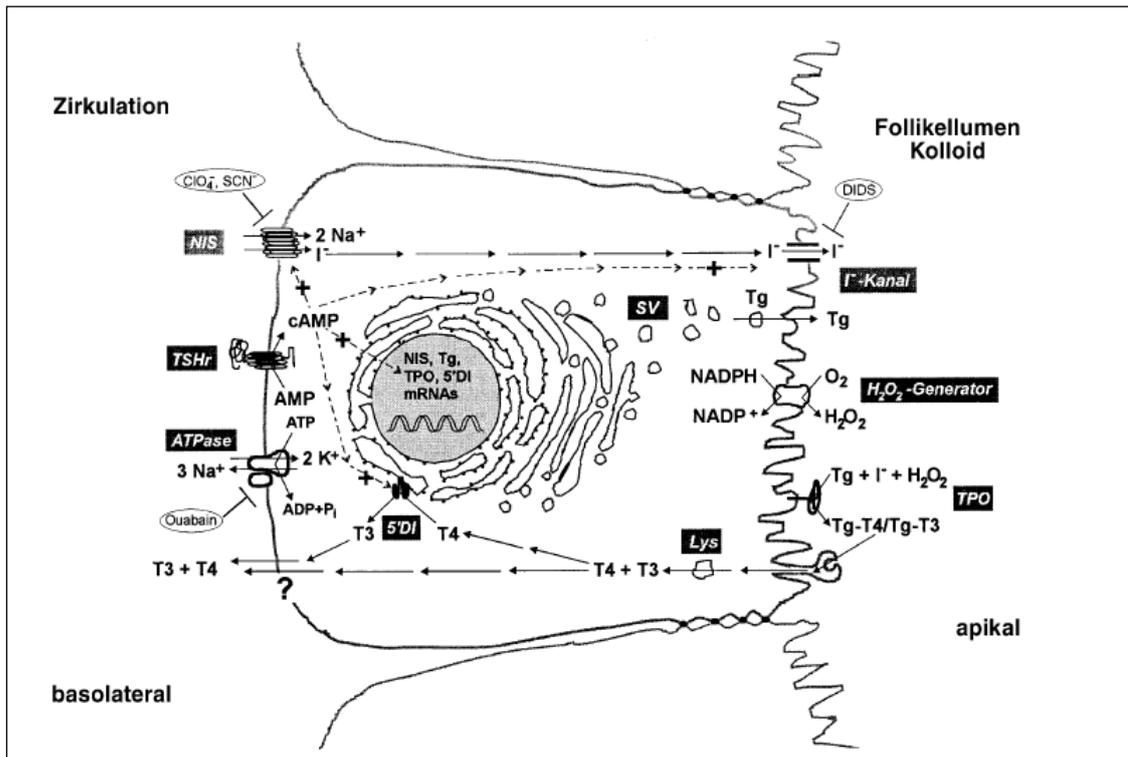
Von ernährungsphysiologischer Bedeutung für den Menschen sind außerdem noch Milch und Milchprodukte (2,5 bis 12,5 µg Iod/100 g), Brot (8,5 µg Iod/100 g) und Eier (9,8 µg Iod/100 g) [27].

Die Schilddrüse ist der Hauptspeicherort im menschlichen Organismus, in ihr sind circa 70-80 % des humanen Iods lokalisiert. Des Weiteren ist Iod noch zu kleinen Teilen im Magen, der Speicheldrüse und in den Brustdrüsen zu finden. Intrathyreoidal ist die

größte Menge des Iods nach aktiver Anreicherung an das Thyreoglobulin gebunden, während 5 % spezifisch in Lipide (Iodlactone und Iodaldehyde) eingebaut sind [1, 28]. Iod ist demnach essentiell für den menschlichen Körper, da über die gebildeten Schilddrüsenhormone die verschiedensten Funktionen aufrechterhalten werden können. Diese werden im Kapitel 2.1.2 näher beschrieben.

### 2.1.1 Metabolismus und Funktion

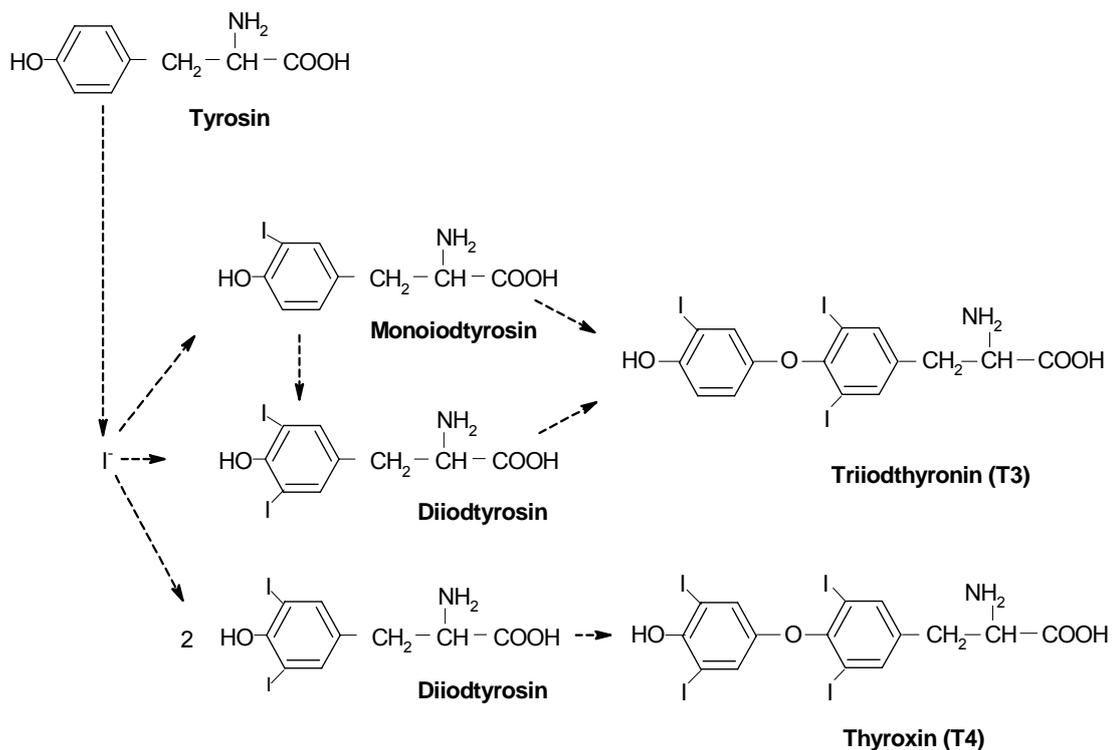
Mit der Nahrung aufgenommenes Iodid ( $I^-$ ) wird im Dünndarm resorbiert, wohingegen Iodat durch eine nicht-enzymatische Reaktion zunächst zu Iodid reduziert werden muss und dann dem Organismus zur Verfügung steht [26, 29]. Nach der Resorption wird Iodid über die Blutbahn zur Schilddrüse (oder einen anderen Bestimmungsort) transportiert.



**Abb. 3: Iodidaufnahme durch die basolaterale und Schilddrüsenhormonsynthese an der apikalen Zellmembran der Thyreozyten [30]**

Die Aufnahme in die Schilddrüse erfolgt über einen spezifischen Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der sich an der basolateralen Zellmembran der Thyreozyten befindet (vgl. Abb. 3). Gegen das Konzentrationsgefälle werden dabei zwei Natrium-Ionen und ein Iodid-Ion in die Schilddrüsenzelle transportiert. Die aufgenommene Menge Iodid wird durch den intrathyreoidalen Iodidspiegel und das in der Hypophyse gebildete schilddrüsen-stimulierende Hormon (TSH) reguliert. Durch den apikal lokalisierten

Ionenkanal wird  $I^-$  an den Kolloidraum der Thyreozyten weitergeleitet, wo es durch Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Als Zwischenprodukt entsteht „aktiviertes“ Iodid. Die Oxidation wird durch die schilddrüsenspezifische Peroxidase (TPO) katalysiert, die auch für die Übertragung des aktivierten Iodids auf die Tyrosylreste des Thyreoglobulins und die Kopplung von den Schilddrüsenhormonvorstufen Monoiodthyrosin (MIT) und Diiodthyrosin (DIT) zu den Schilddrüsenhormonen Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) verantwortlich ist (siehe Abb. 4). Alle diese gebildeten Iodverbindungen sind an das Thyreoglobulin im Kolloid gebunden [1, 26, 28 - 34].

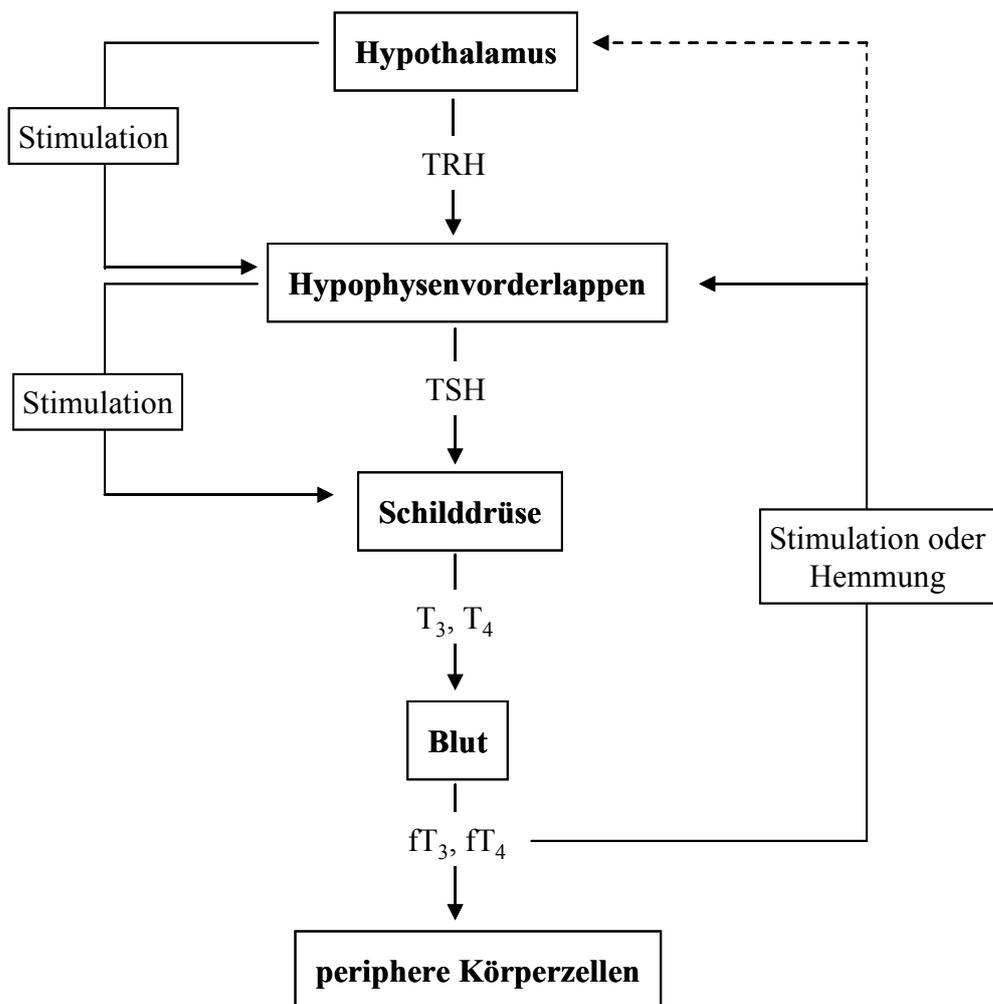


**Abb. 4: Bildung der Schilddrüsenhormone  $T_3$  und  $T_4$**

Bei Bedarf werden die an Thyreoglobulin gebundenen Hormone wieder in die Thyreozyte aufgenommen, durch Enzyme hydrolysiert, so dass das Prohormon  $T_4$  und in geringen Maßen das bioaktive Hormon  $T_3$  freigesetzt, in die Blutbahn abgegeben und zum Bestimmungsort transportiert werden kann. In der Peripherie kann  $T_4$  durch selenabhängige Deiodasen in  $T_3$  umgewandelt werden.

Überschüssiges Iodid wird über die Niere und den Urin ausgeschieden. Auf diese Weise können über die urinale Iodidausscheidung Rückschlüsse über den Iodidgehalt der Nahrung bzw. die Iodversorgung gezogen werden.

Die Synthese und Ausscheidung der Schilddrüsenhormone wird durch den hypothalamisch-hypophysären Regelkreis kontrolliert (vgl. Abb. 5). In Abhängigkeit von der Menge an freigesetzten Hormonen aus der Schilddrüse und dem Stoffwechsel in der Peripherie wird aus dem Hypophysenvorderlappen mehr oder weniger stark das schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) abgesondert. Die Bildung des TSHs wird zum einen durch ein im Hypothalamus gebildetes Hormon (*Thyreotropin Releasing Hormon*, TRH) stimuliert und zum anderen durch die Konzentration an freien Schilddrüsenhormonen gehemmt.



**Abb. 5: Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis [29]**

In einer gesunden Schilddrüse wird die Synthese zudem über Autoregulationsmechanismen unabhängig vom TSH gesteuert. So reguliert zum Beispiel der intrathyreoidale Iodgehalt die Aufnahme von Iodid in die Schilddrüse [28, 29, 32].

### 2.1.1.1 Interaktion verschiedener Nahrungsbestandteile

Verschiedene Nahrungsbestandteile können die Aufnahme von Iodid und die Bildung der Schilddrüsenhormone beeinflussen. So stellen die Elemente Selen, Zink und Eisen aufgrund ihrer biologischen Notwendigkeit als Baustein in den verschiedenen Enzymen einen erhebliche Einflussfaktor dar. Selen als Selenocystein ist Teil der Deiodase Typ I, welche die Umwandlung von  $T_4$  zu  $T_3$  ermöglicht. Erkennbar ist dies durch einen erhöhten  $T_4/T_3$ -Quotienten im Blutserum.

Des Weiteren ist Selen in der Deiodase Typ II und III enthalten, welche zur Inaktivierung von  $T_3$  benötigt wird, in dem es zu inversem  $T_3$  ( $rT_3$ ) und  $T_2$  (Diiodthyronin) abgebaut wird und damit seine biologische Aktivität verliert. Nicht nur in den 3 Deiodasen ist Selen enthalten, sondern auch in den vier Glutathion-Peroxidasen und der Thioredoxin-Reduktase. Bei erheblichen Selen- und Iodmangel kommt es ohne diese beiden Enzymgruppen zu vermehrten oxidativen Schäden durch Wasserstoffperoxid, da die Schilddrüsenhormonsynthese aufgrund des fehlenden Iodids durch TSH gesteigert wird. Zink spielt im Schilddrüsenhormonstoffwechsel als ein möglicher Cofaktor für die Deiodasen Typ I eine Rolle und Eisen trägt als Zentralatom der TPO zur Bildung der Hormone bei. Ein Mangel dieser beiden Elemente wirkt sich also nachteilig für den Organismus aus.

Durch Thiocyanat, aus Tabakrauch oder einigen Gemüsearten (z.B. Kohl, Bohnen, Erdnüsse) wird die Iodidaufnahme kompetitiv gehemmt und die Hormonsynthese der Schilddrüse beeinträchtigt. Andere thyreostatisch wirkende Goitrogene hemmen dagegen die Iodierung des Tyrosins [1, 26, 32, 35 - 37].

### 2.1.2 Wirkung der Schilddrüsenhormone

Schilddrüsen entfalten in vielen Organsystemen und Stoffwechselwegen ihre Wirkung, wie zum Beispiel die vermehrte Bildung von energieverbrauchenden Proteinen ( $Na^+/K^+$ -ATPase), was einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine vermehrte Wärmebildung zur Folge hat. Allgemein steuern sie im Organismus den Stoffwechsel der Kohlenhydrate, der Fette, der Eiweiße und der Minerale.

Eine zentrale Rolle nimmt die Bindung des bioaktiven  $T_3$  an den spezifischen Hormon-Rezeptor des Zellkerns ein, wodurch die Expression von verschiedenen Genen hervorgerufen oder inhibiert wird.

In der Embryonalentwicklung aber auch in adulten Lebewesen sind die Schilddrüsenhormone wichtig für ein normales Knochenwachstum. Neben der Beeinflussung der

Expression von verschiedenen Knochenmarkern im Serum, erhöhen sie den Gehalt an alkalischer Phosphatase und von Osteocalcin in den Osteoblasten, die für den Aufbau der kollagenen Knochenmatrix benötigt werden. Daneben wird die Aktivität der Osteoklasten stimuliert, die für die Resorption von Knochenmatrix verantwortlich sind und eine überschießende Knochenbildung verhindern. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen kann während der Embryonalzeit zu einer unzureichenden Skelettausbildung oder zu Deformationen des Knochengerstes und im erwachsenen Organismus zu Osteoporose führen.

Im Herz verringern sie den systemischen Gefäßwiderstand und erhöhen das Blutvolumen. Zudem beeinflussen sie die Kontraktionskraft und die Schlagfrequenz des Herzens. Eine weitere wichtige Aufgabe der Schilddrüsenhormone liegt in der Differenzierung von braunen (Aufbau von Baufett) und weißen (Speicherfett) Fettgewebe, der Regulation des basalen Sauerstoffbedarfes, der Lipogenese und Lipolyse.

Wie vielfältig die Wirkung der Hormone sein kann, zeigt sich unter anderem in der Leber. Dort stimulieren sie die Expression von Enzymen, die die Lipogenese, die Lipolyse und oxidative Prozesse steuern. Durch die Regulation von Enzymen, wie zum Beispiel der LDL-Rezeptoren, der Cholesterolesterhydrolase und der Cholesterolacyltransferase, sind sie maßgeblich am Metabolismus und der Synthese von Cholesterol beteiligt. Ihre Aufgabe ist somit die Kontrolle von verschiedensten zellularen Stoffwechselfvorgängen und Funktionen (Gluconeogenese, Lipogenese, Insulinsignalisierung, Adenylatcyclase-signalisierung, Zellproliferation und Apoptose) in der Leber.

Eine besondere Bedeutung haben die Schilddrüsenhormone im Gehirn. Sie regeln die Sekretion von Hypophysenhormonen (z.B. TSH) und tragen während der Embryonal- und Neonatalphase zur Entwicklung des Gehirnes bei. Ohne  $T_3$  würde es durch ein verringertes Wachstum der Nervenfasern und einer eingeschränkten Vernetzung der Nervenzellen in der Großhirnrinde (*Cortex cerebri*), dem visuellen Cortex, der Hörrinde, dem Hippocampus und dem Kleinhirn zu einer mentalen Reifeverzögerung und neurologischen Defekten (Blindheit, Taubheit usw.) kommen [24, 29, 31 - 33, 38].

### **2.1.3 Schilddrüsen-induzierte Krankheiten bei Iodmangel**

Kommt es in einem Organismus zum einem Mangel der Schilddrüsenhormone  $T_3$  und  $T_4$  wird im Rahmen des hypothalamisch-hyposphärischen Regelkreises die Sekretion von TSH in der Hypophyse gesteigert. Histologisch kann ein kompensatorisches Wachstum der Schilddrüsenfollikel und eine damit verbundene Vermehrung des Schilddrüsenorgans (Hypertrophie und Hyperplasie) beobachtet werden. Eine Zu-

nahme des Gewebes kann sich bei länger andauerndem Mangel in einer Kropfbildung widerspiegeln. Betrachtet man die biochemischen Vorgänge im Organismus, erfolgt eine vermehrte Aufnahme von Iodid aus dem Plasmapool durch eine verstärkte Expression des Natrium-Iodid-Symporters, eine Sekretionszunahme von  $T_3$ , sowie eine gesteigerte thyreoidale und periphere Umwandlung von  $T_4$  in  $T_3$ .

Ein endemischer Kropf muss nicht zwangsläufig mit einer Schilddrüsenfunktionstörung einhergehen, vielmehr zeigt sich bei einer Vielzahl von Kropfpatienten ein normaler Hormonspiegel. Eine Schilddrüsenvergrößerung kann trotzdem rein mechanisch bedingte Beschwerden, wie zum Beispiel Atembeschwerden, Schluckstörungen und venöse Einflusstauung hervorrufen. Bei lang andauerndem Bestehen eines Hormondefizits können sich Strukturanomalien, wie heiße Knoten, die unabhängig von dem Bedarf des Organismus zu viele Hormone produzieren, Hypothyreose und Schilddrüsenkarzinome entwickeln. Der Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die verschiedenen Organsysteme wurde bereits im Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Ein Fehlen von  $T_3$  und  $T_4$  wirkt sich dementsprechend negativ auf diese aus. Zu den allgemeinen Symptomen des Iodmangels mit Schilddrüsenunterfunktion gehören Veränderungen des Allgemeinbefindens wie Leistungsabfall, Müdigkeit, Kälteempfindlichkeit, niedriger Blutdruck, Gewichtszunahme, Appetitlosigkeit, Verstopfung, kalte und blasse Haut und psychische Unausgewogenheit [24, 26, 29, 35, 39].

#### **2.1.4 Schilddrüsen-induzierte Krankheiten bei Iodüberschuss**

Iodexzess kann in Abhängigkeit von der Dosis und der Empfindlichkeit der betroffenen Personen zu einer Schilddrüsenüber- (Hyperthyreose) oder Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) führen und gesundheitliche Schäden hervorrufen.

Entsprechend verschiedener Studien soll eine kurzzeitige Iodaufnahme bis 1000  $\mu\text{g}$  pro Tag bei einem gesunden Erwachsenen ohne weitere Nebenwirkungen tolerierbar sein. Kommt es dagegen zu einer längerfristigen Iodaufnahme ( $> 1000 \mu\text{g}/\text{Tag}$ ) können sich die folgenden Krankheitsbilder abzeichnen:

1. Auslösung einer Hyperthyreose, insbesondere bei Vorliegen einer funktionellen Autonomie,
2. Immunthyreopathie (Fehlsteuerung des Immunsystems: Morbus Basedow),
3. Hashimoto-Thyreoiditis (immunologisch bedingte Schilddrüsenentzündung),
4. akute Blockade der Iodaufnahme in der Schilddrüse (Wolff-Chaikoff-Effekt) ohne und mit Hypothyreose sowie

5. seltene Überempfindlichkeitsreaktionen, Iodallergie oder Unverträglichkeitsreaktionen auf iodhaltige Röntgenkontrastmittel, Desinfektionsmittel, Kosmetika oder Medikamente.

Pharmakologisch wirksame Ioddosen ( $> 1000 \mu\text{g}$  Iodid/Tag) können eine akute Blockade der Iodaufnahme in die Schilddrüse (Wolff-Chaikoff-Effekt), der Iodorganifizierung und Sekretion der Schilddrüsenhormone bewirken. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Expression des Natrium-Iodid-Symporters und der TPO. Bei längerfristigem Anhalten des Zustandes sind eine Hypothyreose und eine Strumaentwicklung möglich. Bei Patienten mit strukturellen Veränderungen (z.B. autonome Adenome) oder Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (Morbus Basedow) kann eine übermäßige Iodexposition zu einer Hyperthyreose führen. Die Patienten leiden unter anderem an grundloser Nervosität, Herzklopfen, Schweißausbrüchen, einem gesteigerten Hungergefühl bei bestehender Gewichtsabnahme, Durchfall und Schlafstörungen [26, 28, 40 - 46].

### 2.1.5 Iodlipide

Wie bereits in Abschnitt 2.1.1 erwähnt wird die Schilddrüsenfunktion nicht nur durch TSH, TRH und die Schilddrüsenhormone reguliert, sondern auch durch die thyreoidale Iodidkonzentration. Das Schilddrüsenwachstum hingegen wird direkt durch autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-I, EGF, TGF- $\beta$ ) gesteuert. Diese unterliegen, wie auch die Schilddrüsenfunktion, verschiedenen Regulationsmechanismen, die indirekt mit der TSH-Konzentration und dem intrathyreoidalen Iodgehalt zusammenhängen. Während TSH hierbei nur einen modulierenden Einfluss besitzt, in dem es zu einer reversiblen Follikelhypertrophie (Organvergrößerung durch Größenzunahme einer Zelle) führen kann, wird die echte Zellproliferation durch Hyperplasie (Vergrößerung eines Organs durch vermehrte Zellteilung) aufgrund von Iodmangel hervorgerufen [28]. Im Gegensatz dazu, können bei einer ausreichenden Iodversorgung das TSH-stimulierte Zellwachstum bzw. bei einer übermäßigen Iodzufuhr die Iodaufnahme und -organifizierung gehemmt werden. Dafür verantwortliche Substanzen werden allgemein als Iodlipide bezeichnet [1, 7].

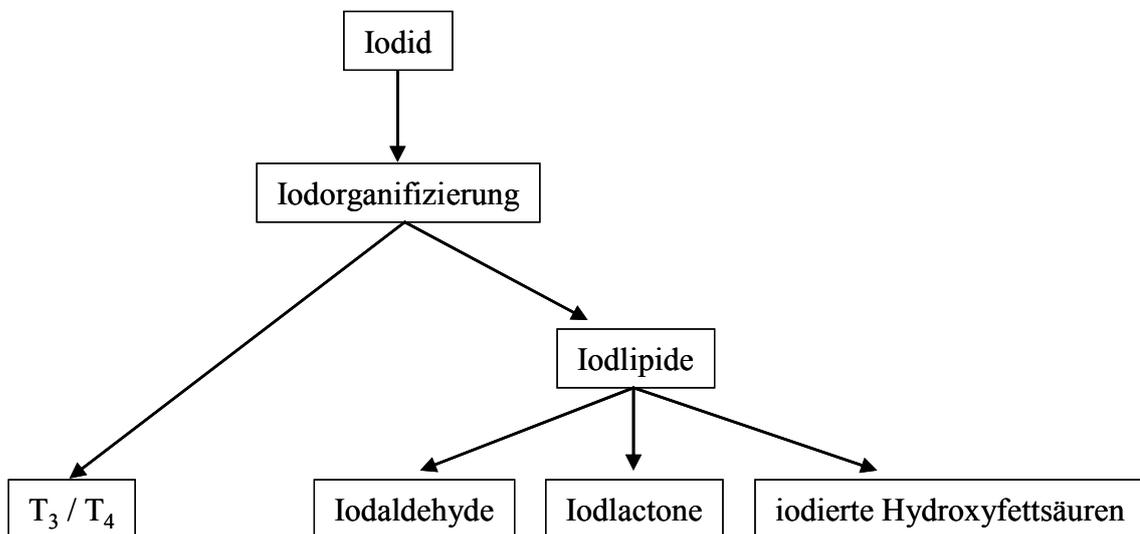
#### 2.1.5.1 Einteilung der Iodlipide

Bereits 1955 stellten Taurog et al. fest, dass bei der Inkubation von Schilddrüsenfraktionen mit  $^{131}\text{I}$  neben den Schilddrüsenhormonen und deren Vorstufen weitere stark lipophile Iodsubstanzen gebildet werden, welche nicht an Proteine gebunden sind. Die

genaue Struktur dieser Verbindungen blieb zunächst aber unbekannt [47]. Weitere Untersuchungen in den 1980er Jahren zu Autoregulationsmechanismen der Schilddrüse führten dazu, dass iodierte Derivate der Arachidonsäure in den Fokus der Aufmerksamkeit rückten. Bei der Inkubation von Arachidonsäure mit Lactoperoxidase (Modellenzym für die TPO) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, sowie bei der Inkubation von Rattenschilddrüsen konnte die Forschergruppe um Boeynaems erstmals die Bildung von Iodlactonen simulieren und diese mittels GC-MS und HPLC nachweisen [48 - 50]. Neben den Iodlactonen beschrieben 1988 Chazenbalk et al. die Wirkung von 14-Iod-15-hydroxy-5,8,11-eicosatriensäure, einem weiteren Abkömmling der Arachidonsäure, auf die Schilddrüsenfunktion [13].

Die zweite Hauptklasse der Iodlipide, die maßgeblich an der Autoregulation der Schilddrüse beteiligt ist, wurde durch Pereira et al. in Ratten- und Pferdeschilddrüsen mittels HPLC-UV, GC-MS, GC-ECD und  $^1\text{H-NMR}$  als Iodaldehyde identifiziert und nachgewiesen [22].

Die nachfolgende Abb. 6 zeigt eine Übersicht der Iodverbindungen, die bei einer ausreichenden bzw. übermäßigen Iodversorgung der Schilddrüse neben den Hormonen  $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$  gebildet werden können.



**Abb. 6: Iodverbindungen der Schilddrüse in Anlehnung an [7] und [13]**

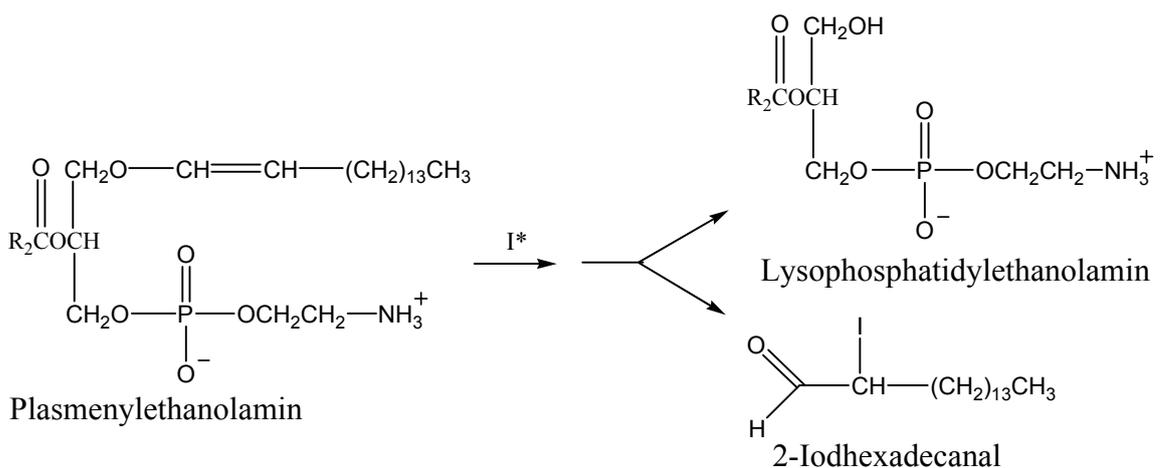
Bei den Iodaldehyden handelt sich um das 2-Iodhexadecanal und das 2-Iodoctadecanal, welche bereits in verschiedensten Geweben nachgewiesen wurden [12, 22]. Als Vertreter der Iodlactone sind die  $\delta$ -Iodlactone der Arachidonsäure, der 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure und das  $\gamma$ -Iodlacton der 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure zu nennen.

Die in-vivo-Synthese dieser beiden Verbindungsklassen wird im nachstehenden Abschnitt 2.1.5.2 näher erläutert.

### 2.1.5.2 Biosynthese der Iodlipide

Allgemein ist die Bildung der Iodlipide bedingt durch Interaktion einer aktivierten Iodspezies, welche durch die schilddrüsenspezifische Peroxidase entsteht, mit membranständigen Fettsäuren oder Phospholipiden. In Abhängigkeit der Synthesepartner ergeben sich aus dieser Reaktion Iodlactone bzw. Iodaldehyde. Diese Substanzen entstehen nicht durch eine ungerichtete Iodierung an vorhandenen Molekül-Doppelbindungen, da die Iodorganifizierung und Übertragung von aktiviertem Iod auf Lipide und Proteine durch Methimazol oder Propylthiouracil verhindert werden kann [18, 42, 48, 51]. Dies lässt auf eine Beteiligung der schilddrüsenspezifischen Peroxidase schließen, da Methimazol und Propylthiouracil als Inhibitoren dieses Enzyms wirken.

Aus der Reaktion der aktivierten Iodspezies ( $I^*$ ) mit den Vinylethergruppen der Plasmalogene resultieren die Iodaldehyde. So entsteht mit Plasmenylethanolamin, welches mit anderen Phospholipiden in den Zellen vergesellschaftet ist, ein instabiles iodiertes Zwischenprodukt. Als Ergebnis der Zerfallsreaktion entsteht Lysophosphatidylethanolamin und 2-Iodhexadecanal (2-IHDA) (vgl. Abb. 7). In Abhängigkeit der Verteilung von  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Alkylketten in den Plasmalogenen variieren die relativen Anteile von 2-IHDA und 2-IODA in den Zellen, wobei 2-IHDA meist das dominierende Iodaldehyd darstellt [12, 22].

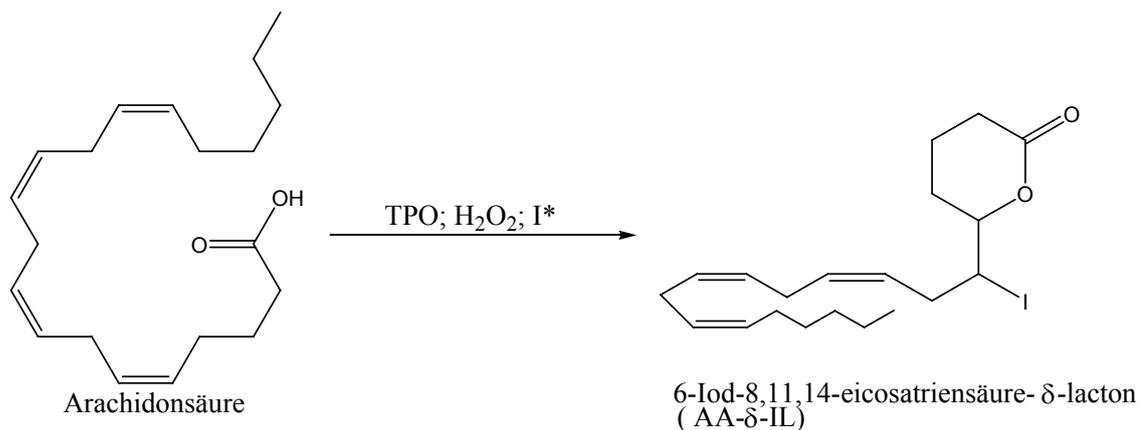


**Abb. 7: Biosynthese von 2-Iodhexadecanal [12]**

Die Iodlactone entstehen durch eine Reaktion der aktivierten Iodspezies mit membranständigen oder freien ungesättigten Fettsäuren. In Abhängigkeit der Fettsäure und der

Iodierungsposition können drei verschiedene Iodlactonformen entstehen. Eine Iodierung der endständigen  $\omega$ -Doppelbindung führt bei der Umsetzung der Arachidonsäure zur Bildung von 15-Iod-14-hydroxy-eicosatriensäure und 14-Iod-15-hydroxy-eicosatriensäure und deren Lactone. Diese Strukturen entstehen meist durch eine ungerichtete Iodierung aufgrund der Reaktivität der Doppelbindung. Ihnen wird außerdem eine geringere biologische Relevanz zugeschrieben [5, 15].

Bei einer Beteiligung der schilddrüsenspezifischen Peroxidase findet eine gezielte Iodierung der Fettsäuren statt. Durch unterschiedliche Ausgangsfettsäuren können zwei Formen von Iodlactonen erhalten werden. Ausgehend von der 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure bildet sich durch Addition eines Iodatoms an Position 5 ein  $\gamma$ -Iodlacton mit einer 5-Ring-Struktur. Handelt es sich bei der Ausgangsverbindung dagegen um  $\Delta^5$ -ungesättigte Fettsäuren, wie zum Beispiel die Arachidonsäure oder 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure, so entstehen  $\delta$ -Iodlactone mit einer 6-Ring-Struktur durch Iodierung der Position 6 [7, 15, 48 - 50, 52, 53].



**Abb. 8: Biosynthese von AA- $\delta$ -IL**

Wie Abb. 8 zeigt, erhält man bei der Inkubation von Arachidonsäure mit der aktivierten Iodspezies (I\*) in Anwesenheit der TPO und von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches von der apikalen NADPH-Oxidase gebildet wird, ein 6-Iod-8,11,14-eicosatriensäure- $\delta$ -lacton (AA- $\delta$ -IL). Ein detaillierter Bildungsmechanismus ist anhand der Lactoperoxidase-katalysierten Reaktion in Abb. 12 im Abschnitt 2.1.6 (vgl. Seite 22) dargestellt.

### 2.1.5.3 Metabolismus und Wirkung der Iodlipide

Der Wolff-Chaikoff-Effekt beschreibt die Inhibierung der spezifischen Funktionen der Schilddrüse aufgrund übermäßiger Iodzufuhr. Er führt unter anderem zu einem verminderten Iodidtransport in die Thyreozyten und einer Hemmung der Sekretion der

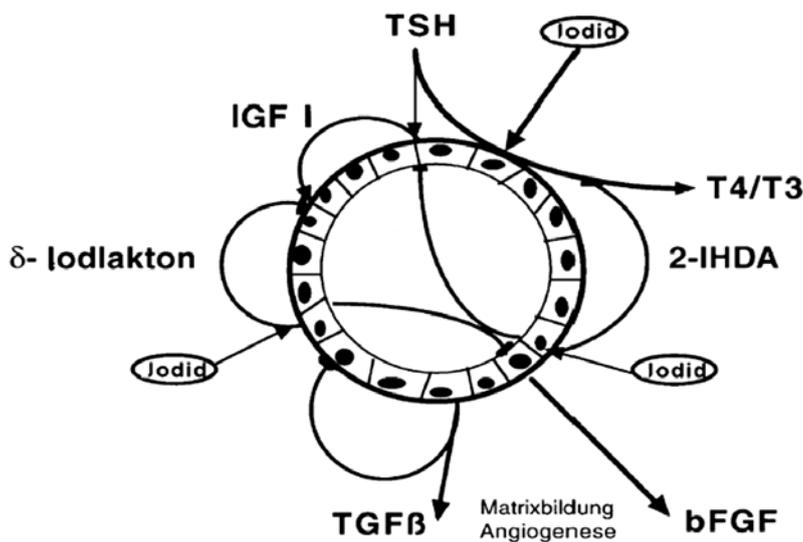
Schilddrüsenhormone. Auffällig dabei erschien, dass der inhibierende Effekt von Iodid durch Methimazol oder andere TPO-blockierende Substanzen vollständig aufgehoben werden konnte. Ausgehend von dieser Beobachtung wurden organische Iodverbindungen als Mediatoren für den Wolff-Chaikoff-Effekt vermutet. Nach der Identifizierung von 2-IHDA als Hauptiodlipid in Pferdeschilddrüsen durch Pereira et al. wurden verschiedene Studien zur Wirkung von Iodaldehyden auf die Schilddrüsenfunktion durchgeführt. Ohayon et al. untersuchten in diesem Zusammenhang den Einfluss von 2-IHDA auf die NADPH-Oxidase, die NADPH-Cytochrom C-Reduktase und die schilddrüsen-spezifische Peroxidase. Sie stellten dabei eine konzentrationsabhängige Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität mit einer Halbwertsinhibierung von 3-5  $\mu\text{M}$  und einer maximalen Blockierung bei 15-20  $\mu\text{M}$  2-IHDA fest, während exogen zugeführtes Iodid bis zu einer Konzentration von 1 mM keine Wirkung aufzeigte. Dies spricht wiederum für den Sachverhalt, dass eine organische Iodverbindung der Vermittler des Iodideffektes ist. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Ohayon zeigen, dass 2-IHDA keinen Einfluss auf die NADPH-Cytochrom C-Reduktase besitzt und dass das Vermögen der TPO Iodid zu oxidieren nicht von 2-IHDA beeinflusst wird. Andererseits verringert eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  2-IHDA die Thyreoglobulin-Iodierungsrate um ca. 50 %, was eine verringerte Bildung der Schilddrüsenhormone zur Folge hat und eine Charakteristik des Wolff-Chaikoff-Effektes darstellt. Sie vermuteten außerdem, dass die durch Lipidoxidation entstehenden Aldehyde zum Schutz der Zellen vor der toxischen Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet werden und dass diese wiederum zur Verringerung der NADPH-Oxidase-Aktivität führen, wodurch folglich weniger  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht.

In weiteren Untersuchungen durch Panneels et al. wurde die Inhibierung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion durch Einwirken von Iodaldehyden auf die NADPH-Oxidase bestätigt. Ferner konnte demonstriert werden, dass 2-IHDA die Aktivität der Phospholipase C und der Adenylatcyclase verringert, sowie die Bildung von Inositolphosphaten hemmt. Dadurch hat es einen reduzierenden Einfluss auf die cAMP-vermittelten stimulierenden Effekte von TSH, wie zum Beispiel die Sekretion der Schilddrüsenhormone  $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$ . Eine Beteiligung der Iodaldehyde bei der Wachstumsregulation ist hingegen fraglich, da zum Beispiel kein Effekt auf die TSH-stimulierte DNA-Bildung beobachtet werden konnte.

Im Rahmen dieser Experimente wurde außerdem festgestellt, dass die biologische Wirksamkeit an zwei Strukturmerkmale gebunden ist. Zum Einen spielt die Aldehydfunktion und zum Anderen das Vorhandensein eines Halogens am C-Atom in Position 2

eine entscheidende Rolle. Das Ersetzen der Aldehydgruppe durch einen Alkohol, eine Carbonsäure, einen Methylester, ein Acetal oder ein Methylketon hat den Verlust der biologischen Aktivität zur Folge. In Abhängigkeit von der Kettenlänge zeigen auch unhalogenierte Aldehyde eine Wirkung, die jedoch reversibel ist. Die Wirkung der Iodaldehyde kann dagegen nicht durch Waschen des Gewebes aufgehoben werden und bedarf einer neuen Proteinsynthese. Dem entsprechend scheint ein Halogen an Position 2 einen nucleophilen Angriff, zum Beispiel an die Thiolgruppen der NADPH-Oxidase, zu begünstigen und die Bindung der Aldehydfunktion mit den Enzymen zu stabilisieren. Belegt wird diese Tatsache dadurch, dass eine Inaktivierung der NADPH-Oxidase durch 10  $\mu\text{M}$  2-IHDA bis zu einer Konzentration von 10 mM DL-Dithiothreitol, welches die Thiolgruppen des Enzyms angreift, nicht aufgehoben wird. Im Vergleich der biologischen Aktivität bei unterschiedlicher Halogenspezies konnte zudem demonstriert werden, dass iodierte Verbindungen die größte Bioaktivität aufwiesen, während bromierte Verbindungen nur wenig reaktiv waren und chlorierte, sowie fluoridierte Aldehyde keine Wirksamkeit besaßen [1, 3 - 12].

Im Gegensatz zu den Iodaldehyden beschränkt sich die Wirkung der Iodlactone vorwiegend auf die Autoregulation des Wachstums und nicht auf die spezifischen Funktionen der Schilddrüse (vgl. Abb. 9) [13].



**Abb. 9: Einfluss von Iodaldehyden und Iodlactonen auf die Funktion und das Wachstum einer Schilddrüsenfollikelzelle [7]**

Eine Größenzunahme der Schilddrüse kann durch zwei verschiedene Wege erfolgen. Die klassische Strumatheorie besagt, dass es durch relativen Iodmangel und fehlende Schilddrüsenhormone zu einer verstärkten Sekretion von TSH kommt, was wiederum

zu einer Hyperplasie der Schilddrüse führt. Dabei wurde außerdem festgestellt, dass nach dem Absenken des TSH-Spiegels, zum Beispiel durch Absetzen von goitrogenen Substanzen bzw. eine Iodsupplementierung, die Schilddrüsengröße sich normalisiert. Die Vergrößerung des Organs wird hierbei lediglich durch eine Größenzunahme der einzelnen Zellen hervorgerufen (Hypertrophie) und ist schnell reversibel. Im Gegensatz zur Hypertrophie bewirkt die Hyperplasie ein Größenwachstum durch eine vermehrte Zellteilung. Nach neueren Erkenntnissen tritt diese bei längeranhaltenden schweren Iodmangelzuständen auf und ist mit der Wirkung von autokrinen und parakrinen Wachstumsfaktoren vergesellschaftet. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählen beispielsweise der IGF-I (*Insulin like growth factor I*), der EGF (*Epidermal growth factor*), der TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) und der FGF (*Fibroblast growth factor*). Mit Ausnahme von TGF- $\beta$ , welcher als antiproliferativer Faktor in normalen Epithelzellen und im Frühstadium der Onkogenese wirkt und eine Apoptose induzieren kann, besitzen die anderen aufgeführten Wachstumsfaktoren eine proliferative Wirkung. Die Expression dieser Faktoren verhält sich dabei invers zum intrathyreoidalen Iodidgehalt. Die Proteinausgabe und die Transkription von IGF-I, welcher synergistisch mit TSH auf das Wachstum und die Funktion der Schilddrüse wirkt, werden durch intrazelluläres organisiertes Iod unterdrückt. Als reaktive Spezies zur Reduktion der IGF-I-induzierten Zellproliferation werden neben Iodid und den Schilddrüsenhormonen die  $\delta$ -Iodlactone von mehrfach ungesättigten Fettsäuren postuliert. Des Weiteren wird bei einem Iodmangel durch eine Erhöhung des TSH-Spiegels die Bindung von EGF an seinen Rezeptor gesteigert. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors und der damit verbundenen Tyrosinkinase bewirkt über die Phospholipase C eine Inositol-3-Phosphat-Signaltransduktion und eine Aktivierung der Proteinkinase C. Diese leitet schließlich die Proliferation der Zellen ein. Durch AA- $\delta$ -IL wird spezifisch der EGF-Rezeptor gehemmt, so dass die nachfolgenden Aktivierungsschritte nicht erfolgen und die Strumabildung unterdrückt wird. In tierexperimentellen Studien zur Wirkung der Iodlactone konnte beobachtet werden, dass die EGF-induzierte Proliferation von isolierten, porcinen und humanen Schilddrüsenfollikeln bereits bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M AA- $\delta$ -IL vollständig gehemmt wird. Um den gleichen Effekt durch Iodid hervorzurufen ist eine circa 50-fach größere Konzentration notwendig. Die mögliche physiologische Rolle der Iodlactone wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, dass die Wirkung von AA- $\delta$ -IL bzw. EPA- $\delta$ -IL im Gegensatz zu Iodid nicht durch Methimazol, Propylthiouracil oder ähnliche Peroxidaseinhibitoren aufgehoben werden konnte, was wiederum für eine organi-

sche Iodsubstanz als Regulator spricht. Eine Blockierung der Leukotrienbildung und der starke Anstieg der EGF-induzierten Proliferation von isolierten Schilddrüsenfollikeln durch mikromolare Konzentrationen von Masoprocol (Lipoxygenasehemmer) lassen dabei auf eine Beteiligung von Eicosanoiden am Reaktionsmechanismus der Wachstumsfaktoren schließen. Anhand dieser Untersuchungen konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich auch wie bei den Iodaldehyden eine strukturabhängige Wirkung zeigt. Uniodierte Lactone, Arachidonsäure und  $\omega$ -Iodlactone besitzen keine biologische Relevanz in Bezug auf die Wachstumshemmung. Der Einfluss der  $\gamma$ -Iodlactone beschränkt sich dagegen ausschließlich auf FRTL-5-Zellen, welche eine erhöhte Sensibilität für TSH besitzen und deren Wachstum aus einem Anstieg des cAMP-Levels resultiert, während die Proliferation von intakten Schilddrüsenzellen TSH- und cAMP-unabhängig ist. Hierbei wirken lediglich die  $\delta$ -Iodlactone hemmend [1, 3 - 7, 9 - 11, 13 - 21, 54].

### 2.1.6 Enzymreaktionen

#### *Enzyme allgemein*

Enzyme sind Proteine mit katalytischer Aktivität und finden aufgrund ihrer spezifischen Wirkung Anwendung als technische Enzyme (Lebensmittel- und Gerbereiindustrie), als pharmazeutisch und kosmetisch eingesetzte Enzyme (Verdauungsenzyme, zur Wundbehandlung usw.), als analytische Enzyme z. B. zur Bestimmung von Glucose mit Glucosedehydrogenase und als Forschungsenzyme (Anwendung in der Gentechnik) [55]. Als globuläre Proteine unterscheiden sich die Enzyme nicht alleine durch ihre reine Größe oder dem prozentualen Anteil der vorhandenen Aminosäuren, sondern durch ihre spezifischen Strukturen. Die Wirkung der Enzyme wird bestimmt durch die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und die daraus resultierende Konformation (Sekundär- und Tertiärstruktur). Größere Enzyme können aus mehreren Peptidketten bestehen, die sich in der so genannten Quatärstruktur anordnen. Bei der Reaktion steht innerhalb des Enzyms nur ein kleiner Bereich, das aktive Zentrum, für die Substratanlagerung und -umsetzung zur Verfügung.

Viele Enzyme sind keine reinen Proteine, sondern enthalten Metallionen oder niedermolekulare Substanzen als Cofaktoren (reversible Bindung an das Enzym) oder prosthetische Gruppen (fest mit dem Enzym verbunden), welche für die Aktivität der Enzyme unentbehrlich sind.

Resultierend aus diesen Strukturen zeigen Enzyme zwar eine hohe Effektivität und Spezifität, aber auch begrenzte Toleranzbereiche bezüglich der Reaktionsbedingungen (pH-

Wert, Temperatur oder Wassergehalt). Enzyme als Katalysatoren sind besonders effektiv, da sie die Anregungsenergie herabsetzen und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Die Spezifität wird unterschieden bezüglich des Substrates (Substratspezifität) und der Reaktion, die katalysiert wird (Reaktionsspezifität).

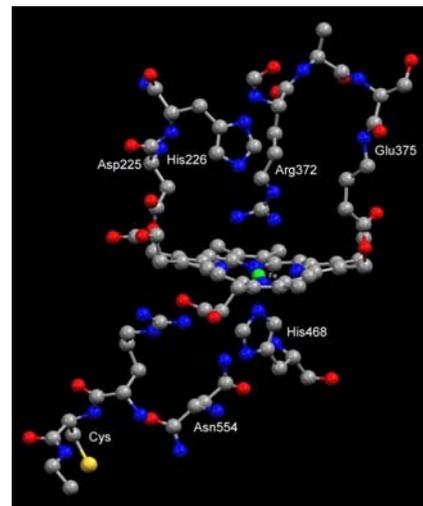
Als substratspezifisch werden Enzyme bezeichnet, die nur ein einziges Substrat oder ein Substrat bevorzugt und andere mit deutlich verminderter Geschwindigkeit umsetzen. Dabei reagiert das Enzym mit bestimmten funktionellen Gruppen (z. B. unspezifische Lipasen reagieren auf alle vorhandenen Estergruppen) oder mit funktionellen Gruppen, die mit einem anderen Strukturmerkmal verknüpft sind (z.B. Trypsin).

Die Reaktionsspezifität äußert sich dadurch, dass nur eine der thermodynamisch möglichen Reaktionen abläuft und das Substrat hochspezifisch aktiviert wird.

### *Lactoperoxidase*

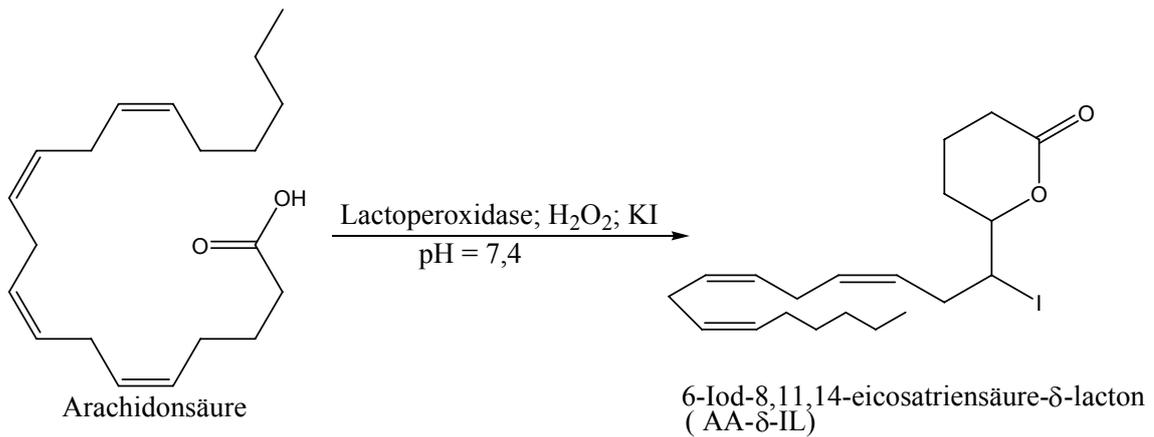
Lactoperoxidase oder allgemein Peroxidase zählt zu der Klasse der Oxidoreduktasen und benötigt dabei Wasserstoffperoxid als Akzeptor.

Name:	Lactoperoxidase
Herkunft:	aus Rindermilch
CAS-Nummer:	9003-99-0
EC-Nummer:	EC 1.11.1.7
Reaktionstyp:	Redoxreaktion
Akzeptor:	Wasserstoffperoxid
Enzymaktivität:	≥ 80 Units/mg Protein
Molekulargewicht:	80288 Da
Cofaktor:	Hämin



**Abb. 10: Lactoperoxidase**

Wird Lactoperoxidase mit Arachidonsäure unter Zusatz von Wasserstoffperoxid und Kaliumiodid umgesetzt, so entsteht dabei aus der Arachidonsäure ein  $\delta$ -Iodolacton (Abb. 11).



**Abb. 11: Reaktion von Lactoperoxidase mit Arachidonsäure unter Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und KI [48]**

Ein möglicher Reaktionsweg ist in Abb. 12 dargestellt. Es erfolgt zunächst der Angriff von Wasserstoffperoxid an die Lactoperoxidase, so dass ein „oxidiertes“ Enzym und Wasser entsteht. Im zweiten Schritt interagiert das „oxidierte“ Enzym mit Iodid. In Anwesenheit von Arachidonsäure bildet sich ein intermediärer Enzym-Substrat-Komplex, in dem anschließend das enzym-gebundene Iodid gegen das Proton des Substrates (Arachidonsäure) ausgetauscht wird. Im letzten Schritt der Reaktion erhält man nach Wasserabspaltung und intramolekularer Zyklisierung das Iodlacton der Arachidonsäure (AA-δ-IL) und das zurückgewonnene native Enzym [34, 56, 57].

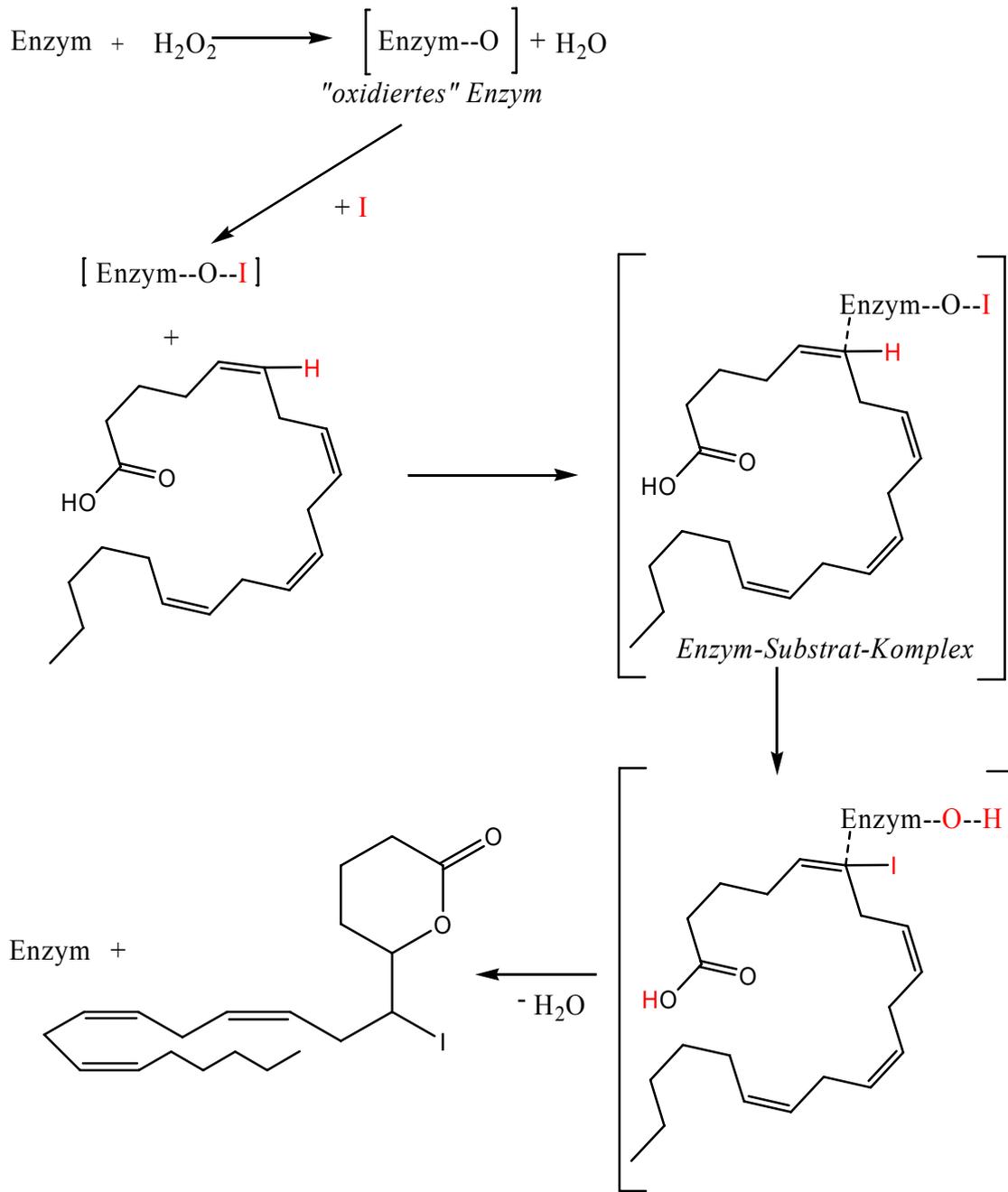


Abb. 12: Möglicher Reaktionsweg für die Umsetzung von Lactoperoxidase mit Arachidonsäure unter Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und KI

## 2.2 Analytische Grundlagen

### 2.2.1 Gaschromatographie und Elektroneneinfang-Detektor

#### Gaschromatographie

Unter dem Begriff Chromatographie versteht man physikalische Methoden, die eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen bewirken. Das chromatographische System besteht dabei aus einer stationären und einer mobilen Phase [58 - 60].

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Gaschromatographie zur Bestimmung von Analyte ist, dass es sich um Substanzen handelt, die thermostabil und flüchtig genug sind, um unzersetzt in die Gasphase überführt werden zu können. Bei thermolabilen oder schwerflüchtigen Analyte kann die notwendige Stabilität und Flüchtigkeit durch eine gezielte Derivatisierung erreicht werden [58, 60 - 63].

Bei der modernen Kapillar-Gaschromatographie ist die stationäre Phase eine Quarzglas-Kapillare (fused-silica), welche mit einer nicht flüchtigen Trennflüssigkeit beschichtet ist. Man spricht dabei von der Flüssig-Gas-Chromatographie, bei der die Trennung der Substanzen auf der unterschiedlichen Verteilung der zu trennenden Substanzen zwischen der stationären (z.B. Dimethylpolysiloxan-Phase) und der mobilen Phase (inertes Trägergas) beruht [59, 60].

Die Verteilung der Komponenten zwischen dem „Gasraum“ und der stationären Phase kann durch den Verteilungskoeffizienten  $K$  beschrieben werden, der sich wie folgt definiert:

$$K_i = \frac{c_{i,L}}{c_{i,G}}$$

- mit  $K_i$  - Verteilungskoeffizient  
 $c_{i,L}$  - Konzentration des Stoffes  $i$  in stationärer Phase  
 $c_{i,G}$  - Konzentration des Stoffes  $i$  in mobiler Phase

Je mehr sich die Verteilungskoeffizienten der zu analysierenden Substanzen unterscheiden, umso einfacher können diese voneinander getrennt werden [59, 62 - 65].

Die Stoffe retendieren dann entsprechend ihrer Affinität zur stationären Phase mit der Retentionszeit  $t_R$ , die sich zusammensetzt aus der Totzeit und der Verweilzeit der Substanz in der stationären Phase (entspricht der Nettoretentionszeit).

$$t_R = t_m + t_s = t_m + t'_R$$

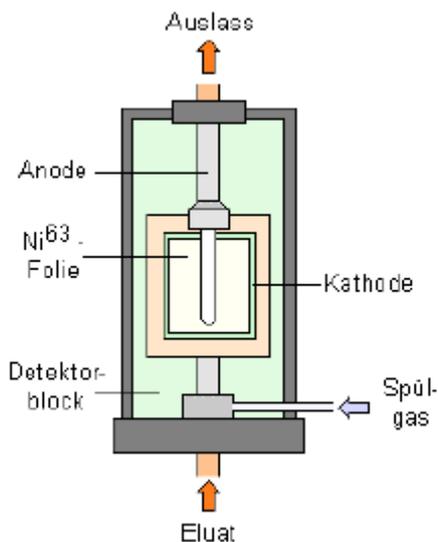
- mit  $t_R$  - Retentionszeit  
 $t_m$  - Totzeit (bei  $K_i \approx 0$ )  
 $t_s$  - Verweilzeit in der stationären Phase  
 $t'_R$  - Nettoretentionszeit

Nach der Trennung in der chromatographischen Säule können die Analyte einem Detektor zugeführt werden. In den Detektoren für die Gaschromatographie haben sich die unterschiedlichsten Funktionsprinzipien bewährt, die sich auf die verschiedenen Eigen-

schaften der getrennten Substanzen stützen. So zum Beispiel der Flammenionisationsdetektor (FID), der Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) und der Elektroneneinfang-Detektor (ECD), der im Folgenden beschrieben werden soll.

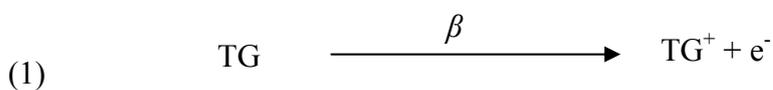
### *Der Elektroneneinfang-Detektor*

Der ECD (Abb. 13) besteht aus einer Ionisationskammer, die ein gebogenes Nickelblech enthält. Auf dessen Oberfläche ist eine dünne Schicht des radioaktiven  $\text{Ni}^{63}$ -Isotops aufgebracht.



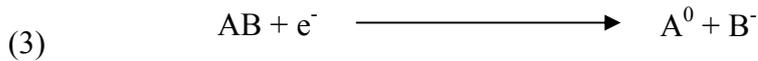
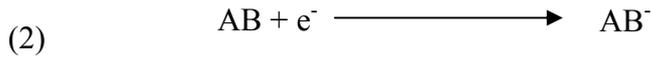
**Abb. 13: Aufbau eines Elektroneneinfang-Detektor [66]**

Wird das Trägergas (TG) in die Ionisationskammer geleitet, wird dieses durch die emittierte  $\beta$ -Strahlung ionisiert. Durch diese Reaktion entstehen positiv geladene Trägergasionen und Elektronen, die zur Anode wandern (1). Diese als Ionisation bezeichnete Reaktion generiert den Null- oder Grundstrom des ECDs.



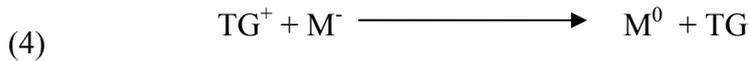
Eine Rekombination des Elektrons mit dem positiven Trägergasion ist nicht möglich, da die Dissoziationsenergie gleich der Anlagerungsenergie ist.

Im zweiten Reaktionsschritt treffen die Elektronen auf die aus der Kapillarsäule eluierenden Substanzen und werden von diesen „eingefangen“. Die Analyte müssen dafür eine gewisse Elektronegativität aufweisen. Durch die Bildung von negativen Molekulationen wird der Grundstrom abgeschwächt. Dies kann einmal durch die Anlagerung von Elektronen (2) oder durch dissoziativen Elektroneneinfang (3) erfolgen.



Der Elektroneneinfang gestaltet sich bei Halogeniden meist dissoziativ.

Bei der Rekombination von den negativen Ionen der nachzuweisenden Substanzen und den positiven Trägergasionen kommt es zur Bildung von neutralen Molekülen (4).



Die heute verwendeten ECDs werden mit gepulster Gleichspannung betrieben, da der Elektroneneinfang umso empfindlicher ist, je langsamer die Elektronen sich zwischen den Elektroden bewegen. Bei der Detektion von Analyte verringert sich der Grundstrom, welcher durch Erhöhung der Pulsfrequenz aber konstant gehalten werden kann. Die Änderung der Pulsfrequenz ist dabei das eigentliche Detektorsignal und diese ist konzentrationsabhängig [58 - 63, 65].

Der Elektroneneinfang-Detektor zeigt für Verbindungen mit Nitro- und Methoxygruppen oder Halogenen als funktionelle Gruppen eine besonders hohe Sensitivität und Selektivität.

Die Nachweisempfindlichkeit des ECDs ist strukturabhängig. So kann eine iodhaltige Verbindung mit einem niedrigeren Gehalt nachgewiesen werden als eine Fluorverbindung. Neben der Struktur hat die Anzahl der vorhandenen Halogenatome eines Moleküls eine Auswirkung auf die Sensitivität des Detektors.

In der nachfolgenden Tab. 3 ist eine Übersicht über die Nachweisempfindlichkeit des ECDs gegenüber den unterschiedlichen Halogenverbindungen dargestellt.

**Tab. 3: Halogenempfindlichkeit  $S_i$  im ECD [59]**

Substanz $i$	Empfindlichkeit $S_i$
Fluorbenzol	1
Chlorbenzol	100
Brombenzol	600
Iodbenzol	37000

Aufgrund seiner hohen Sensibilität für Iodverbindungen eignet sich der Elektroneneinfang-Detektor für die hier zu untersuchenden Verbindungen.

### 2.2.2 Flüssigchromatographie und UV/VIS-Detektor

Neben der gaschromatographischen Analyse sollen in dieser Arbeit auch alternative Methoden für die Bestimmung der Iodlipide angewendet werden. Eine solche Möglichkeit stellt die in diesem Abschnitt beschriebene Flüssigchromatographie dar.

#### *Flüssigchromatographie*

Die Flüssigchromatographie beruht wie auch die Gaschromatographie auf der Trennung von Substanzgemischen an einer stationären und mobilen Phase. Im Gegensatz zur Gaschromatographie ist die mobile Phase hier kein inertes Gas, sondern eine Flüssigkeit. Man kann zunächst die Flüssigchromatographie in die Flachbett- und die Säulenchromatographie unterteilen. Die hier behandelte Flüssigchromatographie gehört zur Klasse der Säulenchromatographie, die in die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und die Niederdruckflüssigchromatographie untergliedert werden kann. Anhand der eingesetzten stationären Phase kann man dabei zwischen der Normalphasen- und der Umkehrphasenchromatographie unterscheiden [67].

Bei der Normalphasenchromatographie werden Adsorbens wie Kieselgel, Aluminiumoxid oder Dextrangel als stationäre Phasen und unpolare bis leicht polare organische Lösemittel als mobile Phasen eingesetzt.

Die stationäre Phase bei der Umkehrphasenchromatographie (RPC) sind hydrophobe bzw. unpolare Teilchen, die aus chemisch modifizierten Kieselgelen bestehen. Die funktionellen Gruppen können dabei n-Octadecyl-, n-Octyl-, Methyl- oder Phenylgruppen sein. Als Elutionsmittel dienen hierbei vor allem Methanol, Acetonitril, Tetrathydrofuran und deren Gemische mit Wasser [68].

Allgemein besteht die Säule aus einem Edelstahlrohr, das an beiden Enden durch Fritten oder Siebe verschlossen und mit einer dichten Packung von porösen sphärischen oder gebrochenen Teilchen gefüllt ist.

In der analytischen HPLC werden heute üblicherweise Säulen mit einem Durchmesser von 2 bis 6 mm und Teilchen mit einem Partikeldurchmesser von kleiner 50 µm eingesetzt.

Die stationäre Phase ist das Trägermaterial selbst oder ein dünner Film bzw. eine Grenzschicht an den Porenwänden der porösen Packungsteilchen, an die die Analyte adsorbieren können. Je nach Stärke der Attraktion werden die Analyte mehr oder weni-

ger lang verzögert und treten nach unterschiedlichen Zeiten aus der Säule, wo sie mit Hilfe eines Detektors registriert werden können [58, 67].

Anwendung finden dabei zum Beispiel das Differential-Refraktometer (Bestimmung des Brechungsindex), Fluoreszenz-Detektoren oder UV/VIS-Detektoren.

#### *Der UV/VIS-Detektor*

Als Grundlage für die UV-Detektion dient die spektrale Absorption von Substanzen im UV- und VIS-Bereich, wobei diese bei gegebener Wellenlänge dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt und konzentrationsabhängig ist.

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon_{\lambda} * c * d \quad \text{Lambert-Beer'sches Gesetz}$$

- mit
- $I_0$  - Intensität des eingestrahnten Lichtes
  - $I$  - Intensität des durchgelassenen Lichtes
  - $A$  - Absorption
  - $\varepsilon_{\lambda}$  - molarer Extinktionskoeffizient der Wellenlänge
  - $c$  - Konzentration des gelösten Stoffes (mol/L)
  - $d$  - Weglänge der Messzelle (Schichtdicke in cm)

Man kann bei UV-Detektoren drei Arten unterscheiden. Neben den Festwellenlängen-Detektoren (Photometer), die nur eine Wellenlänge emittieren und registrieren, gibt es variable Wellenlängen-Detektoren (UV-Spektrometer) und Diodenarray-Detektoren (DAD).

Während man bei variablen Wellenlängen-Detektoren ohne vorherigen Filterwechsel die Wellenlänge wechseln kann, bekommt man aus dieser Messmethodik keine spektralen Informationen wie beim DAD. Sowohl dem Festwellenlängen-Detektor als auch dem variablen Wellenlängen-Detektor ist die Zerlegung des polychromatischen Lichtes vor der Messzelle gemein. Im Gegenzug dazu wird beim Diodenarray-Detektor das Licht zunächst durch die Probenzelle geleitet und anschließend mit Hilfe eines holographischen Gitters aufgespaltet. Eine Zeile von Photodioden registriert dann alle Wellenlängen, die durch die Probe nicht oder nur vermindert absorbiert wurden. Es ist somit möglich während einer chromatographischen Analyse die UV-Spektren der eluierenden Substanzen direkt zu erhalten [58, 62, 67, 68].

### 2.2.3 Massenspektrometrie

Das erste Massenspektrometer wurde bereits 1910 von J. J. Thompson konstruiert, mit welchem ihm die Trennung der Neon-Isotope 20 und 22 gelang. Ein Massenspektrometer mit Geschwindigkeitsfokussierung entwickelte erstmals der englische Chemiker F. W. Aston. Er wies 1919 damit 212 natürliche Isotope unterschiedlicher Elemente nach und erhielt für diese Entdeckung 1922 den Nobelpreis.

Seit etwa 1960 wird die Massenspektrometrie als eine der meistverwendeten Methoden zur Strukturaufklärung von organischen Molekülen verwendet. Besonders die Kopplung von Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer Mitte der 1970er Jahre trug zur ständigen Weiterentwicklung der massenspektrometrischen Detektoren bei. Heutzutage ist die Massenspektrometrie aus einem modernen Analysenlabor nicht mehr wegzudenken. Sie wird dort routinemäßig für die Stoffidentifizierung und quantitative Analyse eingesetzt [58, 59, 69].

Allgemein bewirkt das Massenspektrometer die Erzeugung eines Strahls aus gasförmigen Ionen, die nach Masse-Ladungsverhältnis getrennt werden. Das daraus resultierende Massenspektrum gibt Auskunft, welche Ionen in welchen relativen Mengen aus dem Analytmolekül gebildet wurden, wodurch Rückschlüsse bezüglich dessen Struktur gezogen werden können.

Ein Massenspektrometer ist unabhängig von Konstruktionstyp und Bauart aus vier wesentlichen Komponenten aufgebaut: Einlasssystem, Ionenquelle, Massenfilter und Detektor [69, 70]. Abb. 14 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Massenspektrometers.

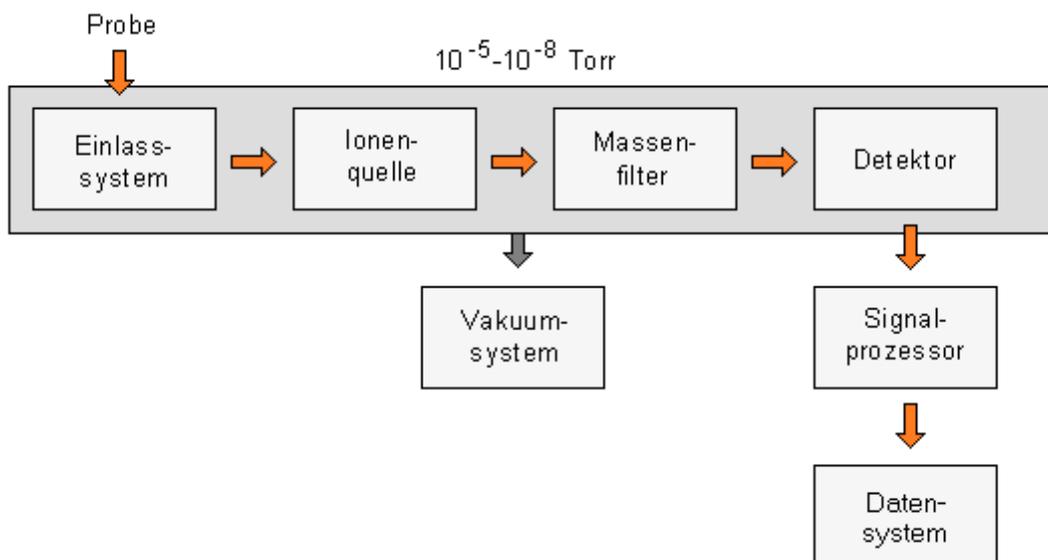
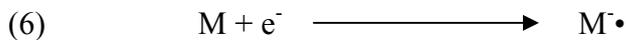
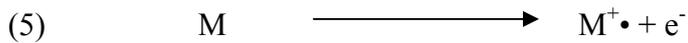


Abb. 14: Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers [70]

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Probe der Massenspektrometrie zugänglich zu machen, unter anderem durch Direkteinlass mit Verdampfung in der Ionenquelle oder durch indirekte Probenzuführung, bei der die Probe in einem beheizten Vorratsgefäß verdampft wird und über ein Molekularleck in die Ionenquelle strömt. An dieser Stelle soll nur die direkte Kopplung von Gaschromatographie bzw. Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie erwähnt werden. Bei GC-MS ist die Probe bereits im chromatographischen System in der Gasphase, sodass der Analytstrom direkt bzw. über eine beheizte Transferleitung in das Hochvakuum des Massenspektrometers eingebracht wird. Bei der LC-MS hingegen wird das Säuleneluat zu einem feinen Nebel zerstäubt und aus den Nebeltröpfchen treten die Ionen in die Gasphase über (Spray-Verfahren) [69, 71].

In der Ionenquelle werden die Probenmoleküle ionisiert. Zu diesem Zweck muss dem neutralen Molekülion soviel Energie zugeführt werden, dass entweder ein Elektron aus dem höchstbesetzten Orbital entfernt (5) oder ein Elektron in ein unbesetztes Orbital eingebracht (6) wird. Es resultieren daraus positiv oder negativ geladene Radikationen.



Die in der Ionenquelle gebildeten geladenen Probenmoleküle werden durch ein Anlegen eines schwachen Feldes aus der Ionisierungsregion der Quelle entfernt, zu einem Ionenstrahl gebündelt und anschließend über ein Potentialgefälle beschleunigt. Die Massentrennung kann anschließend auf verschiedene Weisen erfolgen. In der Analytik haben sich dabei vier Gerätetypen etabliert. Das sind zum Beispiel Sektorfeld-Massenspektrometer, Flugzeit-Massenspektrometer, Ionenfallen und Quadrupol-Massenspektrometer.

Bei Sektorfeld-Massenspektrometern erfolgt die Trennung aufgrund von unterschiedlichen Ablenkradien in einem Magnetfeld. Wobei hier nicht die Masse des Ions entscheidend ist, sondern das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) des Ions. In Flugzeit-Massenspektrometern wird dagegen ausgenutzt, dass Ionen gleicher Ladung sich aufgrund ihrer Masse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bewegen. Leichtere Ionen bewegen sich dabei schneller als schwerere und erreichen damit den Detektor eher. Bei Ionenfallen werden die Ionen durch ein elektromagnetisches Feld zwischen verschiedenen Elektroden (zwei Endkappen-Elektroden und eine Ringelektrode) auf zyklische Bahnen gezwungen. Durch Variation der angelegten Wechselspannung verlassen die

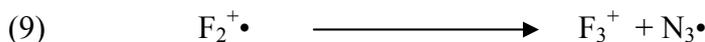
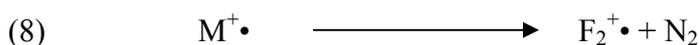
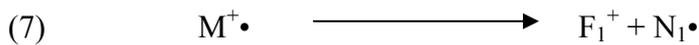
Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ihre stabilen Flugbahnen und können nacheinander aus der Ionenfalle austreten [61, 62, 69, 71, 72].

Die in dieser Arbeit verwendete Ionentrennung durch Quadrupol-Massenspektrometer wird in Abschnitt 2.2.3.3 näher erläutert.

Zur Registrierung werden heute zumeist Elektronenmultiplier oder Photomultiplier eingesetzt. Die aus dem Massenanalysator kommenden Ionen werden durch eine seitlich angeordnete Konversionsdynode abgelenkt und schlagen aus ihr Elektronen heraus. Diese werden zur nächsten Dynode beschleunigt und erzeugen wiederum neue Elektronen, wodurch sich die Anzahl der Elektronen mit jeder weiteren Dynode erhöht und ein verstärktes Signal ergibt. Bei einem Photomultiplier werden die Elektronen über einen Phosphorschirm in Photonen umgewandelt [69].

### 2.2.3.1 Ionisierung durch Elektronenstoß

Aus einer Glühkathode (Filament) werden durch Thermoemission Elektronen freigesetzt und im Spannungsfeld (meist 70 eV) beschleunigt. Der aus dem Interface kommende Molekülstrahl und der generierte Elektronenstrahl treffen in der Ionenquelle senkrecht aufeinander. Durch Kollision der Analytmoleküle mit den Elektronen werden positive oder negative Radikationen durch Aufnahme oder Abgabe von Elektronen aus dem Molekülen erzeugt. Die Bildung von Radikalkationen ist dabei 100-1000mal wahrscheinlicher als die Bildung von negativen Radikationen.

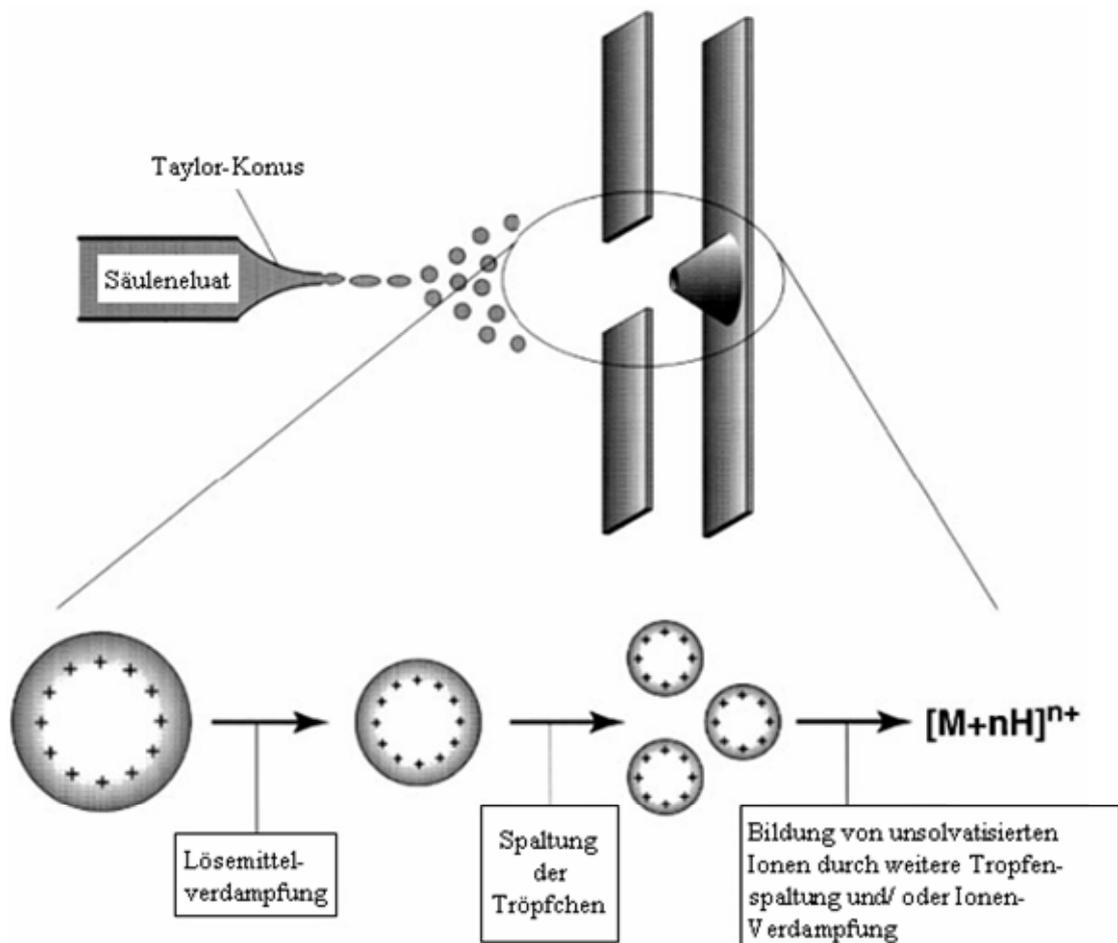


Die übertragene Energie ist meist größer, als die zur Bildung der Molekülionen ( $M^{\bullet+}$ ) benötigte Energie, so dass dissoziative Prozesse (7, 8) begünstigt werden, wodurch neben  $M^{\bullet+}$  auch Fragment-Ionen entstehen können [59, 61, 62, 71, 72]. In Abhängigkeit des Fragmentes können diese durch Bindungsbrüche über Elektronenwanderung oder Umlagerungen ( $\alpha$ -Spaltung, Allylspaltung, Benzylspaltung und McLafferty-Umlagerung) weiter zerfallen (9).

### 2.2.3.2 Elektrospray-Ionisation

Bei der Elektrospray-Ionisation wird das Säuleneluat mit Hilfe einer Sprühkapillare zu einem feinen Nebel versprüht. Durch Anlegen einer Spannung an die Sprühkapillare

bildet sich ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode, wodurch die Analyte entsprechend ihrer Ladung zur gegenüberliegenden Elektrode gezogen werden. Dabei bildet sich ein Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus), an dessen Ende sich die gleichartig geladenen (entweder positiv oder negativ) Ionen sammeln. Durch die gleiche Ladung kommt es zur gegenseitigen Abstoßung der Teilchen in dessen Ergebnis ein Aerosol mit kleinen Tröpfchen entsteht. Durch Wärme und zusätzlichen Eintrag eines Stickstoffstroms wird die Verdampfung von Lösungsmittel weiter vorangetrieben. Die Oberfläche der Tropfen wird dadurch kleiner und die Dichte der elektrischen Ladung auf der Tröpfchenoberfläche erhöht sich. Übersteigen die Abstoßungskräfte die Oberflächenspannung erfolgen mehrere Colomb-Explosionen, wodurch die Tröpfchengröße sich weiter verringert (Abb. 15).



**Abb. 15: Tröpfchenbildung im Elektrospray-Interface (positiver Modus) [73]**

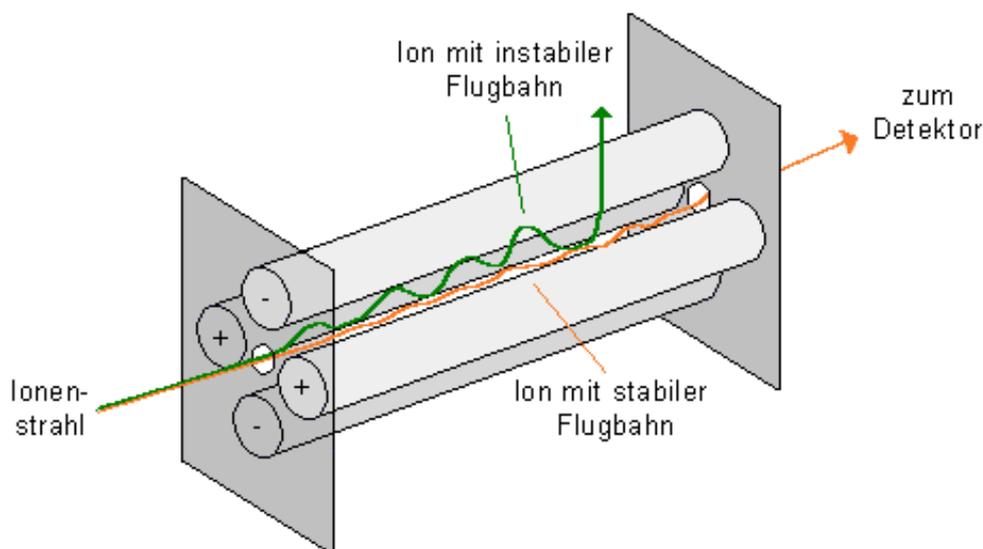
Die Bildung von freien Ionen in der Gasphase kann durch unterschiedliche Theorien erklärt werden. Das Modell des geladenen Rückstandes (*Charge Residue Model*, CRM) geht davon aus, dass nur noch ein Analytion pro Tröpfchen enthalten ist und dieses nach Kollision mit dem Stickstoffstrom in die Gasphase übergeht, während beim Ionenemis-

sionmodell (*Ion Evaporation Model*, IEM) bereits aus größeren Tröpfchen kontinuierlich Ionen in die Gasphase abgegeben werden.

Die Elektrospray-Ionisation ist eine schonende Art der Ionisierung und erzeugt vorwiegend Ionen mit  $M+1$  bzw.  $M-1$ , wobei aber auch Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten oder der Probenmatrix (z.B. Natrium- oder Ammonium-Addukte) möglich sind [69, 73, 74].

### 2.2.3.3 Massentrennung bei Quadrupol-Massenspektrometern

Ein Quadrupol-Massenspektrometer (Abb. 16) ist aus vier parallel angeordneten Edelstahl-Stäben aufgebaut, wobei die gegenüberliegenden Stäbe die gleiche Polarität (positiv oder negativ) der Gleichspannung zeigen. Dieser übergeordnet ist eine Wechselspannung, die alle vier Quadrupolstäbe einbezieht und eine Phasenverschiebung um  $180^\circ$  aufweist.



**Abb. 16: Aufbau eines Quadrupol-Massenspektrometers [70]**

Durch das vorhandene elektrische Feld werden die aus dem Interface kommenden Ionen zu oszillierenden Flugbahnen angeregt. Durch die Variation der Wechsel- und der Gleichspannung wird dabei erreicht, dass nur Ionen mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ -Verhältnis) den Quadrupol passieren können. Alle anderen Ionen werden auf ihrer Bahn destabilisiert und an den Magnetstäben entladen.

Für das Tandem-MS-Verfahren werden mehrere Analysatoren kombiniert verwendet. Neben der Kopplung von Quadrupol und Ionenfalle (Q-Trap) oder von Quadrupol und Flugzeitanalysator (Q-TOF) ist die Reihenschaltung mehrerer Quadrupole weit verbreitet. Im Rahmen der LC-MS/MS-Messungen wird hier ein API 2000 verwendet. Er ist aus drei Quadrupolen (Q0 bis Q3) aufgebaut, wobei Q1 und Q3 voll funktionsfähige

Quadrupole sind, während Q0 nur zur Fokussierung des Ionenstroms und Q2 als Kollisionszelle für weitere Fragmentierungen dient (Abb. 17).

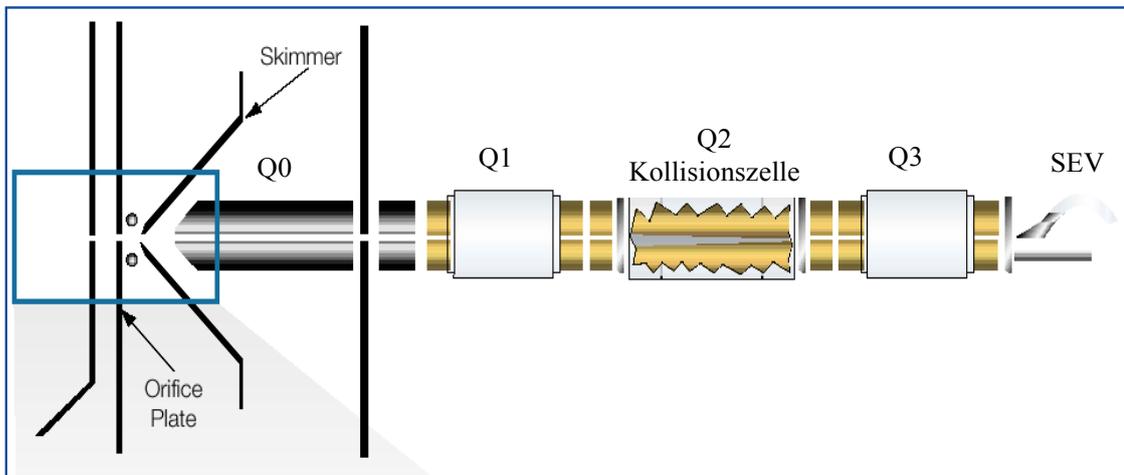


Abb. 17: Aufbau des Triple-Quadrupols im API 2000 [75]

Es gibt verschiedene Modi, in denen ein solches Gerät betrieben werden kann, die wichtigsten sind in der nachfolgenden Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Betriebsarten der Tandem-Massenspektrometrie [71, 75]

Modus	Q1	Q2	Q3
<b>Scan-Modus</b>	Scan von definierten m/z-Bereich	Fokussierung/ Weiterleitung	Fokussierung/ Weiterleitung
<b>Produktionen-Scan</b>	Selektieren eines definierten m/z-Verhältnis	Fragmentierung	Scan von definierten m/z-Bereich
<b>Vorläuferionen-Analyse</b>	Scan von definierten m/z-Bereich	Fragmentierung	Selektieren eines definierten m/z-Verhältnis
<b>Neutralverlust-Analyse</b>	Scan von definierten m/z-Bereich	Fokussierung/ Weiterleitung	Scan von definierten m/z-Bereich (versetzt um bestimmten Betrag zu Q1)
<b>Multiple Reaction Monitoring (MRM)</b>	Selektieren eines definierten m/z-Verhältnis	Fragmentierung	Selektieren eines definierten m/z-Verhältnis

Im Scan-Modus wird das komplette Massenspektrum über einen definierten m/z-Bereich von einer Substanz erhalten, während der Produktionen-Scan ausgehend von

einem selektierten Mutterion alle sich bildenden Tochterionen registriert. Die Vorläuferionen-Analyse wird eingesetzt, um Substanzen zu identifizieren, die das gleiche Fragment abspalten. Ähnlich verhält sich das bei der Neutralverlust-Analyse, mit deren Hilfe sich Ionen nachweisen lassen, die das gleiche Neutralteilchen (z.B. H<sub>2</sub>O) abspalten. Der letzte Modus (MRM) wird vorwiegend für die Quantifizierung eingesetzt, da durch das Ausblenden von Nebenfragmenten (z.B. aus der Matrix) die Empfindlichkeit durch ein verringertes Signal-Rausch-Verhältnis gesteigert wird [59, 69, 71, 75].

#### 2.2.4 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist eine Form der Flüssigchromatographie und beruht auf der Trennung von Molekülen infolge ihrer unterschiedlichen Größe. Als stationäre Phase werden poröse Materialien, wie Kieselgel oder Polymerkügelchen mit einer definierten Porengröße verwendet. Ist das Volumen, welches eine Substanz einnimmt (durch Verzweigung, Solvathüllen) kleiner als der mittlere Porendurchmesser der stationären Phase, steht dieser das gesamte Volumen der mobilen Phase zur Verfügung. Durch das Eindringen in die Poren verlängert sich die Verweilzeit des Moleküls in der Säule, folglich eluiert es als letztes. Substanzen, die ein größeres Volumen einnehmen als der mittlere Porendurchmesser, können nicht in die Poren gelangen (Ausschluss) und werden mit der mobilen Phase als erste Komponenten eluiert [58, 62, 71, 72].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Styrol-Divinylbenzen-Polymer (Biobeads-SX8®) der Firma Biorad verwendet, das aufgrund seines Vernetzungsgrades (8 %) für Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 1000 Dalton geeignet ist.

#### 2.2.5 Festphasenextraktion

Zur Anreicherung, Extraktion und Aufreinigung von analytischen Proben wird häufig die Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction*, SPE) eingesetzt, da sie im Gegensatz zur klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion weniger Lösemittel benötigt und automatisierbar ist. Bei der SPE kann man wie bei der Flüssigchromatographie in Abhängigkeit von der verwendeten stationären Phase zwischen einer Normalphasen-, einer Umkehrphasen- und Ionenaustausch-SPE unterscheiden. Die Trennung der Analyte beruht bei der SPE auf physikalisch-chemischen Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräften, Dipol-Dipol-,  $\pi$ - $\pi$ - und ionischen Wechselwirkungen) zwischen dem Analyt (gelöst in flüssiger Phase) und der festen Phase bzw. beim Eluieren zwischen dem Analyt und dem Elutionsmittel. Das Adsorbens und das Elutionsmittel sollten dabei so gewählt

werden, dass die Affinität des Analyten zur stationären Phase größer ist als die zur flüssigen Phase und dass die Elutionskraft des Lösemittels die Wechselwirkung des Analyten mit der Festphase aufhebt [61, 72, 76, 77].

### 2.2.6 Festphasenmikroextraktion

Das Prinzip der Festphasenmikroextraktion (*Solid Phase Microextraction*, SPME) besteht in der selektiven Adsorption von Analyten an einer mit einem Polymer beschichteten Quarzfaser und einer nachfolgenden Desorption. Diese lösemittelfreie Extraktionsmethode wurde erstmals 1989 durch Pawlyszin et al. vorgestellt und wird bevorzugt angewendet, wenn nur geringe Mengen an Probe zur Verfügung stehen. Für die Extraktion stehen heute verschiedene Faserbeschichtungen zur Verfügung, so dass Analyte unterschiedlicher Polarität adsorbiert werden können. Tab. 5 zeigt eine Übersicht der Fasertypen und ihrer Anwendungsbereiche.

**Tab. 5: Faserbeschichtungen und ihre Anwendungsbereiche**

Faserbeschichtung	Kurzbezeichnung	Anwendungsbereich
Polydimethylsiloxan	PDMS	flüchtige und mittelflüchtige Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht
Polyacrylat	PA	polare organische Verbindungen
Carbowax	CW	Alkohole und kleine polare Analyte
Polydimethylsiloxan/ Divinylbenzen	PDMS/ DVB	polare, leichtflüchtige Substanzen (Amine, Alkohole)
Polydimethylsiloxan/ Carboxen	PDMS/ Carboxen	Spurenanalytik leichtflüchtiger Substanzen
Carbowax / Divinylbenzen	CW/ DVB	polare Analyte

In Abhängigkeit der Schichtdicke (7 - 100 µm) können unterschiedliche Beladungsmengen erreicht werden.

Die Anreicherungstechnik für die Analyte variiert aufgrund ihrer unterschiedlichen Flüchtigkeit und der Matrixbelastung der Probe. Die direkte SPME (Faser taucht in die Probe) wird vor allem bei mittel- und schwerflüchtigen Verbindungen angewendet, wenn die Probenlösung nur wenig Matrix enthält. Bei der Headspace-SPME befindet sich die Faser im Dampfraum über der Probe. Diese wird dann verwendet, wenn die

Substanzen leichtflüchtig sind, oder aber die Probe sehr viel Matrix aufweist, die die Faser nachhaltig schädigen kann.

Die Desorption der Analyte erfolgt anschließend durch einen thermischen Prozess im Injektor eines Gaschromatographen oder durch das Elutionsmittel bei der HPLC mit Hilfe eines speziellen Interfaces [76 - 80].

### 2.2.7 Kernresonanz-Spektrometrie

Die Kernresonanzspektrometrie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) wurde 1946 entwickelt und ist heute eine in der Chemie häufig verwendete Methode zur Strukturaufklärung. Der Vorteil dieser analytischen Methode ist das Erkennen spezifischer Atomgruppen und deren Stellung zueinander in den Molekülen. Voraussetzung für die NMR ist, dass die verschiedenen Isotope ein magnetisches Moment besitzen. Dies ist nur dann gegeben, wenn die Spinquantenzahl  $I \geq \frac{1}{2}$  ist. Von praktischer Bedeutung für die NMR sind die Isotope  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  und  $^{31}\text{P}$  mit einer Spinquantenzahl von  $I = \frac{1}{2}$ . Sie besitzen zwei verschiedene Energiezustände (Kern-Zeeman-Niveaus), einen energieärmeren und einen energiereicheren.

Bei der NMR wird die in ein Magnetfeld eingebrachte Probe einem Radiofrequenzpuls ausgesetzt, wodurch es zur Anregung des Atomkerns kommt. Im Bereich kurzer Radiowellen ist dann eine „Resonanz“, d.h. eine Energieabsorption zu beobachten, die zu einem Übergang vom energieärmeren zum energiereicheren Zustand führt.

Bei der NMR-Spektrometrie wird diese Resonanzfrequenz gemessen, welche von der Kernumgebung abhängt. Gleichung 10 beschreibt den Zusammenhang zwischen der effektiven Magnetfeldstärke  $B_{\text{eff}}$ , dem angelegten Magnetfeld  $B_0$  und der Abschirmungskonstante  $\sigma$ .

$$(10) \quad B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \sigma)$$

Je größer die Abschirmungskonstante  $\sigma$  ist, desto kleiner wird die effektive Magnetfeldstärke und das angelegte Feld  $B_0$  muss bei konstanter Frequenz größer sein, um den Kern in Resonanz zu bringen. Die Lage der Signale lässt sich nicht auf einer absoluten Skala darstellen, da die Frequenz  $\nu$  vom angelegten Magnetfeld abhängt. Sie wird auf die Referenzverbindung Tetramethylsilan (TMS) bezogen, deren chemische Verschiebung  $\delta$  Null gesetzt wird. Die chemische Verschiebung ist der Quotient von  $\Delta\nu$  und der Messfrequenz  $\nu$  multipliziert mit dem Faktor  $10^6$  (vgl. Gleichung 11 und 12).

$$(11) \quad \Delta\nu = \nu(\text{X}) - \nu(\text{TMS})$$

$$(12) \quad \delta(X) = 10^6 \frac{\Delta\nu}{\nu}$$

Durch eine Wechselwirkung mit Nachbarkernen, die ein magnetisches Moment besitzen, kommt es zu einer Aufspaltung des Resonanzsignals. Dies zeigt sich durch die Ausbildung von Feinstrukturen (Singulett, Dublett, Multiplett usw.) im Spektrum. Diese Spin-Spin-Kopplung findet nur bei Kernen statt, die chemisch und magnetisch nicht äquivalent sind. Der Abstand zweier Linien eines Signals ist die Kopplungskonstante  $J$ , die in Hertz (Hz) angegeben wird und unabhängig von der Feldstärke ist. Durch sie lassen sich neben der Signallage Rückschlüsse bezüglich der Struktur ziehen.

Zusätzliche Informationen können durch homonucleare ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -korrelierte Spektren) und heteronucleare ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -korrelierte Spektren) Kopplungsexperimente erzielt werden, bei denen die Beziehung zwischen direkt benachbarten (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*, HSQC) oder über mehrere Bindungen entfernte (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, HMBC) Atomgruppen als zweidimensionale Spektren dargestellt werden [62, 71, 72, 81].

### 3. EXPERIMENTELLER TEIL

#### 3.1 Analysengeräte, Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und biologische Proben

Die hier aufgeführten Analysengeräte wurden für die Messungen der Analyte und der biologischen Proben verwendet.

- 2 \* Perkin Elmer Gaschromatograph „Autosystem“ gekoppelt mit Elektroneneinfangdetektor (<sup>63</sup>Ni-Katalysator) mit und ohne Autosampler
- 2 \* Hewlett Packard Gaschromatograph HP 6890 gekoppelt mit Elektroneneinfangdetektor und Autosampler
- Hewlett Packard Gaschromatograph HP 6890 gekoppelt mit Massenspektrometer HP 5973 und Autosampler
- Varian HPLC-Anlage „ProStar“ mit UV-Detektor
- Beckmann HPLC-Anlage „System Gold“ mit Diaodenarray-Detektor
- Dionex Ionenchromatograph „DX 100“
- Agilent HPLC-Anlage 1100 gekoppelt mit Applied Biosystem Massenspektrometer „API 2000“

Im Folgenden werden die verwendeten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

- Aluminiumfolie
- Analysenwaagen (Ohaus: Adventurer™; Kern 770)
- Bakerbond SPE Glaskartusche (8 mL)
- Bechergläser (20 mL, 50 mL, 100 mL)
- Crimperzangen
- Crimper-Vial (22 mL), Alukappe mit Septum
- Chromatographiesäule (NS 19, Länge: 25 cm, Ø 15 mm)
- Erlenmeyerkolben mit Schliff (50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL)
- Faltenfilter (Macherey-Nagel; MN 615 ¼, Ø 150 mm)
- Faltenfilter (S&S 595 ½, Ø 90 mm)
- GPC-Säule (Firma Latek, Länge: 47,5 cm, Ø 2,5 cm)
- Hahn mit Schliff (NS 29)
- Heizplatte mit Magnetrührer (Heidolph: MR 3001 K)
- Heitzschmikroskop (Boëtius: 78/5350)
- HPLC-Pumpe (Firma Knauer)
- Kristallisierschale (100 mL, 500 mL)

- Maßkolben mit Stopfen (1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 1L)
- Messpipette (10 mL)
- Messzylinder (10 mL, 25 mL 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL)
- Mikroliterspritzen (10 µL, 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL, 5 mL)
- Mörser und Pistill
- Pasteurpipetten
- Probenvials 2 mL mit Schraubkappe, Septa und Insert
- Rotationsverdampfer (Heidolph: Laborota 4002 digital)
- Rundkolben (250 mL)
- Scheidetrichter mit Stopfen
- Spitzkolben (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL)
- SPME-Faser unterschiedlicher Beschichtung (PDMS, PDMS/DVB, PA, Carbowax/DVB, Carboxen/PDMS)
- Ultramikrowaage (Mettler-Toledo AG: METTLER UMT2)
- Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100 H)
- Ultraturax (Firma Heidolph: DIAX 900 mit Zerkleinerungswerkzeug)

In Tab. 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösemittel aufgelistet.

**Tab. 6: Chemikalien und Lösungsmittel**

Chemikalie/ Lösungsmittel	Reinheit in %	Firma
Ameisensäure	p.A.	Merck
Ammoniak-Lösung	25,0	Roth
Ammoniumformiat	p.A.	Fluka
Acetonitril CHROMASOLV <sup>®</sup>	99,9	Riedel-de Haën
Arachidonsäure	99,0	Sigma-Aldrich
Biobeads SX-8	p.A.	BioRad
Chloroform-d	99,9	Sigma-Aldrich
Cyclohexan PESTANAL <sup>®</sup>	99,5	Riedel-de Haën
Dichlormethan (getrocknet)	99,8	Riedel-de Haën
Diethylether (getrocknet über Molekularsieb) H <sub>2</sub> O-Gehalt ≤ 0,005 %, stabilisiert	99,8	Fluka
Docosahexaensäure	99,0	Sigma-Aldrich
Eicosapentaensäure	99,0	Sigma-Aldrich

Essigsäureanhydrid	99,0	Fluka
Essigester ROTISOLV <sup>®</sup>	99,8	Roth
Florisil für Pestizidanalytik (60 – 100 mesh)	p.A.	Fluka
n-Hexan PESTANAL <sup>®</sup>	95,0	Fluka
n-Hexadecanol	99,0	Fluka
Iod	99,8	Fluka
Kaliumiodid	99,5	Fluka
Kieselgel 60 Korngröße: 0,063 - 0,200 mm	p.A.	Merck
Lactoperoxidase from bovine milk		Sigma-Aldrich
Methanol (HPLC Grade)	99,9	Fisher Scientific
Methanol ROTISOLV <sup>®</sup>	99,9	Roth
Natriumacetat wasserfrei	99,0	Fluka
Natriumcarbonat	99,5	Merck
Natriumhydrogencarbonat	99,5	Merck
Natriumsulfat wasserfrei	99,0	Fluka
Natriumthiosulfatlösung 0,1 N	p.A.	Roth
n-Octadecanol	99,0	Fluka
PCB No. 101	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH
PCB No. 180	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH
PCB No. 209	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Phosphatpuffer-Lösung (0,1 M; pH 7,4)	p.A.	Sigma-Aldrich
Pyridinium-chlorochromat	98,0	Fluka
Quecksilber(II)-chlorid	99,5	Fluka
Wasserstoffperoxid (3%)	p.A.	Sigma-Aldrich

Die untersuchten Schweineschilddrüsen, die als Modellsysteme für die Methodenentwicklung herangezogen wurden, stammen aus einem lokalen Schlachthof in Weißenfels. Die Schilddrüsen wurden nach Tötung der Schweine aus dem Tierkörper entfernt und bei - 18 °C eingefroren. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Schilddrüsen zunächst von umliegendem Gewebe (hauptsächlich Bindegewebe) befreit und separat wieder tiefgefroren. Die Lagerung fand im Dunklen bei - 18 °C im Gefrierschrank statt.

### 3.2 Entsorgung

Die bei der Synthese verwendeten Reaktionslösungen wurden in einem Sammelbehälter für organische, halogenhaltige Rückstände gesammelt. Weiterhin wurden bei der Synthese anfallende Filtrerrückstände von Pyridium-chlorochromat, Quecksilber(II)-chlorid und Quecksilber(II)-Iodid separat gesammelt. Sie benötigen eine gesonderte Entsorgung aufgrund ihrer Giftigkeit und ihres Umweltgefährdungspotentials. Die Analysenlösungen enthielten verschiedene PCB-Standards. Sie gelten als persistent und stark wassergefährdend (WGK 3). Wie andere persistente Verbindungen müssen auch diese gesondert entsorgt werden.

### 3.3 Messbedingungen

Die Iodlipide wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht. Die Analysen stützen sich dabei auf gaschromatographische als auch flüssigchromatographische Methoden. Neben dem Nachweis der Analyte in den Proben wurden auch spektroskopische Methoden zur Identifizierung der synthetisierten Substanzen angewendet. Die dabei verwendeten Analysengeräte wurden bereits im Abschnitt 3.1 aufgeführt. In diesem Absatz sollen nun die entsprechenden Messbedingungen aufgezeigt werden.

Für eine erste Strukturaufklärung und die Stabilitätsuntersuchungen wurde ein Gaschromatograph gekoppelt mit einem Massenspektrometer (Firma Hewlett Packard) verwendet. Die Messbedingungen sind in Tab. 7 aufgeführt.

**Tab. 7: Geräteparameter des GC-MS**

Parameter	Iodaldehyde	Iodlactone
Säule	Factor Four VF5ms (Varian) (30 m * 0,25 mm ID * 0,2µm D <sub>F</sub> )	
Injektortemperatur	230 °C	270 °C
Injektionsvolumen	1 µl	
Split	ab 0,5 min; 61,5 mL/min	
Temperaturprogramm	60 °C - 1 min → 220 °C mit 40 K/min – 10 min → 280 °C mit 45 K/min - 20 min	
Trägergas, Flussrate	Helium, 1 mL/min	
Temperatur der Transferline	230 °C	270 °C
Temperatur der Ionenquelle	230 °C	

Es wurden Messungen sowohl im Full-Scan (50 - 500 m/z) als auch im *selected ion monitoring* (SIM) durchgeführt. Die benötigten Retentionszeiten, Umschaltzeiten der Diskriptoren, Target- und Qualifierionen wurden anhand von Full-Scan-Messungen bestimmt und sind in Tab. 8 dargestellt.

**Tab. 8: Retentionszeiten, Umschaltzeiten, Target- und Qualifierionen mit ihren dazugehörigen relativen Intensitäten der SIM-Methode**

Substanz	Retentionszeit [min]	Umschaltzeit der Diskriptoren [min]	Targetion [m/z] (relative Intensität)	Qualifierionen [m/z] (relative Intensität)
HDA	7,1	4,0	96 (100 %)	194 (9 %) 222 (5 %)
ODA	9,0	8,0	250 (100 %)	222 (121 %) 224 (180 %)
PCB 101	10,8	10,0	326 (100 %)	254 (72 %) 291 (14 %)
2-IHDA	11,3	11,0	170 (100 %)	221 (37 %) 239 (51 %)
2-IODA	16,9	15,0	170 (100 %)	250 (27 %) 267 (60 %)
AA- $\delta$ -IL	20,1	18,0	303 (100 %)	285 (15 %) 332 (4 %)
EPA- $\delta$ -IL	20,5	20,3	301 (100 %)	428 (0,3%) 79 (151 %)
PCB 209	20,9	20,7	498 (100 %)	214 (87 %) 427 (63 %)
DHA- $\gamma$ -IL	23,2	21,5	327 (100 %)	175 (107 %) 257 (27 %)

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze, sowie die Gehaltsbestimmungen in den biologischen Proben wurden Messungen an zwei verschiedenen Gaschromatographen gekoppelt mit Elektroneneinfang-Detektoren (Firma Perkin Elmer und Firma Hewlett Packard) durchgeführt. Die Bedingungen für den GC-ECD der Firma Perkin Elmer sind in nachfolgender Tab. 9 dargestellt und die Geräteparameter für die ECDs (Firma Hewlett Packard) in Tab. 10 aufgeführt.

**Tab. 9: Arbeitsbedingung GC-ECD (Firma Perkin Elmer)**

Parameter	Iodaldehyde	Iodlactone
Säule	CP-SIL8/MS low bleed (30 m * 0,25 mm ID * 0,25 µm D <sub>f</sub> )	
Temperaturprogramm	60 °C - 1 min → 220 °C mit 40 K/min – 10 min → 280 °C mit 45 K/min - 7 min	60 °C - 1 min → 220 °C mit 40 K/min – 10 min → 280 °C mit 45 K/min - 20 min
Injektortemperatur	230 °C	270 °C
Detektortemperatur	300 °C	
Trägergas	Helium	
Flussrate/ Druck	1 mL/min / 13,2 psi	
Make-up-Gas/ Fluss	Stickstoff; 60 mL/min	
Split	ab 1 min; 15 mL/min	
Injektionsvolumen	1 µL	

**Tab. 10: Arbeitsbedingungen der GC-ECDs (Hewlett Packard)**

Parameter	GC-ECD 1	GC-ECD 2
Säule	HP-1 (30 m * 0,53 mm * 2,65 µm)	DB-5MS (25 m * 0,2 mm * 0,33 µm)
Temperaturprogramm	60 °C - 1 min → 220 °C mit 40 K/min – 33 min → 280 °C mit 45 K/min - 7 min	60 °C - 1 min → 220 °C mit 40 K/min – 28 min → 280 °C mit 45 K/min - 7 min
Injektortemperatur	230 °	
Detektortemperatur	270 °	
Trägergas	Helium	
Flussrate/ Druck	5 ml/min / 27 kPa	0,6 mL/ min
Make-up-Gas	Stickstoff, 50 mL/min	
Split	ab 1 min, 17 mL/ min	
Injektionsvolumen	1 µL	

Ein langfristiges Ziel der Arbeit bestand darin, eine Methode für den parallelen Nachweis der Iodaldehyde und der Iodlactone zu entwickeln. Aufgrund von Optimierungsversuchen (vgl. Abschnitt 4.2.2.1) konnte jedoch gezeigt werden, dass die beiden Sub-

stanzen unterschiedliche Temperaturen als optimale Injektortemperatur besitzen. Um eine mögliche Diskriminierung der beiden Substanzklassen durch eine falsch gewählte Temperatur mit den Folgen einer Anreicherung bzw. einer Zersetzung auszuschließen, wurde am GC-ECD eine *on-column*-Injektionsmethode entwickelt. Zum Schutz der Analysensäule wurde zusätzlich eine desaktivierte Vorsäule (1 m \* 0,2 mm \* 0,33 µm D<sub>F</sub>) vorgeschaltet.

Des Weiteren wurde das Temperaturprogramm (60 °C - 1 min → 220 °C mit 40 K/min - 5 min → 240 °C mit 35 K/min - 29 min → 280 °C mit 70 K/min - 10 min) dahingehend angepasst, dass beide Substanzklassen mit einer Methode analysiert werden konnten.

Die Bestimmung mit flüssigchromatographischen Methoden erfolgten an einer HPLC-Anlage mit DAD der Firma Beckmann (vgl. Tab. 11) und einer HPLC-Anlage mit UV-Detektor der Firma Varian (siehe Tab. 12).

**Tab. 11: Methodenparameter der HPLC-DAD (Firma Beckmann)**

Parameter	Spezifikation
Säule	Nucleosil 100 Å – 5 µm C18 25 cm * 4 mm ID; 5 µm Partikelgröße
Pumpen	Beckmann 125 <i>Solvent Modul</i>
Eluent	isokratisch, 100 % Acetonitril
Flussrate	0,8 mL /min
Injektionsvolumen	20 µL
Detektor (Wellenlängenbereich)	Beckmann <i>Diode Array Detector Modul</i> 168 (λ= 190 - 520 nm)

**Tab. 12: Arbeitsbedingung der HPLC-UV (Firma Varian)**

Parameter	Spezifikation
Säule	LiChrospher 100 RP-18 12,5 cm * 4 mm ID; 5 µm Partikelgröße
Pumpen	<i>Solvent Delivery Modul</i> 210; 10 mL Pumpenkopf
Eluent	isokratisch, 100 % Acetonitril
Flussrate	0,7 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Detektor (Wellenlängenbereich)	ProStar 320 ( $\lambda = 218$ nm)

Des Weiteren wurde ein LC-MS/MS für die Untersuchungen der Iodlipide eingesetzt. Der Vorteil gegenüber den vergleichsweise unspezifischen UV- bzw. DAD-Detektoren ist ein selektiver Nachweis der Iodlipide anhand von charakteristischen Massenfragmenten. Die Messbedingungen der HPLC sind in Tab. 13 aufgeführt.

**Tab. 13: Arbeitsbedingungen der HPLC (Agilent 1100)**

Parameter	Spezifikation
Säule	Reprosil Pur 120 C-18 AQ 10 cm * 2 mm ID; 5 µm Partikelgröße
Pumpen	binäre Pumpe G 1312A
Eluent	isokratisch, MeOH/ H <sub>2</sub> O (90/10; v/v) mit 0,2 mM HCOONH <sub>4</sub>
Flussrate	0,2 mL/min
Injektionsvolumen	5 µL
Detektor	Massenspektrometer API 2000 (Quadrupol)

Die Geräteeinstellungen des Massenspektrometers API 2000 basieren auf der Direkt-Infundierung der Einzelreferenzsubstanzen und wurden mit der in der Software verankerten automatischen Optimierungsanalyse (FIA) ermittelt. Allgemeine Einstellungen, wie zum Beispiel die Temperatur des Interface (TEM) oder die Einstellung des *Curtain Gas* (CUR), sind in Tab. 14 aufgezeigt.

**Tab. 14: Allgemeine Parameter des MS (API 2000)**

Parameter	Einstellung	Einstellungen für negativen Modus
Spannung	5500 V	-4500 V
Temperatur (TEM)	300 °C	400 °C
<i>Curtain Gas</i> (CUR)	30 kPa	30 kPa
<i>Ion Source Gas 1</i> (GS1)	50 kPa	60 kPa
<i>Ion Source Gas 2</i> (GS2)	20 kPa	40 kPa
<i>Collision Gas</i> (CAD)	7 kPa	10 kPa

Während die Iodlactone im positiven Ionisierungsmodus gemessen werden konnten, gelang der Nachweis der Iodaldehyde nur im negativen Modus. In Tab. 15 und Tab. 16 sind die substanzspezifischen Parameter angegeben.

**Tab. 15: Substanzspezifische Messbedingungen des API 2000 (positiver Modus)**

Substanz	AA- $\delta$ -IL		EPA- $\delta$ -IL		DHA- $\gamma$ -IL	
	448_303	448_285	446_301	446_131	472_175	472_327
Übergang						
DP	30,0	10,0	15,0	10,0	10,0	15,0
FP	400,0	400,0	400,0	350,0	400,0	400,0
EP	8,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0
CEP	15,0	15,0	15,0	15,0	20,0	25,0
CE	15,0	15,0	15,0	30,0	20,0	15,0
CXP	5,0	5,0	4,0	5,0	4,0	5,0

**Tab. 16: Substanzspezifische Messbedingungen des API 2000 (negativer Modus)**

Substanz	2-IHDA		2-IODA	
	365_127	365_103	393_127	393_343
Übergang				
DP	-10,0	-25,0	-15,0	-10,0
FP	-250,0	-350,0	-350,0	-250,0
EP	-5,0	-10,0	-5,0	-5,0
CEP	-30,0	-20,0	-30,0	-20,0
CE	-20,0	-30,0	-20,0	-25,0
CXP	-2,0	-5,0	-5,0	-3,0

Zur Reinheits- und Ausbeutenkontrolle der Iodlipide über nicht umgesetztes Iod wurde mit einem Ionenchromatograph der Firma Dionex unter den in Tab. 17 aufgeführten Bedingungen gearbeitet.

**Tab. 17: Arbeitsbedingungen der Ionenchromatographie**

Parameter	Spezifikation
Säule	Ion Pac AS4A-SC (Dionex) Anionenaustauschersäule mit quartären Ammoniumgruppen
Detektor	Leitfähigkeitsdetektor
Eluent	1,8 mmol/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (wasserfrei) + 1,7 mmol/L NaHCO <sub>3</sub>
Eluentenfluss	1,5 mL/min
Regenerent	10 mmol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Regenerentenfluss	2 mL/min

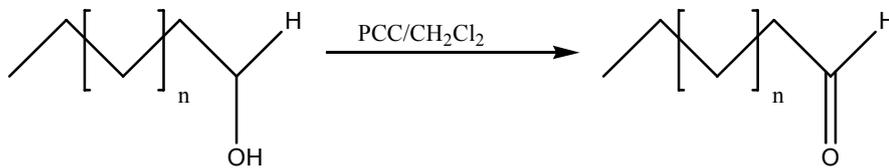
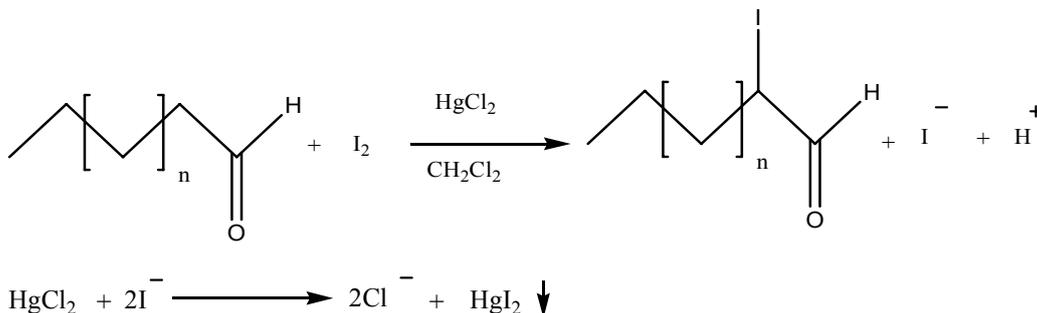
Zur Identifizierung der synthetisierten Iodlipide wurden NMR-Spektren mit Hilfe eines GEMINI-2000 Spektrometers der Firma Varian aufgezeichnet. In Tab. 18 sind die Arbeitsbedingungen aufgeführt.

**Tab. 18: Messbedingung der NMR**

Parameter	Spezifikation
Lösungsmittel	CDCl <sub>3</sub>
Temperatur	27,0 °C
interner Standard	Tetramethylsilan
Aufnahmefrequenz <sup>1</sup> H	500 MHz
Aufnahmefrequenz <sup>13</sup> C	125 MHz

### 3.4 Synthese der Iodaldehyde

Die Synthese der Iodaldehyde basiert auf einem zweistufigen Syntheseprozess, der zunächst die Oxidation des entsprechenden Alkohols (n-Hexadecanol und n-Octadecanol) zu den korrespondierenden Aldehyden beinhaltet (Abb. 18). Im zweiten Schritt (Abb. 19) erfolgt die Iodierung dieser zu den gewünschten Iodaldehyden (2-Iodhexadecanal und 2-Iodoctadecanal). Die Synthese erfolgte unter Lichtausschluss bzw. unter Rotlicht, da die entstehenden Reaktionsprodukte eine Zerfallsreaktion im polychromatischen Licht zeigen. Die synthetisierten Standards wurden mit Hilfe der NMR-Spektrometrie und Massenspektrometrie identifiziert.

**Abb. 18: Oxidation des Alkohols (n = 12 für HDA, n = 14 für ODA)****Abb. 19: Iodierung nach van der Bergen et al. und Iodabfangreaktion**

Bei der Reaktion entstandenes Iodid wird durch Quecksilber-II-chlorid abgefangen und ist als oranger Niederschlag während der Reaktion zu beobachten.

### 3.4.1 Synthese von *n*-Hexadecanal und *n*-Octadecanal

Die zunächst verwendete Methode nach H. Van den Bergen et al. (siehe Abschnitt 3.4.1.1) wurde im Laufe der Arbeit bezüglich der eingesetzten Stoffmengen und der Aufarbeitung weiter optimiert und ist im Abschnitt 3.4.1.2 dargestellt.

#### 3.4.1.1 Methode nach H. Van den Bergen et al. [82]

5,33 g (24,7 mmol) PCC werden in 30 mL Dichlormethan suspendiert. Dazu werden 4 g (16,4 mmol) Hexadecanol bzw. *n*-Octadecanol gelöst in 16 mL Dichlormethan gegeben. Diese Mischung wird 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 30 mL Dichlormethan hinzugefügt und der Ansatz wird über ein Filterpapier gefiltert. Der schwarze Rückstand wird mit trockenem Diethylether (3 x 10 mL) gewaschen. Die vereinigten Extrakte werden im Vakuum getrocknet und der Rückstand über Florisil gefiltert (Elution mit Hexan/Diethylether 8:2). Nach Abrotieren des Lösungsmittels wird *n*-Hexadecanal oder *n*-Octadecanal als ein weißes Pulver erhalten.

#### 3.4.1.2 Optimierte Synthese

1 g (4,15 mmol) *n*-Hexadecanol oder *n*-Octadecanol wird in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst. 2,5 g (11,6 mmol) PCC werden hinzugefügt. Die Mischung wird für 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Filtrieren der Reaktionsmischung wird der schwarze Rückstand zweimal mit je 10 mL Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel der vereinigten Extrakte wird bei 28 °C und einem Druck von 200 mbar abrotiert.

Eine Chromatographiesäule, befüllt mit 15 g Kieselgel, wird mit 30 mL trockenem Diethylether vorgespült. Das Produkt wird in 5 mL Diethylether aufgenommen, auf die Säule gegeben und mit weiteren 25 mL Diethylether eluiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur in einer Kristallisierschale erhält man *n*-Hexadecanal bzw. *n*-Octadecanal.

### 3.4.2 Synthese von 2-Iodhexadecanal und 2-Iodoctadecanal

Für die Iodierung der Aldehyde zu den entsprechenden iodierten Verbindungen konnten zwei verschiedenen Verfahren herangezogen werden. Zum einen die Synthese nach Pereira et al. (siehe Abschnitt 3.4.2.1) und zum anderen eine Synthese nach H. Van den Bergen et al. (siehe Abschnitt 3.4.2.2). Die im Abschnitt 3.4.2.3 aufgezeigte optimierte Synthesemethode stellt dabei eine Abwandlung der Synthese nach H. Van den Bergen dar.

### 3.4.2.1 Methode nach Pereira et al. [22]

1 g *n*-Hexadecanal/*n*-Octadecanal und 85 mg wasserfreies Natriumacetat werden in 4 mL Essigsäureanhydrid für 7 Stunden unter Rückfluss gerührt. 400 mg des gebildeten Isomergemisches von Hexa-/Octadecanolenolacetat werden in 2,5 mL Dioxan gelöst. Zu dieser Reaktionsmischung wird innerhalb von einer Stunde 1 g N-Iod-Succinimid bei Rühren unter Argon hinzugefügt. Das Reaktionsprodukt wird über einer Kieselgelsäule aufgereinigt (Eluent: Hexan/Diethylether (95:5)). 2-Iodhexadecanal bzw. 2-Iodoctadecanal wird durch Kristallisation in Hexan bei -18 °C erhalten.

### 3.4.2.2 Methode nach H. Van den Bergen [82]

Zu 250 mg (1,04 mmol) *n*-Hexadecanal gelöst in 2 mL Dichlormethan werden 141 mg (0,52 mmol) Quecksilber-II-chlorid und 264 mg (1,04 mmol) Iod gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird abfiltriert, bis zur Entfärbung mit einer 0,1 N Natriumthiosulfatlösung und anschließend mit einer gesättigten Kaliumiodidlösung gewaschen. Die organische Phase wird unter Vakuum abrotiert und das Produkt über Kieselgel aufgereinigt. Es wird ein Öl erhalten.

Analog dazu gestaltet sich die Synthese von 2-Iodoctadecanal aus *n*-Octadecanal.

### 3.4.2.3 Verwendete Synthesestrategie

Zu 130 mg (0,54 mmol) *n*-Hexadecanal gelöst in 8 mL Dichlormethan werden 80 mg (0,29 mmol) Quecksilber-II-chlorid und 165 mg (0,65 mmol) Iod gegeben. Die heterogene Reaktionsmischung wird für 25 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wird die Mischung filtriert und das Filterpapier mit Dichlormethan gespült. Das Filtrat wird nacheinander mit einer 0,1 N Natriumthiosulfatlösung (8 mL) und einer gesättigten Kaliumiodidlösung (10 mL) gewaschen. Etwa die Hälfte des Lösungsmittels wird bei 28 °C und einem Druck von 400 mbar abrotiert. Nach Abblasen des restlichen Lösungsmittels unter einem leichten Argonstrom wird 2-Iodhexadecanal als ein weißes, leicht gelbliches Pulver erhalten.

## 3.5 Synthese der Iodlactone

Da auch diese Standards nicht käuflich zu erwerben sind, müssen sie synthetisiert werden. Die verwendeten Synthesewege werden im folgenden Abschnitt anhand des Iodlactons der Arachidonsäure erläutert. Zur eindeutigen Bestimmung der gewonnenen Standards wurden die NMR-Spektrometrie und Massenspektrometrie herangezogen.

### 3.5.1 Enzymatische Synthese

Die benötigten Substanzen werden durch eine Lactoperoxidase katalysierte Iodierung von Arachidonsäure, Docosahexaensäure oder Eicosapentaensäure hergestellt [48].

120 µg Lactoperoxidase ( $\geq 80$  units/mg Protein) werden mit 2,5 mg der Ausgangsfettsäure, 20 µL einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung und 6,64 mg Kaliumiodid in 100 mL Phosphatpuffer-Lösung für 30 min bei 20 °C mittels Magnetrührer vermenget. Anschließend wird dieser Reaktionsansatz zweimal mit je 100 mL Essigester ausgeschüttelt. Die gewonnenen organischen Extrakte werden vereinigt, mit wasserfreien Natriumsulfat getrocknet, filtriert, um das Natriumsulfat abzutrennen, und vorsichtig am Rotationsverdampfer eingeengt.

### 3.5.2 Nicht-enzymatische Synthese nach Kuklev und Smith [23]

50 mg der Arachidonsäure werden in 0,75 mL Ethanol gelöst mit 1,15 mL einer 7,5 %igen Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und 1,5 mL einer ethanolischen Iod-Lösung (4,5 g in 50 mL Ethanol) versetzt. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 2,5 mL Hexan überschichtet und 24 Stunden bei Raumtemperatur intensiv gerührt. Nach Beendigung der 24 Stunden wird die Hexanphase abgenommen und die Reaktionslösung dreimal mit je 2,5 mL Hexan nochmals extrahiert. Die vereinigten Hexanextrakte werden nacheinander mit 1,25 mL einer 5 %igen Natriumthiosulfat-Lösung und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Der Hexanextrakt wird anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, um eine möglicherweise vorhandene wässrige Phase zu beseitigen. Die getrocknete organische Phase wird danach am Rotationsverdampfer eingeengt, wodurch man ein leicht gelbliches Öl erhält.

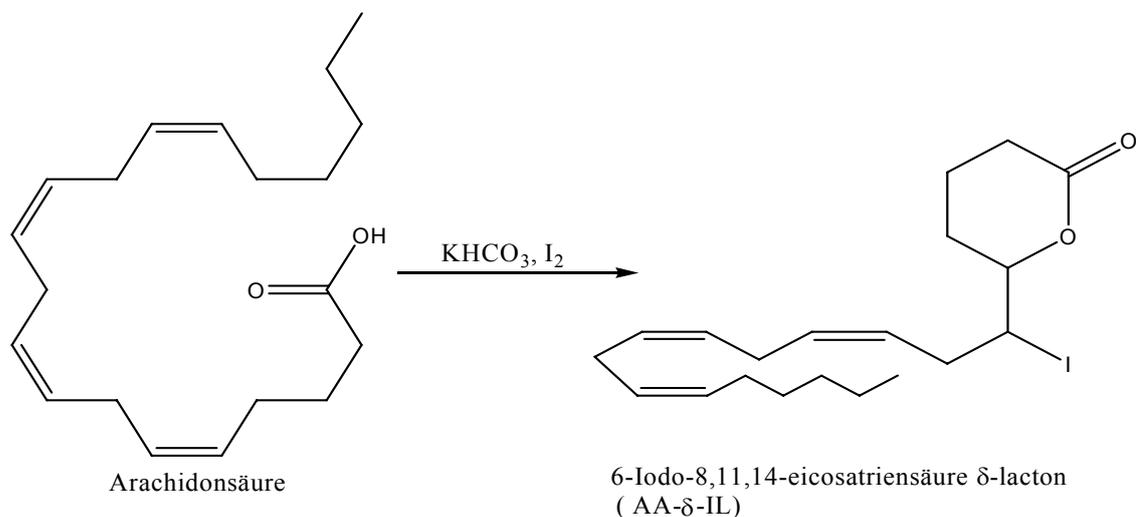


Abb. 20: Reaktionsgleichung der Synthese nach Kuklev und Smith [23]

*Alternative Synthese der Iodlactone von EPA und DHA*

Aufgrund der Kostenintensität der Reinsubstanzen sollten das  $\delta$ -Iodlacton der Eicosapentaensäure und das  $\gamma$ -Iodlacton der Docosahexaensäure aus Fischöl hergestellt und isoliert werden. Das verwendete Fischöl der Firma Schaebens enthält in einer Kapsel 195 mg Omega-3-Fettsäuren, von denen 117 mg Eicosapentaensäure und 78 mg Docosahexaensäure sind. Neben den Fettsäuren war außerdem noch 10 mg Vitamin E in den Kapseln enthalten.

Für die Synthese nach Kuklev werden 30 dieser Fischölkapseln mit einer Kanüle geöffnet und das Fischöl in einem Kolben aufgefangen [23]. Die 30 Kapseln enthalten durchschnittlich 16 g Öl.

Das gesammelte Öl wird in 60 mL Ethanol unter Rühren gelöst und anschließend mit 86 mL einer 7,5 %igen Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und 112 mL einer ethanolischen Iodlösung versetzt. Die Lösung wird mit 190 mL Hexan überschichtet und 24 h bei Raumtemperatur intensiv gerührt.

Nach Beendigung der Synthese wird die Hexanphase abgetrennt und die wässrig/ethanolische Reaktionsmischung noch zweimal mit je 190 mL Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanextrakte werden danach mit 95 mL einer 5 %igen Natriumthiosulfatlösung, 190 mL destilliertem Wasser und 75 mL einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Die so aufgearbeitete Hexanphase wird zur Eliminierung von Wasserrückständen über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die filtrierte Analytlösung wird anschließend am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeeengt.

Man erhält aus dieser Synthese ein gelbliches Öl.

*Aufreinigung des umgesetzten Fischöls*

15 g Kieselgel werden zunächst mit 30 mL Elutionsmittel (Hexan/Essigester 9:1) gewaschen, um coeluerenden Verunreinigungen des Kieselgels zu eliminieren. Danach werden 5 mL des Syntheseextraktes auf die Säule gegeben und mit 80 mL des Lösemittelgemisches eluiert. Das Eluat wird in 50 verschiedenen Fraktionen von je 1,5 mL unterteilt. Nach den 50 Fraktionen wird zusätzlich noch mit 30 mL Hexan und 30 mL Essigester extrahiert, wobei diese Eluate nicht gesondert fraktioniert werden, sondern als 30 mL-Fraktionen in je einem Kolben aufgefangen und am Rotationsverdampfer auf ca. 1,5 mL eingeeengt werden. Die gewonnenen Fraktionen werden mittels GC-ECD vermessen.

### 3.6 Aufarbeitung der biologischen Probe

Die Schilddrüse (*Glandula thyreoidea*) wird von einem dichten Netzwerk aus verschiedenen Blut- und Lymphgefäßen durchsetzt und von Bindegewebe umgeben. Sie besteht aus zwei einzelnen Schilddrüsenlappen (*Lobus sinister* und *Lobus dexter*), die über den Isthmus miteinander verbunden sind. Die Schilddrüsenzellen sind zu funktionellen Einheiten, den Schilddrüsenfollikeln, zusammengeschlossen und werden von einer Lage Epithelzellen begrenzt. Das im Lumen befindliche Kolloid dient den Thyreozyten als extrazellulärer Speicherort für Schilddrüsenhormone und andere organische Substanzen [83, 84].

Aufgrund der Komplexität der Matrix und der geringen Gehalte der zu untersuchenden Analyte (5 % des thyreoidalen Iodids wird in Lipide eingebaut) bedarf die Analyse der biologischen Proben einer Aufarbeitung, die neben einer Abtrennung der vorhandenen Matrix auch eine Aufkonzentrierung der Iodlipide beinhaltet. In Abb. 21 ist ein Aufarbeitungsschema für die biologischen Proben dargestellt.

Der erste Schritt, die Behandlung der Schilddrüsenprobe mit flüssigem Stickstoff, unterstützt das Aufbrechen der funktionellen Einheiten und die Freisetzung des Kolloids aus dem Zellverband. Nachfolgend wird die Probe mittels Ultraturax bzw. Mörser zerkleinert und homogenisiert. Für die Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse wird jeweils 1 g Probenmaterial eingewogen und mittels Hexan/Essigester unter Zuhilfenahme von Ultraturax und Ultraschallbad extrahiert. Die anschließende Filtration über wasserfreiem Natriumsulfat dient hierbei zur Abtrennung von Feststoffen und zur Entfernung etwaiger Wasserreste aus dem Extrakt. Zum weiteren Clean-up des gewonnenen Extraktes wird die Probelösung mittels säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Iodaldehyde und der Iodlactone kommen dabei zwei verschiedene Elutionsgemische zum Einsatz. Nach erfolgter Fraktionierung des Probenextraktes wird die Hauptfraktion auf ein definiertes Volumen des entsprechenden Lösemittels eingestellt und kann der gaschromatographischen bzw. flüssigchromatographischen Analyse zugeführt werden.

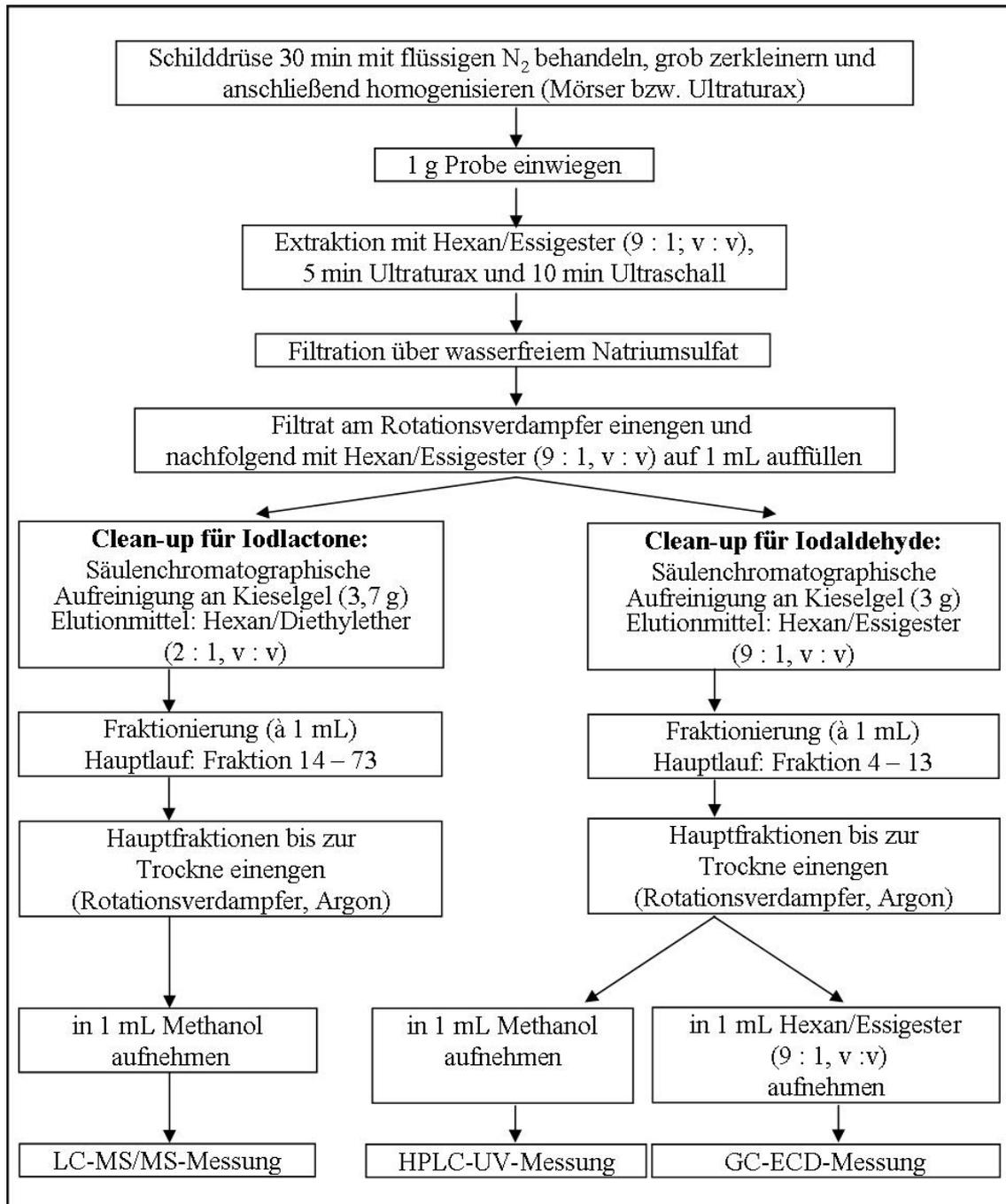


Abb. 21: Aufarbeitungsschema der Schilddrüsenproben für die Bestimmung der Iodlipide

## 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Identifizierung der Iodaldehyde und Iodlactone

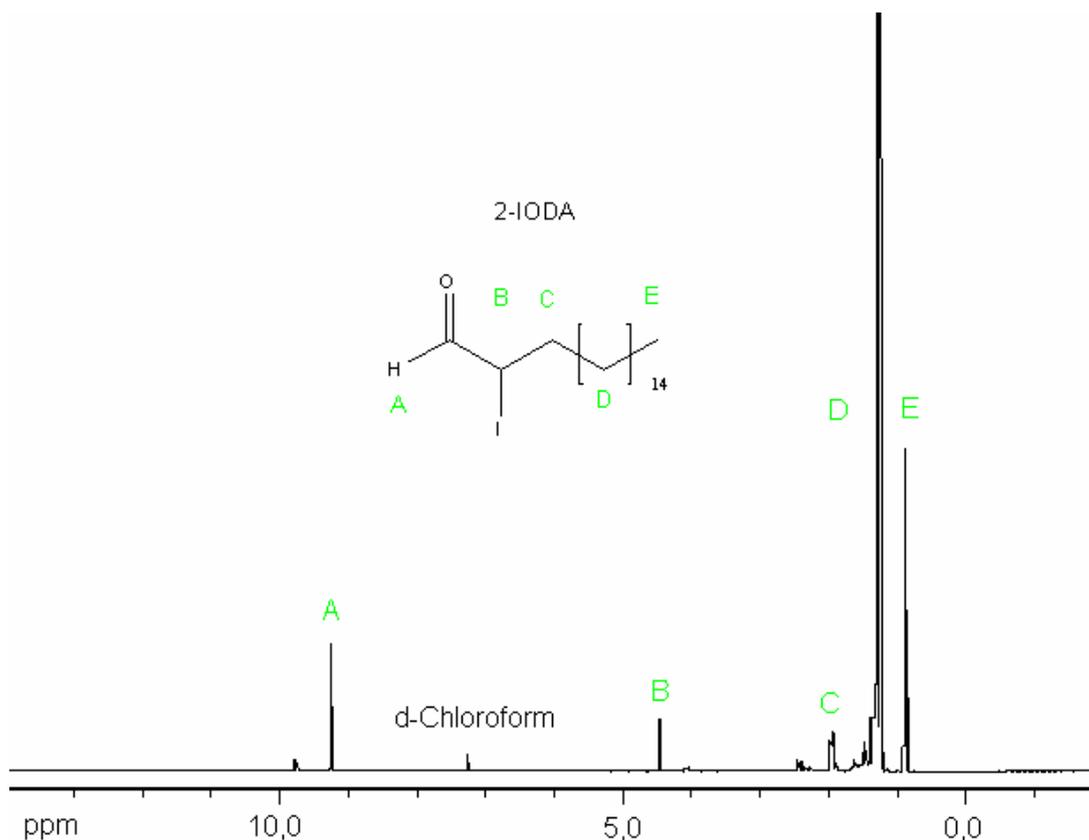
Da die Standards nicht käuflich zu erwerben sind, wurden sie entsprechend den bereits beschriebenen Methoden (siehe Abschnitte 3.4.1.2, 3.4.2.3 und 3.5.1) synthetisiert. Zur strukturellen und quantitativen Absicherung der gewonnenen Standards wurden diese mittels NMR- und Massenspektrometrie identifiziert. Als weitere schnelle Analyt-Charakterisierung wurden die Schmelzpunkte der Iodaldehyde herangezogen. Eine Schmelzpunktbestimmung der Iodlactone war nicht möglich. Sie wurden bei der Synthese als gelbliche Öle erhalten.

#### 4.1.1 NMR-Spektren

Für die strukturelle Aufklärung der synthetisierten Standards wurde die NMR-Spektrometrie herangezogen. Anhand von  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, APT- sowie den Korrelationsspektren COSY, HSQC und HMBC konnten die Substanzen durch einen Vergleich mit der Literatur [82] identifiziert werden. Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten dabei die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und APT-Spektren, wohingegen aus den verschiedenen Kopplungsexperimenten (COSY, HSQC und HMBC) aufgrund der vielen Multipletts nur wenige Informationen zu gewinnen waren.

Als Beispiel sollen in diesem Abschnitt die NMR-Spektren von 2-IODA und AA- $\delta$ -IL näher erläutert werden (NMR-Daten der anderen Analyte siehe Tab-A 1- Tab-A 5).

Die Abb. 22 zeigt zunächst das  $^1\text{H}$ -NMR von 2-IODA, dessen Signale in Tab. 19 genauer aufgezeigt werden.



**Abb. 22: Zuordnung der Signale im  $^1\text{H-NMR}$  von 2-iodo-ODA**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9,25$  (d, 1 H,  $\text{H}_\text{A}$ ,  $J = 3,2$  Hz); 4,45 (dt, 1 H,  $\text{H}_\text{B}$ ,  $J = 7,3$  Hz und 3,2 Hz); 1,94 (m, 2 H,  $\text{H}_\text{C}$ ); 1,25 (m; 28 H,  $\text{H}_\text{D}$ ); 0,87 (t, 3 H,  $\text{H}_\text{E}$ ,  $J = 6,9$  Hz) ppm

Durch die Iodierung des  $\beta$ -C-Atoms kommt es zu einer Deprotonierung dieses C-Atoms. Das im ODA ersichtliche Triplet wird dabei zu einem Dublett, welches außerdem durch eine zusätzliche Entschirmung, bedingt durch das Iod, ins Tieffeld verschoben wird. Das Signal für das Proton ( $\text{H}_\text{B}$ ) verschiebt sich von 2,41 ppm auf 4,45 ppm. Des Weiteren werden die Signale der Protonen  $\text{H}_\text{A}$  und  $\text{H}_\text{C}$ , welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Iod befinden, ebenfalls beeinflusst. Die Protonen, die sich weiter als 4 Bindungen entfernt befinden, bleiben dagegen unbeeinflusst.

Der entscheidende Unterschied zwischen den iodierten und uniodierten Substanzen ist demnach im Signal des Proton  $\text{H}_\text{B}$  zu finden.

Das zusätzliche Signal bei 7,24 ppm stammt vom eingesetzten deuterierten Lösungsmittel Chloroform.

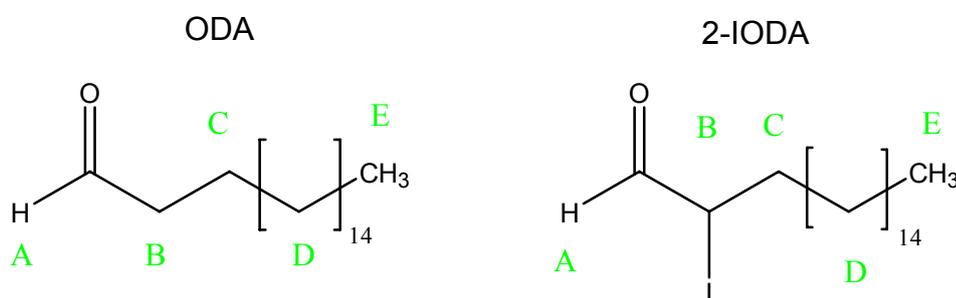
Die berechneten Kopplungskonstanten stimmen mit den Literaturwerten [8] überein. Die Größe der Kopplungskonstante hängt von der möglichen Torsion des Moleküls ab. Frei drehbare C-C-Bindungen ( $\text{H}_\text{B}$  und  $\text{H}_\text{E}$ ) weisen eine Kopplungskonstante von ca. 7 Hz auf, während sterisch anspruchsvolle Strukturen, wie die Aldehydfunktion eine

verringerte Torsion zeigen. Der Betrag der Kopplungskonstante liegt bei diesen zwischen 1 und 3 Hz.

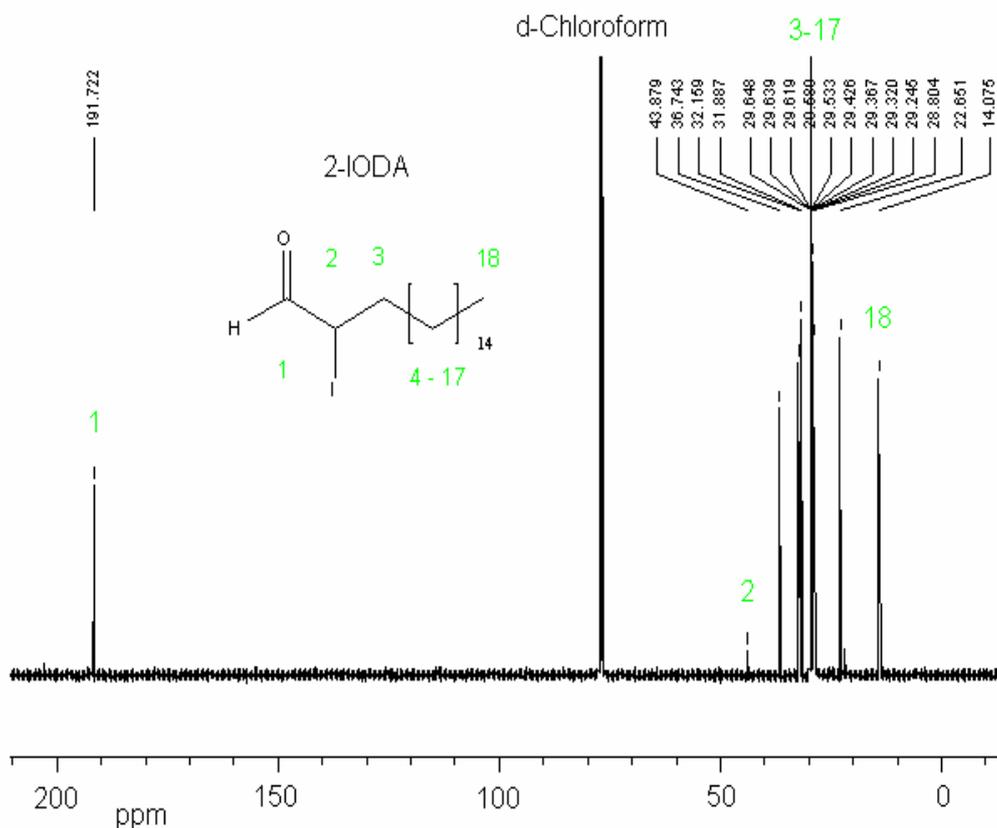
Anhand der Flächenintegrale, die die Signalintensität widerspiegeln, konnte die Anzahl der Protonen bestätigt werden.

**Tab. 19: Zuordnung und Vergleich der chemischen Verschiebung von 2-IODA ( $^1\text{H-NMR}$ )**

		Chemische Verschiebung [ppm]			
		Van den Bergen [82]		experimentell ermittelt	
Signal	Anzahl der Protonen	ODA	2-IODA	ODA	2-IODA
A	1	9,76 (t)	9,25 (d)	9,76 (t)	9,25 (d)
B	2	2,41 (dt)		2,41 (dt)	
	1		4,45 (dt)		4,45 (dt)
C	2	1,63 (m)	1,94 (m)	1,63 (m)	1,94 (m)
D	28	1,26 (m)	1,26 (m)	1,26 (m)	1,25 (m)
E	3	0,88 (t)	0,88 (t)	0,88 (t)	0,87 (t)



**Abb. 23: Zuordnung der Resonanzlinien der  $^1\text{H}$ -Spektren zu den Protonen von ODA und 2-IODA**



**Abb. 24: Zuordnung der Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR von 2-IODA**

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 191,72$ ; 43,88; 36,74; 32,16; 31,89; 29,65; 29,64; 29,62; 29,58; 29,53; 29,43; 29,37; 29,32; 29,24; 28,80; 22,65; 14,08 ppm

Einen weiteren Beleg für die Umsetzung der Aldehyde zu den entsprechenden Iodaldehyden liefert das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (siehe Abb. 24). Hierbei kommt es durch die Iodierung zu einer Signalverschiebung des  $\alpha$ -C-Atoms von 202,2 ppm zu 191,7 ppm. Die anderen Signale bleiben weitestgehend unbeeinflusst. Der Vergleich mit der Literatur ist nicht hierbei möglich, da Van den Bergen et al. lediglich ein  $^1\text{H}$ -Spektrum aufgenommen haben. Die experimentell ermittelten Signalverschiebungen sind in Tab. 20 dargestellt.

**Tab. 20: Experimentell ermittelte Signalverschiebung im  $^{13}\text{C}$ -NMR von ODA und 2-IODA**

Signal	Chemische Verschiebung [ppm]	
	ODA	2-IODA
1	202,2	191,7
2	44,0	43,8
3 - 17	34,1 - 22,2	36,7 - 22,8
18	14,1	14,1

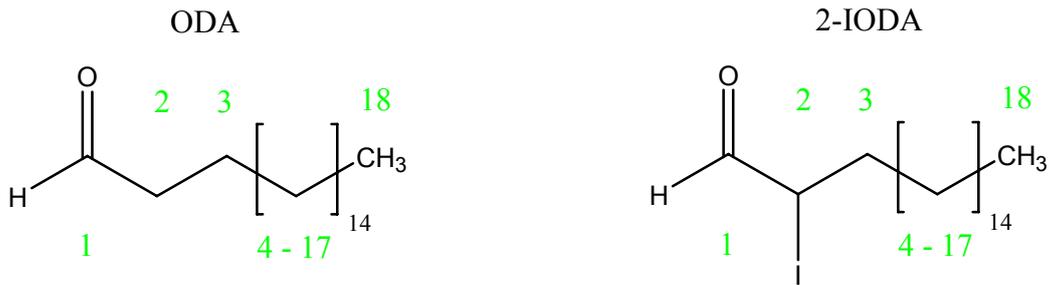


Abb. 25.: Zuordnung der Resonanzlinien der  $^{13}\text{C}$ -Spektren zu den Kernen von ODA und 2-IODA

Der *Attached-Proton-Test* ermöglicht die Unterscheidung von Kohlenstoffatomen mit geradzahliger Protonenanzahl von denen, die eine ungerade Anzahl von Protonen besitzen. Dabei besitzen CH- und CH<sub>3</sub>-Gruppen eine negative Intensität, während quartäre C und CH<sub>2</sub>-Gruppen eine positive Intensität ergeben.

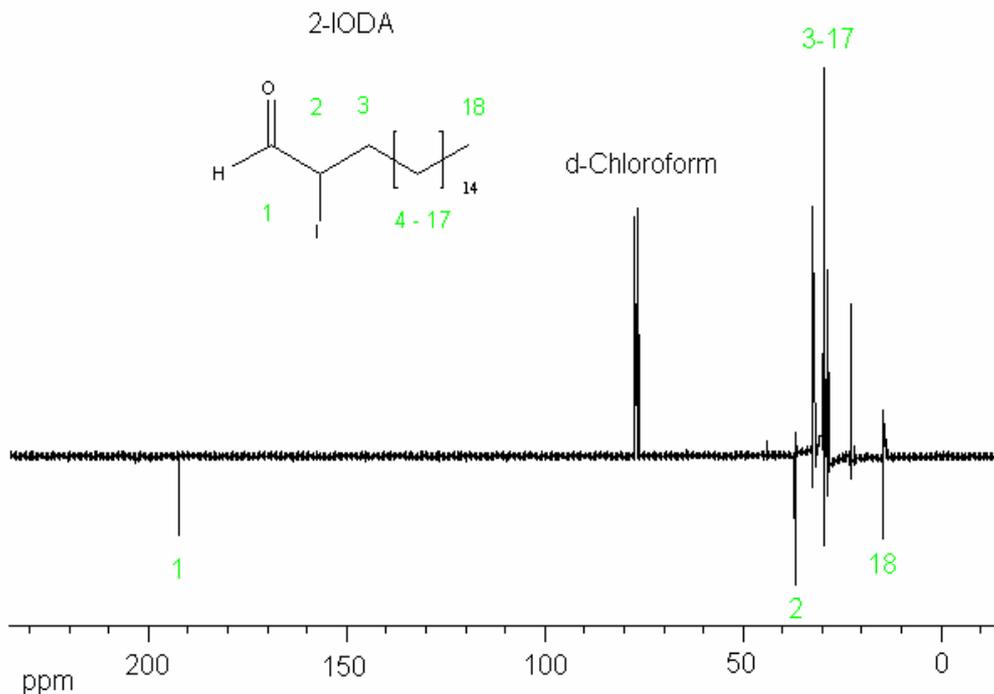


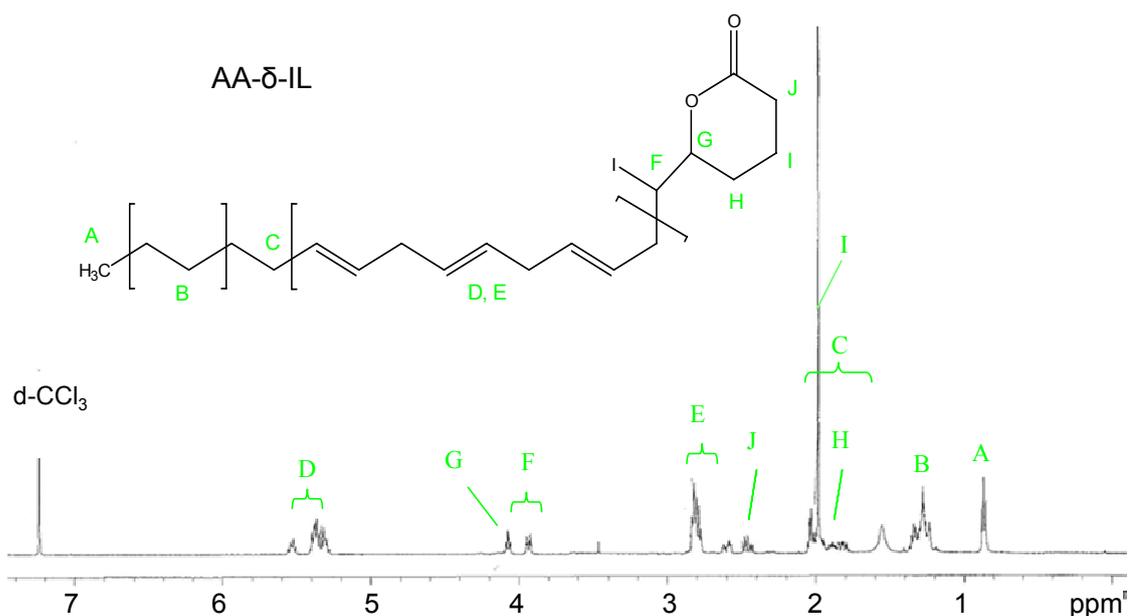
Abb. 26: Zuordnung der Signale im  $^{13}\text{C}$ -APT-Spektrum von 2-IODA

Das charakteristische Signal im APT-Spektrum ist Signal 2 (vgl. Abb. 26). Bei der Umsetzung des Aldehyds zum Iodaldehyd wird aus der einstmals vorhandenen CH<sub>2</sub>-Gruppe eine CH-Gruppe, was anhand der Umkehrung der Signalintensität zu erkennen ist.

Für das Arachidonsäure- $\delta$ -Iodlacton konnten keine Literaturwerte zur Identifizierung herangezogen werden, so dass zunächst die Überprüfung eines Reaktionsumsatzes und

anschließend die Charakterisierung des Syntheseproduktes durch Vergleiche mit NMR-Spektren der Arachidonsäure erfolgte.

Das in Abb. 27 dargestellte  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Iodlactones zeigt im Gegensatz zum  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Arachidonsäure zwei weitere Signale (I und J) und eine Verschiebung der Signale F und G zu tieferem Feld. Des Weiteren kann eine Änderung der Signalmultiplizität für diese beiden Signale beobachtet werden (vgl. Tab. 21).



**Abb. 27:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des AA- $\delta$ -Iodlactons

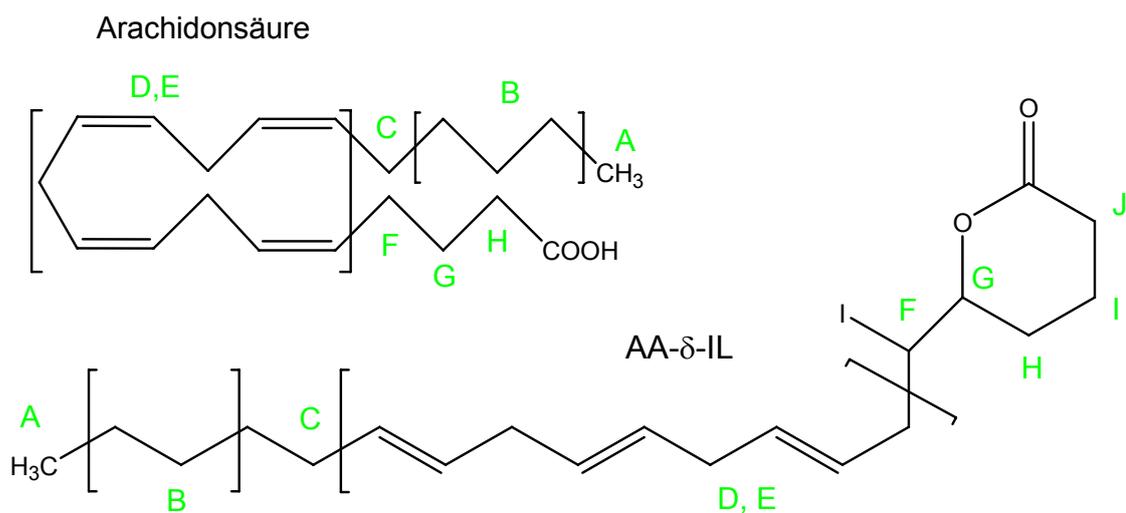
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,85 (t, 3 H,  $\text{H}_A$ ,  $J$  = 6,7 Hz); 1,17-1,31 (m, 6 H,  $\text{H}_B$ ); 1,62-2,02 (m, 2 H,  $\text{H}_C$ ); 1,83-1,86 (m; 2 H,  $\text{H}_D$ ); 1,89-1,96 (m, 2 H,  $\text{H}_E$ ); 2,37-2,45 (m, 2 H,  $\text{H}_I$ ); 2,73-2,79 (m, 6 H,  $\text{H}_E$ ); 3,87-3,91 (dt, 1 H,  $\text{H}_F$ ,  $J$  = 2,9 und 10,9 Hz); 4,01-4,05 (td, 1 H,  $\text{H}_G$ ,  $J$  = 2,5 und 7,5 Hz); 5,23-5,51 (m, 6 H,  $\text{H}_D$ ) ppm

Der signifikante Unterschied zwischen der iodierten und der uniodierten Form in den Signalen F und G beruht hierbei auf der Ausbildung des Lactonrings aus einer Doppelbindung in unmittelbarer Nähe der Protonen und der Substitution eines Protons an C6 durch ein Iodatom (vgl. Abb. 28). Durch den auftretenden (+)*M-Effekt*, der in Verbindung mit dem konjugierten System des Moleküls steht und den (-)*I-Effekt*, welcher mit der Elektronegativität des Iodatoms ( $\text{EN} = 2,66$ ) korreliert, erfolgt für die Signale F und G eine Verschiebung zu tieferen Feld (3,89 ppm bzw. 4,03 ppm). Protonen, die sich weiter als zwei Bindungslängen von der Iodhydrierung entfernt befinden, bleiben weitestgehend unbeeinflusst. Neben der Signalverlagerung zeigt sich außerdem eine Änderung des Aufspaltungsmusters. Während Signal F in der Arachidonsäure ein Quartett und Signal G ein Quintett zeigt, werden die Signale im AA- $\delta$ -IL als ein Dublett von

Triplets bzw. als ein Triplett aus Dubletts dargestellt. Das Auftreten der Signale I und J bestätigt zusätzlich die Umsetzung der Arachidonsäure zum Iodlacton. Das Signal bei 7,24 ppm ist dem verwendeten Lösungsmittel deuteriertem Chloroform zuzuordnen.

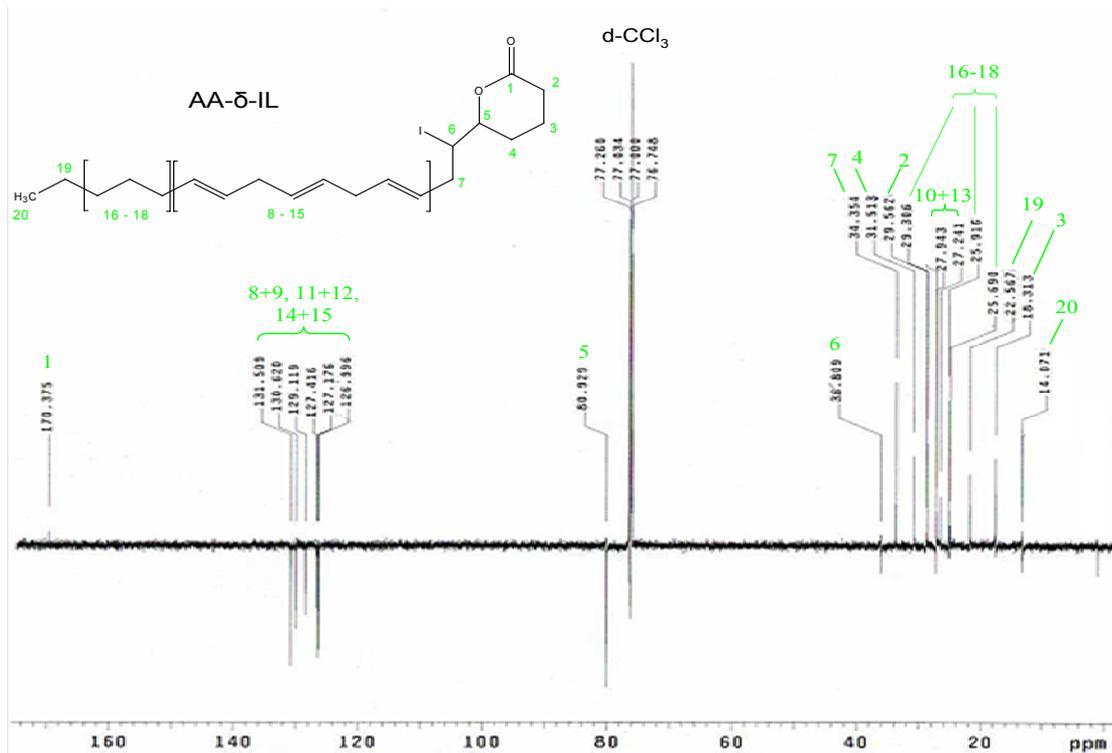
**Tab. 21:** Experimentell ermittelte Signalverschiebung im  $^1\text{H-NMR}$  von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL

Signal	Anzahl der Protonen		Chemische Verschiebung [ppm]	
	AA	AA- $\delta$ -IL	Arachidonsäure (AA)	AA- $\delta$ -IL
A	3	3	0,88 (t)	0,82 (t)
B	6	6	1,29 - 1,38 (m)	1,17 - 1,31 (m)
C	2	2	2,05 (q)	1,62 - 2,02 (m)
D	8	6	5,31 - 5,43 (m)	5,23 - 5,51 (m)
E	6	6	2,80 - 2,84 (m)	2,73 - 2,79 (m)
F	2	1	2,13 (q)	3,87 - 3,91 (dt)
G	2	1	1,71 (qui)	4,01 - 4,05 (td)
H	2	2	2,36 (t)	1,83 - 1,86 (m)
I		2		1,89 - 1,96 (m)
J		2		2,37 - 2,45 (m)



**Abb. 28:** Zuordnung der Resonanzlinien der  $^1\text{H}$ -Spektren zu den Protonen von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL

Wie das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt auch das  $^{13}\text{C}$ -NMR (Abb. 29) die Umsetzung der Arachidonsäure zum  $\delta$ -Iodlacton. Hierbei stellen vor allem die Signale 1, 5 und 6 (Abb. 30) charakteristische Merkmale für die Iodierung und Lactonbildung dar.



**Abb. 29: Zuordnung der Signale im  $^{13}\text{C}$ -APT-Spektrum von AA- $\delta$ -IL**

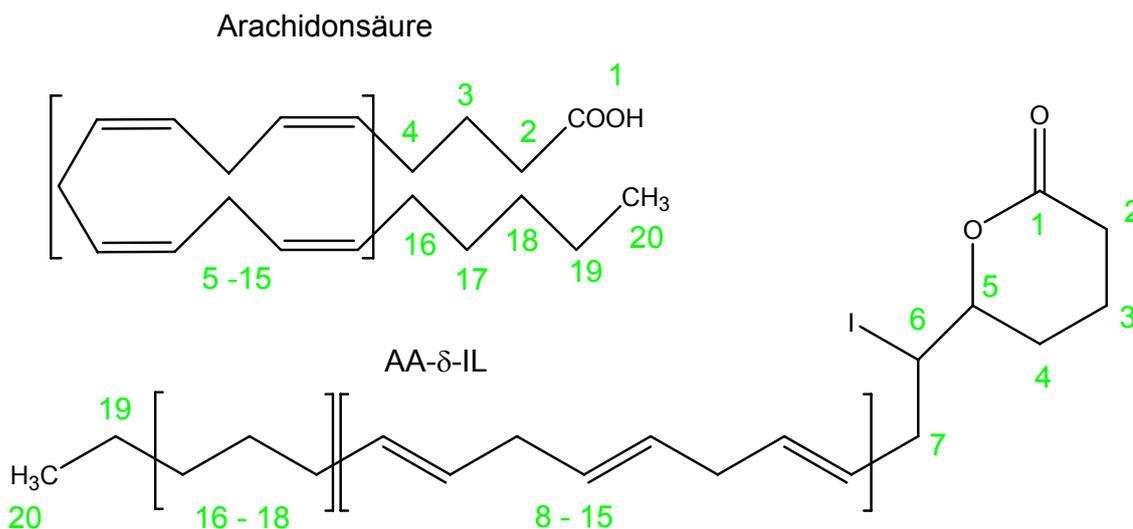
$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,38$ ; 131,51; 130,62; 129,12; 127,42; 127,18; 126,99; 80,93; 36,81; 34,35; 31,51; 29,56; 29,31; 27,94; 27,24; 25,92; 25,69; 22,57; 18,13; 14,07 ppm

Durch einen direkten Vergleich mit dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Arachidonsäure zeigt sich, dass durch die Iodierung eine Signalverschiebung zweier Resonanzlinien vom Bereich um 128 ppm zu höherem Feld erfolgt (vgl. Tab. 22). Die Signale von C5 und C6 werden durch die Aufhebung der Doppelbindung in den Bereich von aliphatischen  $\text{CH}_2$ -Gruppen verlagert. Durch den *(-)*-Effekt, der sich bereits bei den Protonen bemerkbar machte, kommt es zu einer minimalen Verschiebung in Richtung tiefes Feld und somit zu einer Signalgebung bei 36,81 ppm für C6. Durch die Nachbarschaft von C5 zur Carboxylgruppe und den elektronenziehenden Einfluss dieser, erhält der Kern von C5 im Vergleich zum C6-Kohlenstoffkern eine stärkere Abschirmung. Als Folge wird dieses weiter in Richtung tiefem Feld verschoben und generiert ein Signal bei 80,93 ppm.

Zusätzlich zu diesen beiden Signalen stellt die Signalwanderung der Carboxylgruppe von 179,37 zu 170,38 ppm ein charakteristisches Merkmal der Reaktion von Arachidonsäure zum entsprechenden Iodlacton dar.

**Tab. 22: Experimentell ermittelte Signalverschiebung im  $^{13}\text{C}$ -NMR von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL**

Signal	Chemische Verschiebung [ppm]	
	Arachidonsäure	AA- $\delta$ -IL
1	179,37	170,38
2	33,26	29,56
3	24,46	18,31
4	26,41	31,51
5	127,51-130,46	80,93
6	127,51-130,46	36,81
7	25,59	34,35
8 + 9	127,51-130,46	126,99 - 131,51
10	25,61	25,69 - 27,95
11 + 12	127,51-130,46	126,99 - 131,51
13	25,59	25,69 - 27,95
14 + 15	127,51-130,46	126,99 - 131,51
16	27,18	29,31 - 25,92
17	29,78	29,31 - 25,92
18	31,48	29,31 - 25,92
19	22,53	22,57
20	14,01	14,07



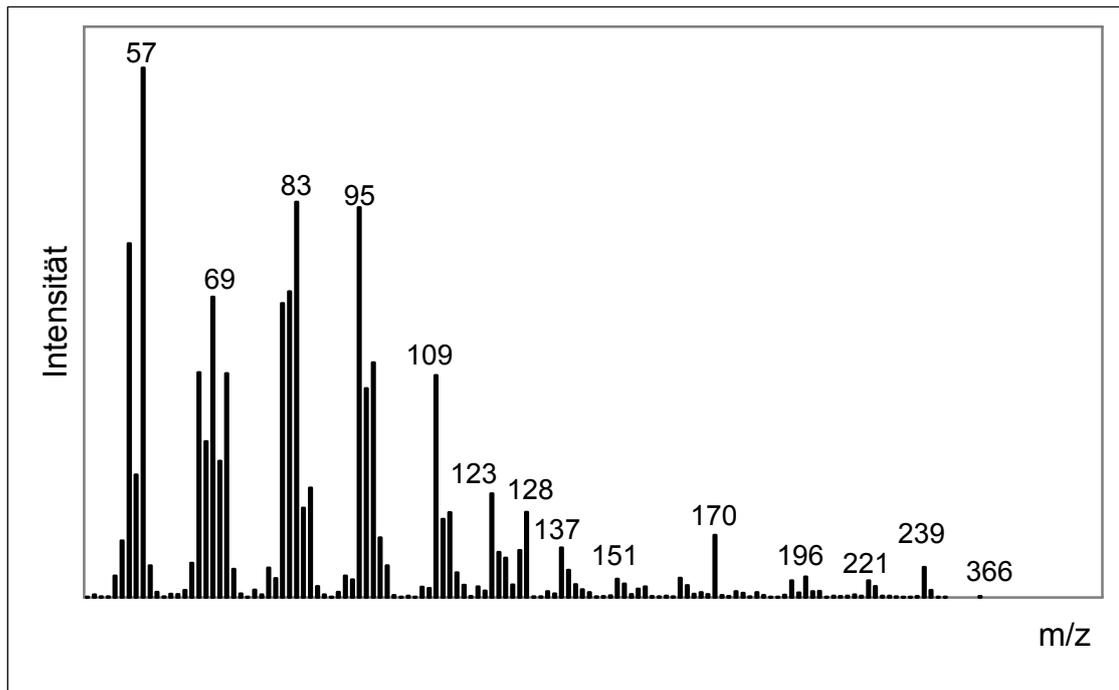
**Abb. 30: Zuordnung der Resonanzlinien der  $^{13}\text{C}$ -Spektren zu den Kernen von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL**

Eine genaue Zuordnung der Signale im Bereich von 127,51-130,46 ppm (NMR-Signale 8, 9, 11, 12, 14, 15) konnte auch durch die verschiedenen Kopplungsexperimente (C,H-COSY, HSQC und HMBC) aufgrund der minimalen Abweichungen voneinander und der vielen Multipletts im  $^1\text{H}$ -NMR nicht erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und APT-Spektren sowohl die Bildung des Iodaldehyds sowie die Umsetzung der Arachidonsäure zum erwarteten AA- $\delta$ -Iodlacton hinreichend belegt werden konnte. Zur zusätzlichen Bestätigung der gebildeten Strukturen wurden außerdem die im nächsten Abschnitt (siehe 4.4.1.2) beschriebenen Massenspektren herangezogen.

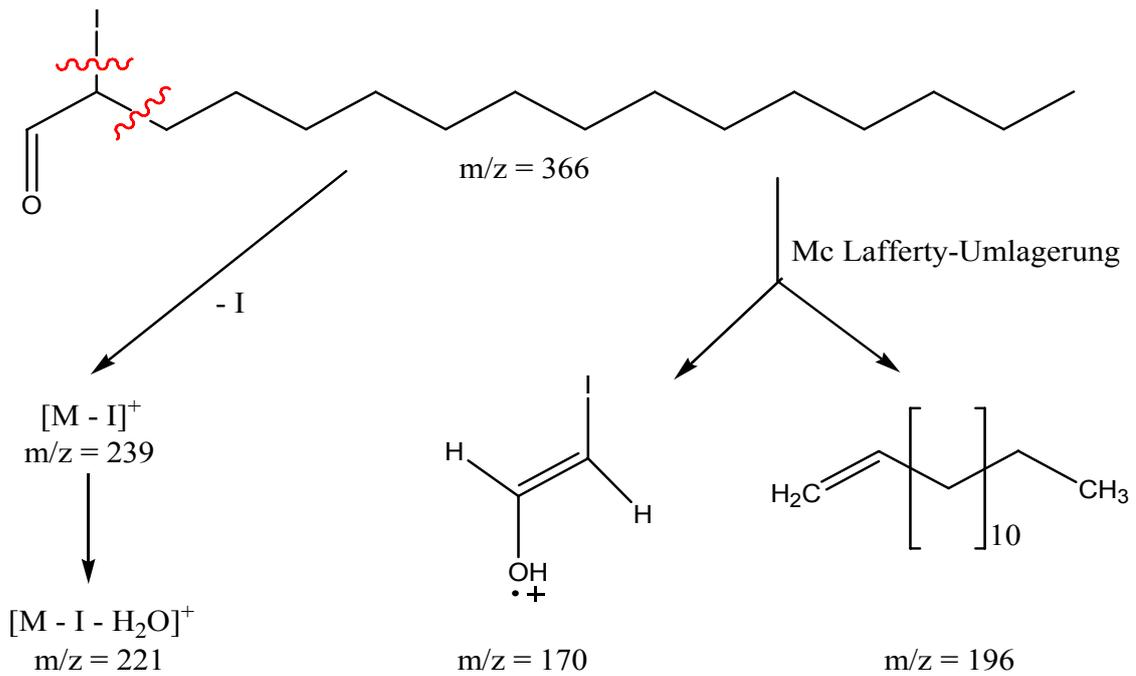
#### 4.1.2 Massenspektren

Eine massenspektrometrische Analyse kann, wie auch die NMR-Spektrometrie, zur Identifizierung eines Stoffes herangezogen werden. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich bei gleichen Bedingungen (z.B. Beschleunigungsspannung der Elektronen bei Elektronenstoßionisation) für eine Verbindung charakteristische Massenfragmente bilden. Anhand dieses Fragmentierungsmusters können nun Aussagen bezüglich der Struktur der Substanz getroffen werden. Die nachfolgenden Abbildungen (vgl. Abb. 31 und Abb. 32) zeigen das aufgenommene Massenspektrum, sowie mögliche Fragmentierungsreaktionen von 2-IHDA, als Vertreter der Iodaldehyde (Massenspektrum 2-IODA siehe Anhang Abb-A 1).



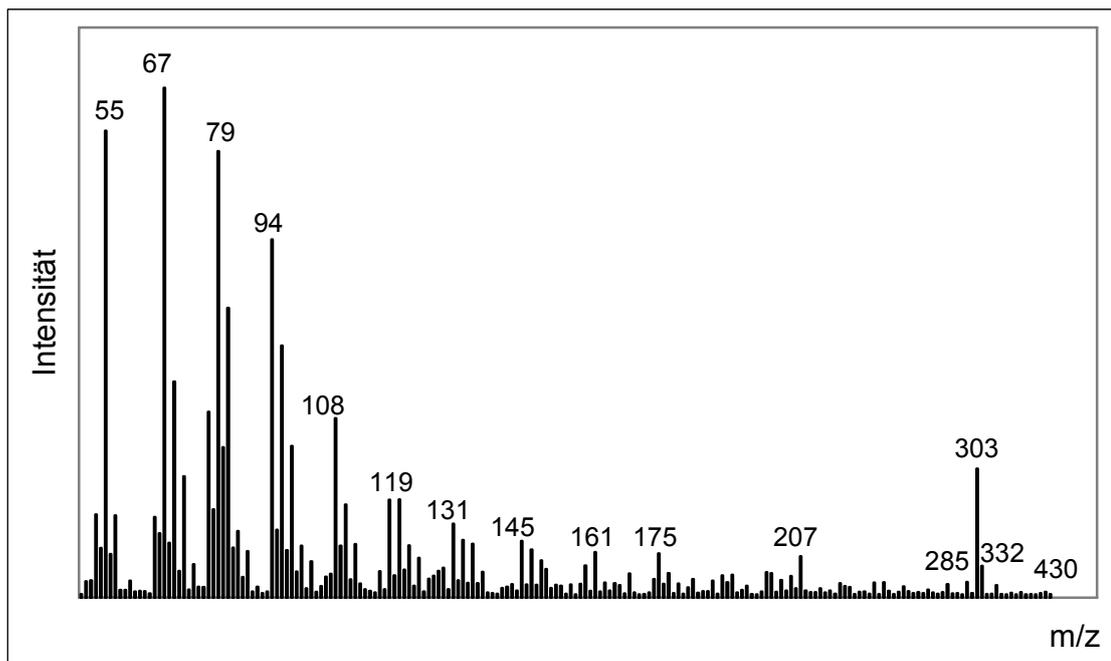
**Abb. 31: Massenspektrum 2-IHDA (EI, 70 eV)**

Wie bei einer Vielzahl von Massenspektren, die bei 70 eV aufgenommen wurden, zeigt sich auch für 2-IHDA nur eine geringe Intensität für das Molekülion (M) bei  $m/z = 366$ . Nicht selten können die Molekülionen unter diesen Bedingungen auch ganz fehlen, da die übertragene Energie der Elektronen zu einer vollständigen Fragmentierung des Moleküls führt. Ein charakteristisches Massenfragment für 2-Iodhexadecanal repräsentiert  $m/z = 239$ , welches aus der Abspaltung des Iods vom Mutterion resultiert. Durch eine Wasserabspaltung aus diesem Fragmention lässt sich die Bildung von  $m/z = 221$  erklären. Des Weiteren stellt eine McLafferty-Umlagerung eine mögliche Begründung für die Fragmente  $m/z = 172$  und  $m/z = 196$  dar. Durch Protonenshift vom  $\gamma$ -C-Atom zum Sauerstoffatom in einem sechsgliedrigen Übergangszustand erfolgt eine Verschiebung der Doppelbindung und ein Bindungsbruch, in deren Ergebnis ein geladenes Teilchen und ein Neutralteilchen entstehen (vgl. Abb. 32).



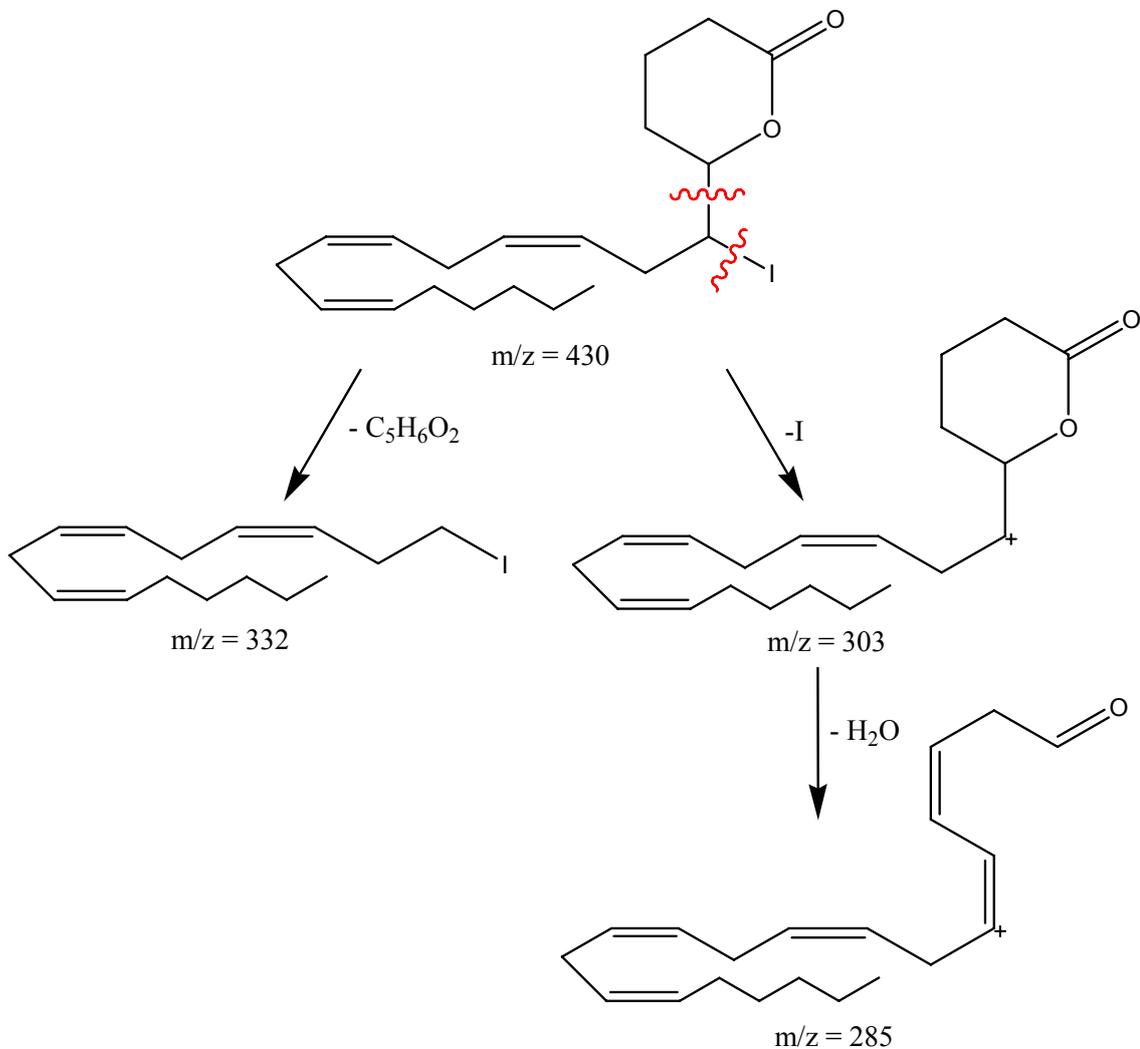
**Abb. 32: Fragmentierungsreaktionen von 2-IHDA**

Neben den oben beschriebenen charakteristischen Massenfragmenten zeigt das Massenspektrum von 2-IHDA außerdem das typische Fragmentierungsmuster von langkettigen Aliphaten. Hierbei wird schrittweise jeweils ein C-Atom mit entsprechender Protonenzahl abgespalten. Dieses Verhalten kann auch beim  $\delta$ -Iodlacton der Arachidonsäure beobachtet werden, wobei hier ein variierender Massenverlust durch die im Molekül enthaltenen Doppelbindungen auftritt (siehe Abb. 33).



**Abb. 33: Massenspektrum AA- $\delta$ -IL (EI, 70 eV)**

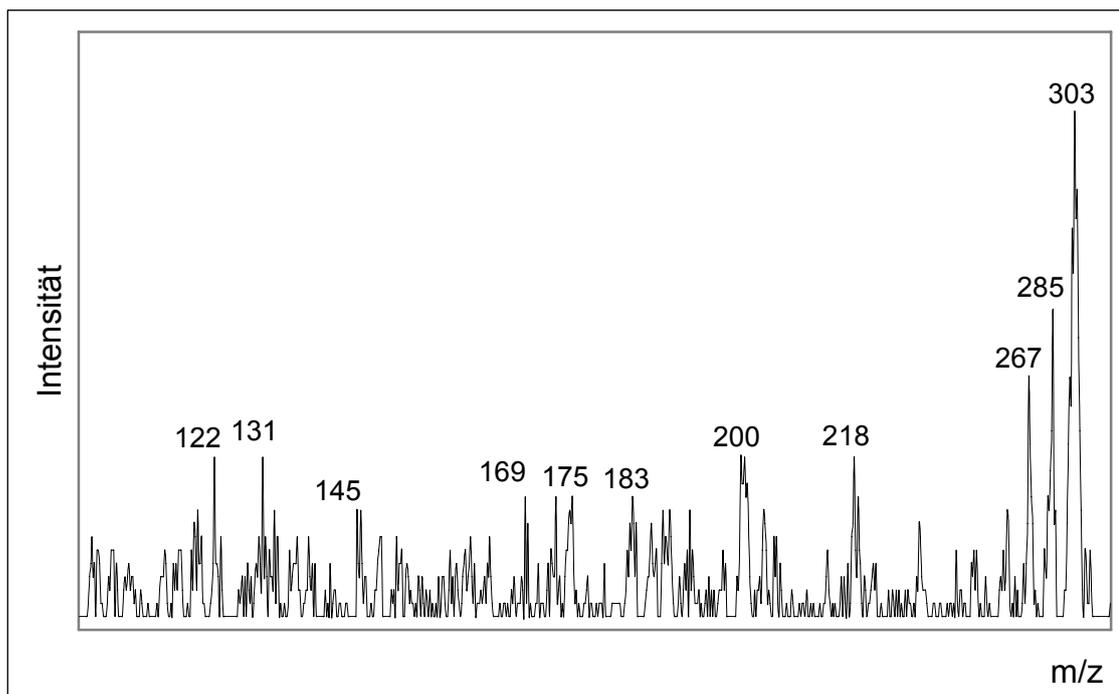
Bereits bei den Iodaldehyden konnte beobachtet werden, dass zunächst Iod vom Mutterion abgespalten wird. Daraus ergibt sich ein Masseverlust von  $m/z = 127$ . Dies führt dazu, dass das Fragment mit  $m/z = 303$  im Massenspektrum von AA- $\delta$ -IL eines der aussagekräftigsten Ionen repräsentiert. Eine mögliche Ursache für dieses Fragmentierungsverhalten stellt die geringe Dissoziationsenergie der C-I-Bindung ( $\Delta H^0 = 210$  kJ/mol bzw. 2,18 eV) dar. Durch Eliminierung von Wasser aus dem gebildeten Fragment ergibt sich das Fragment mit  $m/z = 285$ . Eine mögliche Struktur ist in Abb. 34 dargestellt. Neben der Abspaltung des Iods, kann es des Weiteren zum Bindungsbruch der C-C-Bindung an C5 und C6 kommen, so dass der Lactonring abgetrennt wird und man das Fragment mit  $m/z = 332$  erhält (Massenspektren DHA- $\gamma$ -IL und EPA- $\delta$ -IL siehe Anhang Abb-A 2 und Abb-A 3).



**Abb. 34:** Fragmentierungsreaktionen von AA- $\delta$ -IL

Die charakteristischen Fragmente  $m/z = 303$  und  $m/z = 285$  werden ebenfalls bei der Elektrospray-Ionisation sichtbar. Ausgehend vom Ammoniumaddukt des AA- $\delta$ -IL

( $[\text{NH}_4\text{M}]^+$ ) mit  $m/z = 448$ , wurde ein Produktscan mittels LC-MS/MS durchgeführt. Dabei wurde im Q1 die Masse des Ammoniumadduktes zunächst separiert, anschließend in Q2 erneut fragmentiert und im Q3 in einem definierten Massenbereich gescannt. Im Gegensatz zur Elektronenstoßionisation wird hierbei ein fragmentäreres Massenspektrum generiert, in dem das typische Fragmentierungsverhalten von langkettigen Aliphaten allerdings nicht zu erkennen ist (vgl. Abb. 35).



**Abb. 35: Produktscan des Ammoniumadduktes von AA- $\delta$ -IL (ESI-MS)**

Schlussfolgernd aus den hier dargestellten Ergebnissen, konnte die Struktur der Iodaldehyde und der Iodlactone hinreichend belegt werden. Die charakteristischen Massenfragmente wurden für die quantitative Bestimmung mittels GC-MS (SIM) und LC-MS/MS (MRM) in die entsprechenden Methoden eingearbeitet und ermöglichten eine substanzspezifische Bestimmung der Analytgehalte in den biologischen Proben.

#### 4.1.3 Schmelzpunkte

Durch die Literatur sind Schmelzpunkte für die Aldehyde HDA, ODA und 2-IODA bekannt, allerdings wurde für 2-IHDA kein Schmelzpunkt angegeben [82]. Nach Angaben von Van den Bergen et al. erhält man bei der Synthese dieses Stoffes ein gelbes Öl. Im Laufe dieser Arbeit konnte nach Optimierung der Synthese allerdings ein weißer bis leicht gelblicher Feststoff erhalten werden, bei dem, wie in der unten dargestellten Tab. 23, ein Schmelzpunkt bestimmt werden konnte.

**Tab. 23: Ermittelte Schmelzpunkte der synthetisierten Chargen**

Verbindung	Literaturwert Schmelzpunkt [°C]	Ermittelter Schmelzpunkt [°C]
HDA	30-31	31
2-IHDA	-	37
ODA	41-42	42
2-IODA	42-44	43

Die aufgeführten Schmelzpunkte wurden mit Hilfe eines Heitzischmikroskops ermittelt und stimmten mit den Literaturwerten weitestgehend überein. Aufgrund des Schmelzpunktes konnte damit eine schnelle Überprüfung der Umsetzung bzw. des Syntheseproduktes erfolgen.

Eine Schmelzpunktbestimmung für die Iodlactone wurde nicht durchgeführt, da diese, wie in der Literatur beschrieben ausschließlich als gelbliche Öle erhalten wurden [23].

## 4.2 Methodenoptimierung

### 4.2.1 Syntheseeoptimierung

Für die Iodaldehyde wurden die Optimierungen am Beispiel von 2-IHDA durchgeführt und anschließend auf 2-IODA übertragen. Die Methodenentwicklung für die Iodlactone bezieht sich weitestgehend auf die Synthese des  $\delta$ -Iodlactons der Arachidonsäure. Zudem wurde für DHA- $\gamma$ -IL und EPA- $\delta$ -IL eine alternative Synthese getestet.

Die für die Iodaldehyde beschriebene Synthese nach Pereira et al. (vgl. Abschnitt 3.4.2.1) liefert nach der ersten Synthesestufe kein Produkt, so dass die Darstellung von 2-IHDA und 2-IODA im weiteren Verlauf anhand einer veränderten Methode nach H. Van den Bergen et al. durchgeführt wurde. Ausgehend von der Originalmethode (vgl. Absätze 3.4.1.1 und 3.4.2.2) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Modifizierung und Optimierung ausgewählter Methodenparameter.

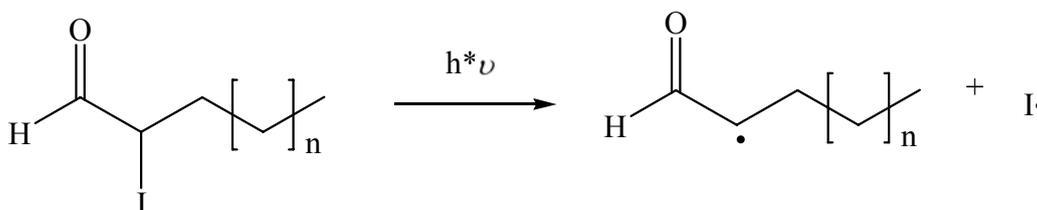
Die enzymatische Synthese der Iodlactone gestaltet sich vorwiegend nach der Vorschrift von Boeynaems et al., wohingegen die nicht-enzymatische Darstellung sich an Kuklev und Smith orientierte. Eine Optimierung fand dabei nur bezüglich der äußeren Bedingung statt.

#### 4.2.1.1 Allgemeine Optimierungsversuche

Die Synthese von 2-IHDA wurde zunächst anhand der Literaturmethode durchgeführt [82]. Es ergab sich dabei das Problem, dass beim Abrotieren des Dichlormethans sich

die ehemals farblose bis schwach-gelbliche Lösung in einen braun-violetten Rückstand umwandelte. Anhand der Farbe wurde auf die Anwesenheit von elementarem Iod und einen Zerfall des Produktes geschlossen.

Die Tatsache, dass sich elementares Iod bildete, ließ auf einen homolytischen Zerfall über einen radikalischen Mechanismus schließen. Als eine mögliche Ursache wurde polychromatisches Licht (z.B. Tageslicht) vermutet (vgl. Abb. 36).



**Abb. 36: Homolytische Zerfallsreaktion der Iodaldehyde**

Aufgrund der Größe des Iods (Atomradius: 133 ppm) besteht zwischen Iod und dem C-Atom eine relativ schwache Bindung (Bindungsenergie: 210 kJ/mol), so dass Iod leicht wieder abgespalten werden kann.

Einen ersten Lösungsansatz dieses Problems stellte die einfache Abdunklung des Kolbens mit Aluminiumfolie dar. Dies brachte in jener Hinsicht einen Erfolg, dass sich nach der Synthese nur noch eine leichte Braunfärbung des Öls zeigte. Es konnte somit eine mögliche Quelle für den Zerfall der Produkte ermittelt werden. Als Schutz vor Abbaureaktionen durch Licht wurden nachfolgende Arbeiten, sowohl für die Iodaldehyde als auch für die Iodlactone, in einer Dunkelkammer unter Rotlicht durchgeführt.

Wie in der Literatur [82] beschrieben, wurde 2-IHDA als Öl erhalten. Dieses war jedoch noch gelblich bis leicht bräunlich gefärbt, so dass weitere Versuche unternommen wurden, das erhaltene Produkt weiter aufzureinigen und eine temporäre Stabilität zu gewährleisten. Um auszuschließen, dass es zu einer Zerstörung in Abhängigkeit des Drucks kommt, wurde das Abrotieren des Dichlormethans durch ein Abblasen des Lösungsmittels im Argonstrom ersetzt. Das so erhaltene Produkt war ein intensiv gefärbtes gelbes Pulver, welches bei weiterer Trocknung sich von gelb nach braun verfärbte. Da die Arbeiten unter Rotlicht durchgeführt wurden, konnte ein Zerfall induziert durch Licht bereits ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursachen für die Iodabspaltung wurden hierbei der Einfluss von Sauerstoff oder Temperatur vermutet. Im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen (siehe Abschnitt 4.4.2.4) wurde deshalb die Haltbarkeit der Verbindungen in Abhängigkeit von den verschiedenen Parametern (Licht, Temperatur, Sauerstoffeintrag) untersucht.

Für die Synthese der Iodaldehyde stellte sich schlussendlich eine Kombination von Abrotieren und Abblasen unter Argon als optimal dar. Nach der Reduktion des Lösemittels durch den Rotationsverdampfer (28 °C, 400 mbar) um circa die Hälfte und nachgeschalteter Trocknung des Produktes unter einem leichten Argonstrom, konnte ein weißes bis leicht gelbliches Pulver erhalten werden. Die Kristalle wurden anhand von Schmelzpunkten, NMR und MS als die entsprechenden iodierten Aldehyde identifiziert (vgl. Abschnitt 4.1).

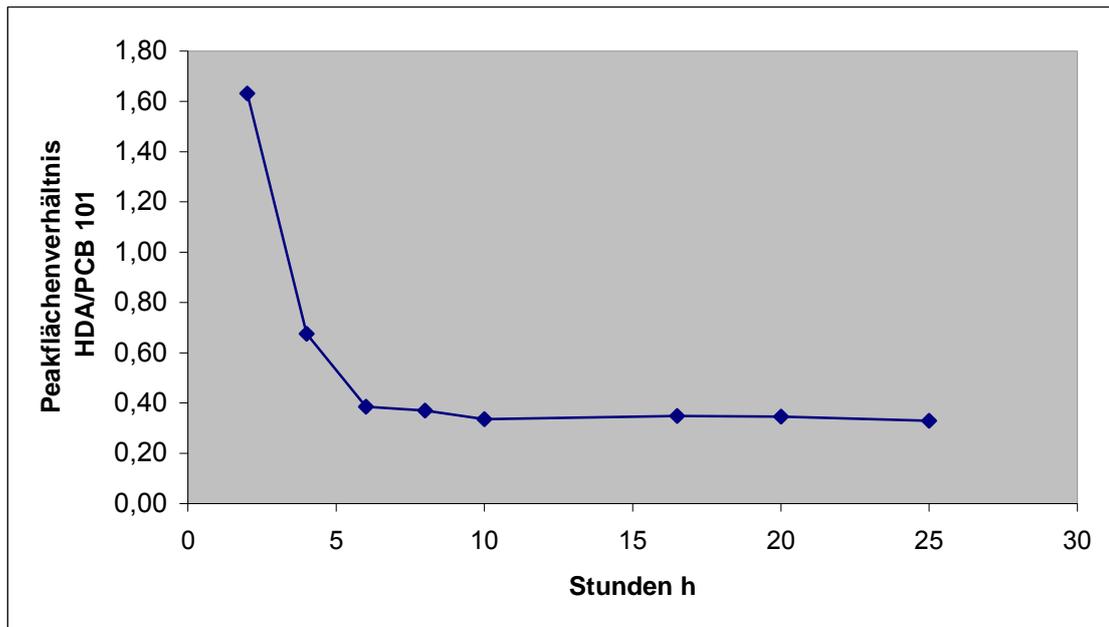
Bei den Iodlactonen wurden sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Synthesversuche unternommen. Im Vergleich dieser beiden Darstellungen wurde festgestellt, dass die enzymatische Herstellung aufgrund des benötigten Enzyms zwar kostenintensiver ist, aber auch mit wesentlich weniger Nebenprodukten durchgeführt werden konnte. Während bei Einsatz der Lactoperoxidase die Position am sechsten C-Atom für die  $\delta$ -Iodlactone bzw. am fünften C-Atom für das  $\gamma$ -Iodlacton iodiert wurde, traten bei der Synthese nach Kuklev und Smith verschiedene Nebenprodukte auf. Hierbei wurden vermutlich aufgrund der im Molekül vertretenen Doppelbindungen mehrere Stellen gleichzeitig iodiert. Bei Arachidonsäure als Ausgangssubstanz kommt es neben der Iodierung der Position 6, welche aufgrund von partiell positiven Ladungen im Molekül bevorzugt ist, zu einer Anlagerung von Iod an die Positionen 14 und 15 unter Ausbildung von weiteren Iodlactonen [23].

Bei der alternativen Darstellung der Iodlactone von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure aus Fischöl konnte in keiner der gewonnenen Fraktionen Produkt nachgewiesen werden, so dass diese Methode keine weitere Anwendung bei der Gewinnung von Standardsubstanzen gefunden hat.

Nachfolgende Optimierungen, wie zum Beispiel Synthesezeit und eingesetzte Iodmenge, beziehen sich auf die Synthese der Iodaldehyde 2-IHDA und 2-IODA und sind am Beispiel von 2-IHDA in den nachstehenden Abschnitten dargestellt.

#### 4.2.1.2 Abhängigkeit von der Synthesezeit

Nach Angaben von H. Van den Bergen beträgt die benötigte Reaktionszeit bei der Umsetzung von HDA zu 2-IHDA bzw. ODA zu 2-IODA zwei Stunden. Um die Produktausbeute weiter zu steigern, wurde untersucht, ob eine Verlängerung der Synthesezeit einen positiven Effekt zeigt. Zu diesem Zweck wurde die Reaktion für 2 bis 25 Stunden angesetzt (Messwerte vgl. Tab-A 6).



**Abb. 37: Peakflächenverhältnis von HDA/PCB 101 in Abhängigkeit von der Synthesezeit**

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es zu Abbaureaktionen der Produkte bei der Probenvorbereitung und der Messung mittels GC-MS kommt, wurde die Steigerung der Ausbeute von 2-IHDA über nicht umgesetztes HDA ausgedrückt. In Abb. 37 ist das Peakflächenverhältnis (PFV) von HDA zum internen Standard PCB 101 gegen die Synthesezeit aufgetragen. Die Konzentration des Reaktionsgemisches betrug etwa  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ( $c[\text{HDA} + 2\text{-IHDA}]$ ) und die des internen Standards  $57,1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ .

Ein Vergleich der Peakflächen ist nur dann möglich, wenn die Einwaagen des Synthesegemisches exakt  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  betragen. Dies konnte allerdings nicht in allen Fällen gewährleistet werden, so dass die Peakflächen von HDA auf jene extrapoliert wurden, die einer Konzentration von  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  entsprachen.

Ein kleineres Peakflächenverhältnis HDA/PCB 101 bedeutet eine geringere Konzentration von HDA im Synthesegemisch. Bezogen auf die nachfolgende Formel bedeutet dies, dass mit geringerer Konzentration von HDA die Konzentration von 2-IHDA im Gemisch steigt:

$$c[\text{HDA} + 2\text{-IHDA}] = c(\text{HDA}) + c(2\text{-IHDA})$$

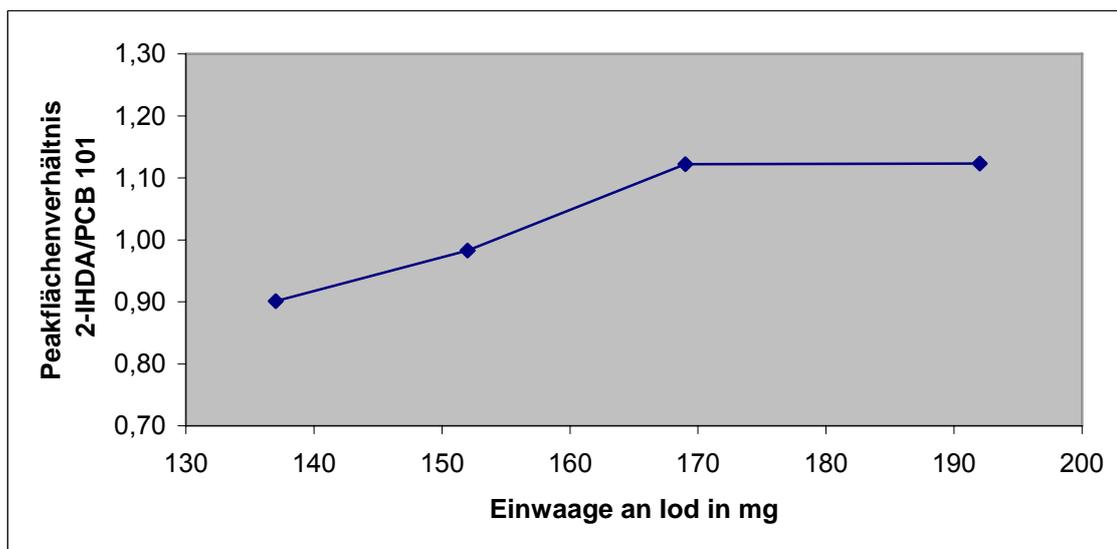
Wie Abb. 37 zeigt, konnte die Ausbeute von 2-IHDA durch eine Verlängerung der Synthesezeit erheblich gesteigert werden. Bereits bei einer Verdopplung der Reaktionszeit, kam es zu einer Verkleinerung des PFVs HDA/PCB 101 um den Faktor 2,5.

Im weiteren Verlauf der Arbeit betrug die Synthesezeit 25 Stunden, um bei gegebenen Voraussetzungen eine optimale Ausbeute zu gewährleisten.

#### 4.2.1.3 Abhängigkeit von der eingesetzten Iod- und Quecksilber-II-Chlorid-Menge

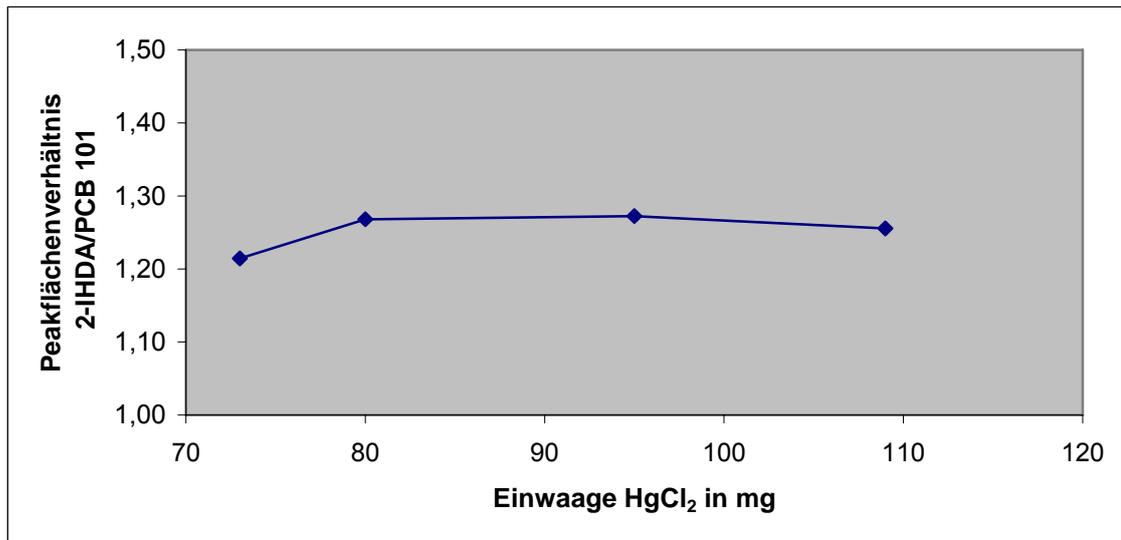
Zunächst wurde der Einfluss einer Steigerung der Iodmenge auf die Umsatzrate von 2-IHDA untersucht. Bei der von H. Van den Bergen beschriebenen Methode wird ein äquivalentes Molverhältnis von HDA und Iod (je 0,54 mmol) beschrieben. An dieser Stelle sollte nun ermittelt werden, ob ein vermehrter Zusatz von Iod sich positiv auf die Bildung von 2-IHDA auswirkt. Die eingesetzten Iodmengen betragen bei diesem Versuch 137 mg (0,54 mmol), 152 mg (0,6 mmol), 168 mg (0,66 mmol) und 192 mg (0,76 mmol).

In Abb. 38 ist das PFV 2-IHDA/PCB 101 gegen die entsprechende Iodmenge aufgetragen. Eine Erhöhung des Peakflächenverhältnisse bedeutet dabei eine gesteigerte Umsetzung von HDA zu 2-IHDA. Bei diesen Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass die optimale Reaktionsausbeute bei einer Iodmenge von 168 mg erzielt wird. Dies entspricht einem Überschuss von 0,12 mmol Iod.



**Abb. 38: Peakflächenverhältnis 2-IHDA/PCB 101 in Abhängigkeit von der eingesetzten Iodmenge**

Daneben wurde der Einfluss der  $\text{HgCl}_2$ -Menge auf die Umsatzrate geprüft. Laut Literatur wird auf 130 mg (0,54 mmol) HDA eine entsprechende Menge an  $\text{HgCl}_2$  (73 mg; 0,27 mmol) eingewogen. Zur Untersuchung des Einflusses wurden Reaktionsansätze mit 73 mg, 80 mg (0,3 mmol), 96 mg (0,36 mmol) und 110 mg (0,41 mmol)  $\text{HgCl}_2$  durchgeführt.



**Abb. 39: Peakflächenverhältnis von 2-IHDA/PCB 101 in Abhängigkeit von der HgCl<sub>2</sub>-Menge**

Wie Abb. 39 verdeutlicht, wurde durch eine Anhebung der HgCl<sub>2</sub>- Menge um 0,02 mol (entspricht einer Einwaage von 80 mg) die Ausbeute an 2-IHDA erhöht. Bei einer weiteren Steigerung der Zusatzmenge wurde dieser Effekt jedoch nicht verstärkt.

In beiden Fällen (Abhängigkeit von zugesetzter Iodmenge und Quecksilber-II-chlorid-Menge) wurden die Peakflächen mittels GC-ECD ermittelt, da dieser sich besonders für die Bestimmung iodierter Verbindungen eignet (Messwerte vgl. Tab-A 7 und Tab-A 8).

Die Konzentration des Synthesegemisches betrug ca. 2 ng/μL und die des internen Standards 1,01 ng/μL. Für die Auftragung der PFV von 2-IHDA/PCB 101 gegen die Einwaagen von Iod bzw. Quecksilber-II-chlorid wurden die Peakflächen von 2-IHDA auf eine Konzentration von 2 ng/μL extrapoliert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden 168 mg I<sub>2</sub> und 80 mg HgCl<sub>2</sub> auf 130 mg HDA eingewogen. Dementsprechend wurden für 150 mg ODA 82 mg HgCl<sub>2</sub> und 170 mg I<sub>2</sub> verwendet.

#### 4.2.2 Optimierung der GC-Analytik

##### 4.2.2.1 Optimierung der Injektortemperatur

Um eine Diskriminierung bzw. eine Anreicherung der Analyte während der chromatographischen Trennung auszuschließen oder zu minimieren, ist es notwendig die Parameter des chromatographischen Systems zu optimieren. Durch eine zu niedrig gewählte Injektortemperatur kann es zu einer Anreicherung des Analyten im Glasliner kommen, die sich mitunter durch eine verringerte Intensität der Signale innerhalb der jeweiligen

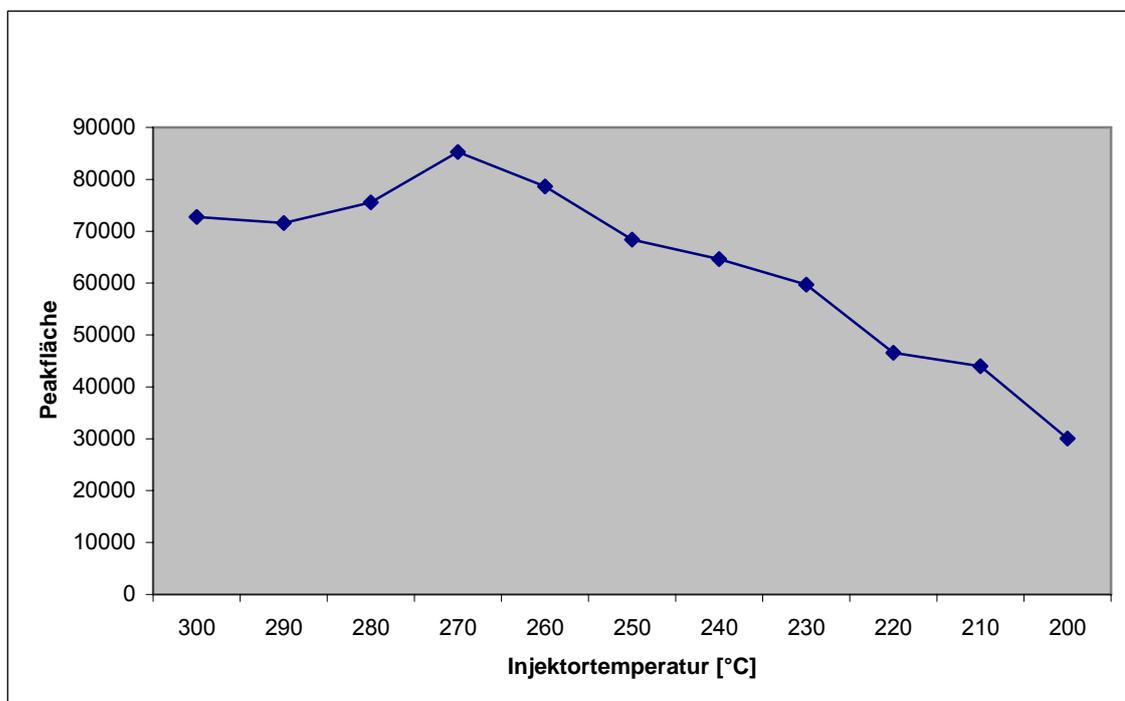
Messung oder durch so genannte Memory-Effekte in den folgenden Messungen äußern kann. Zu ersten Zersetzungsreaktionen im Einlasssystem kann es hingegen kommen, wenn die Injektortemperatur zu hoch gewählt wird [61]. Besonders bei weniger stabilen Verbindungen spielt dieser Parameter eine tragende Rolle.

Das Ziel dieser Untersuchungen sollte die Festlegung der optimalen Injektortemperatur für die zu untersuchenden Analyte sein, um somit eine Verfälschung der Analysenergebnisse zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden anhand der Standardsubstanzen Messungen an einem GC-MS-System mit bei unterschiedlichen Injektortemperaturen (split/splitlos Injektion) im *Selected Ion Monitoring* (SIM) durchgeführt.

Für das Iodlacton der Arachidonsäure (AA- $\delta$ -IL) wurde die Injektortemperatur in einem Bereich von 200 °C bis 300 °C und für 2-Iodhexadecanal (2-IHDA) in einem Bereich von 180 °C bis 300 °C (in jeweils 10 °C-Abständen) variiert.

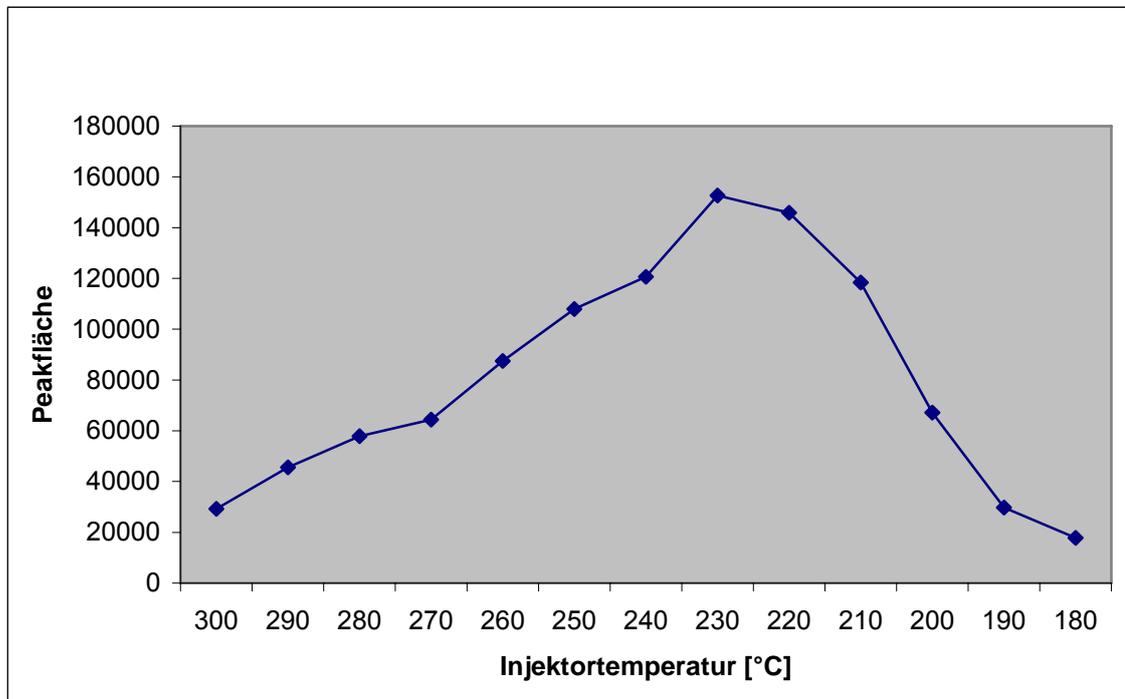
Für diese Messungen (SIM) wurde als Quantifizierung für AA- $\delta$ -IL 303 m/z und für 2-IHDA 170 m/z festgelegt.

Es wurde bei den höheren Injektortemperaturen begonnen, um eine Anreicherung der Analyte durch eine nicht vollständige Verdampfung der Substanzen im Systemeinlass zu verhindern. Wie die Abb. 40 zeigt, wurde für AA- $\delta$ -IL die maximale Signalintensität bei einer Injektortemperatur von 270 °C ermittelt (Messwerte vgl. Tab-A 9).



**Abb. 40:** Einfluss der Injektortemperatur auf die Intensität der Peakflächen von AA- $\delta$ -IL

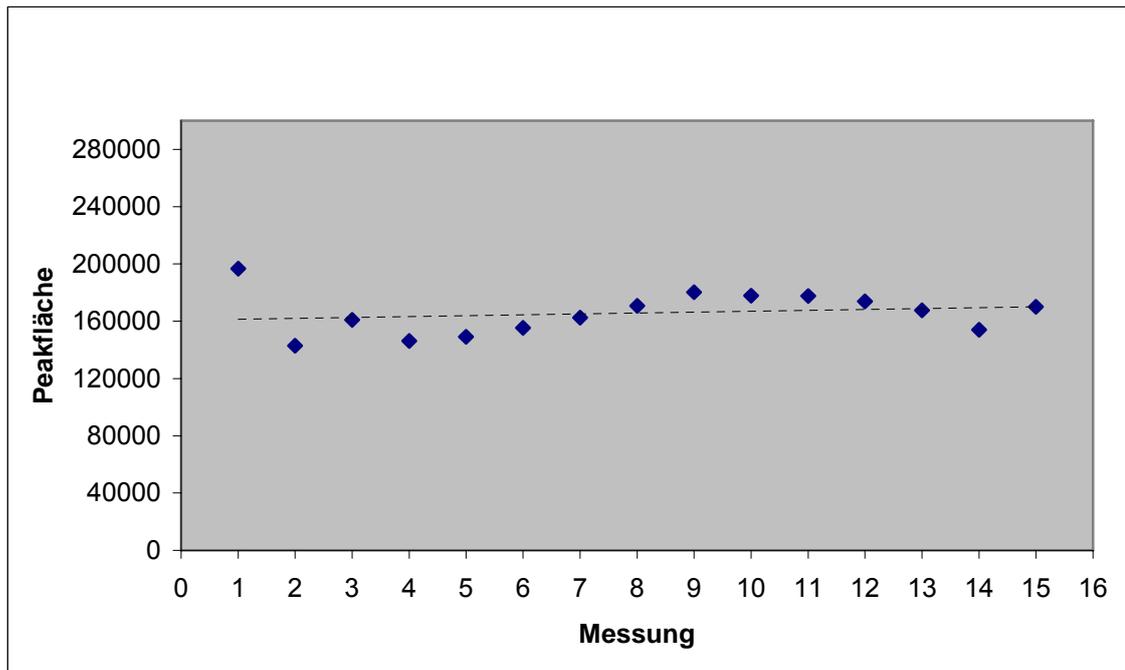
Dem entsprechend wurden die Untersuchungen für 2-IHDA durchgeführt, deren Ergebnisse Abb. 41 aufzeigt. Hierbei wurde für die Signalintensität ein Maximalwert bei 230 °C Injektortemperatur festgestellt (Messwerte siehe Anhang Tab-A 9).



**Abb. 41: Einfluss der Injektortemperatur auf die Intensität der Peakflächen von 2-IHDA**

Um die gewonnen Ergebnisse abzusichern, wurde bei den ermittelten idealen Injektortemperaturen eine Wiederholbarkeitsanalyse (mindestens 10 Messungen) durchgeführt. Dies soll an dieser Stelle am Beispiel von 2-IHDA gezeigt werden.

Bei den Analysen mit optimierter Injektortemperatur wurde nur eine minimale Anreicherung der Substanzen festgestellt, wie die Abb. 42 anhand von 2-IHDA belegt. Die dazugehörigen Messwerte sind im Anhang Tab-A 10 dargestellt.



**Abb. 42: Wiederholbarkeit von 2-IHDA (Injektortemperatur 230 °C)**

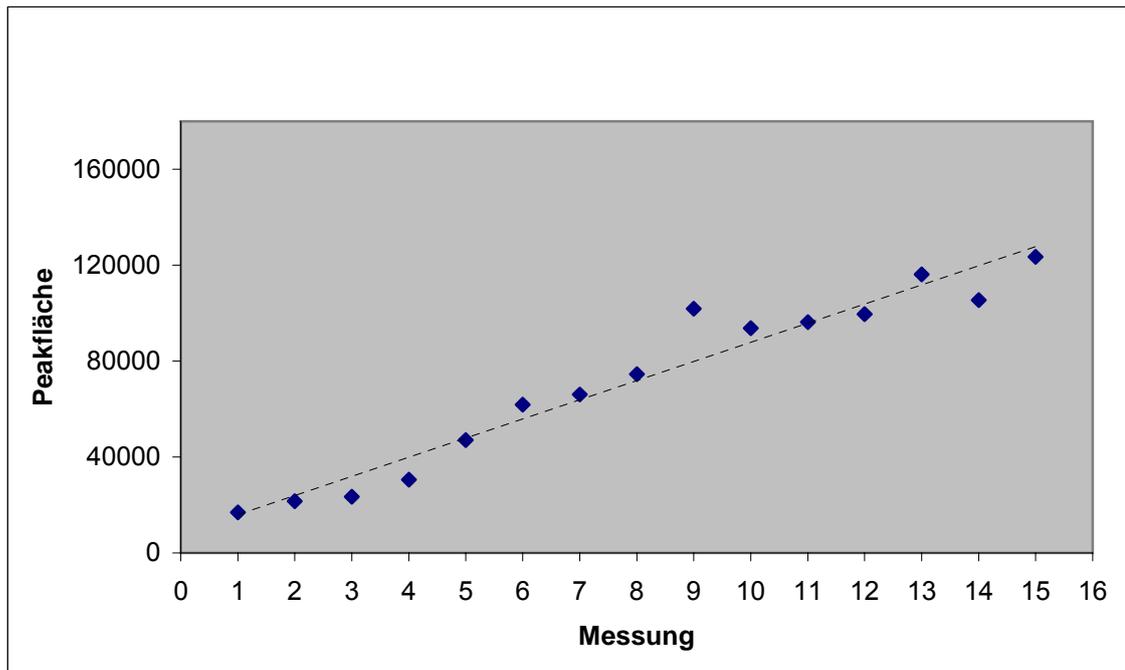
Der geringe Trend, der dabei erkennbar ist, kann durch Schwankungen der Geräteintensität bzw. durch ein Verdampfen von Lösemittel verursacht worden sein.

Die erste Messung wurde aufgrund des Ausreißertestes nach Nalimov gemäß der Formel:

$$PW = \frac{|x^* - \tilde{x}|}{s_x} \sqrt{\frac{N}{N-1}}$$

verworfen, da der errechnete Prüfwert (PW) den kritischen Wert von 1,923 (P 95 %) übersteigt und somit als Ausreißer gewertet wird. Eine mögliche Ursache ist eine Verschmutzung des verwendeten Analysengerätes durch vorherige Messungen.

Als Gegenprobe wurde die entsprechende Untersuchung mit einer niedrigeren Injektortemperatur durchgeführt. In Abb. 43 ist erkennbar, dass es zu einer deutlichen Anreicherung des Analyten während der durchgeführten Messungen kommt, welche nicht allein durch ein Verdunsten des Lösemittels erklärt werden kann. Viel mehr ist daraus zu schließen, dass sich die Substanz durch nicht vollständiges Verdampfen im Einlasssystem anreichert und mit den darauf folgenden Messungen herausgelöst wird. Dies äußert sich durch einen Anstieg der detektierten Peakflächen und eine verminderte Intensität des Detektorsignals gegenüber den Messungen bei optimaler Injektortemperatur (vgl. Tab-A 10).



**Abb. 43: Wiederholbarkeit von 2-IHDA (Injektortemperatur 200 °C)**

Die Trendtest-Analyse nach Neumann mit der Formel:

$$Q = \frac{1}{(n-1)s^2} \sum_{i=1}^{n-1} (x_i - x_{i+1})$$

ergab für beide Durchführungen einen Q-Wert kleiner als der Tabellenwert, so dass von einem Trend gesprochen werden kann [85]. Bei der Analyse mit optimierter Injektortemperatur ist die Abweichung vom Tabellenwert kleiner als bei der Analyse mit einer zu gering gewählten Temperatur (siehe Tab. 24).

**Tab. 24: Ermittelte Q-Werte und Tabellenwerte für Trendtest nach Neumann**

Injektortemperatur	ermittelter Q-Wert	Tabellenwert
230 °C	0,646	1,1816
200 °C	0,117	1,2053

Die Schwankungen innerhalb der Messreihen können durch eine variierende Empfindlichkeit des Messgerätes erklärt werden. Um diese auszugleichen wird in den folgenden Bestimmungen ein interner Standard verwendet.

Da ein Ziel dieser Arbeit darin bestand eine Nachweismethode für beide Substanzklassen zu entwickeln und sich diese durch ihre benötigte Injektortemperatur unterscheiden, wurde versucht den Einfluss dieses Parameters dahingehend zu vermeiden, dass eine

direkte Probenaufgabe auf die Analysensäule (*on-column*) stattfand. Dabei konnten durch Modifikation des Temperaturprogramms des GC-Ofens (zusätzlicher Heizschritt) mit einer Methode sowohl die Iodaldehyde als auch die Iodlactone nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen lagen für die Iodaldehyde ca. 70 % niedriger verglichen mit der endgültig verwendeten Methode (vgl. Tab. 25). Andere Ansprüche an die Analytik, wie zum Beispiel eine gute Reproduzierbarkeit konnten nicht gewährleistet werden, so dass die hier aufgezeigte Möglichkeit eines gleichzeitigen Nachweises (unter der Bedingung der Handinjektion) nicht weiter verwendet wurde.

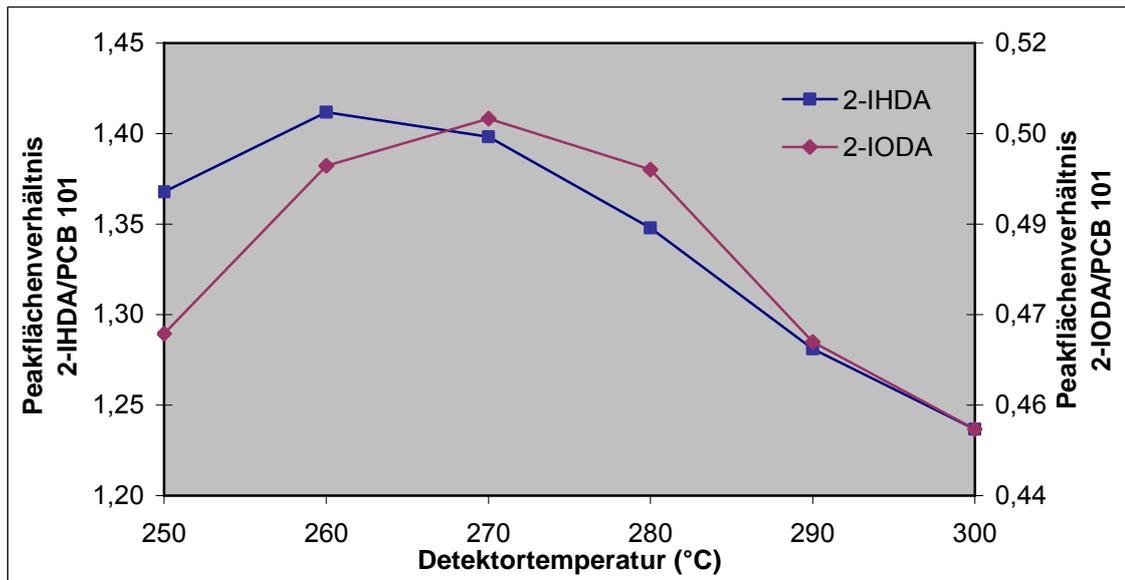
**Tab. 25: Nachweis- und Erfassungsgrenze am GC/ECD mit on-column-Injektion**

Substanz	Nachweisgrenze [pg/µl]	Erfassungsgrenze [pg/µl]
2-IHDA	29,5 +/- 15,5	59,0 +/- 31,0
2-IODA	46,9 +/- 16,3	93,8 +/- 32,6

#### 4.2.2.2 Optimierung der Detektortemperatur bei der GC-ECD-Messung

Neben der Injektortemperatur hat bei GC-ECD-Messungen auch die Detektortemperatur einen Einfluss auf das Nachweisvermögen der Iodlipide. Bei der Optimierung der Injektortemperatur zeigte sich, dass die Iodaldehyde die thermolabileren Substanzen sind und damit den limitierenden Faktor für den Nachweis mittels GC-ECD darstellen. Aus diesem Grund wurden nachfolgende Analysen an Iodaldehyden durchgeführt. Der untersuchte Temperaturbereich erstreckte sich dabei von 250 °C bis 300 °C (Messwerte siehe Tab-A 11).

In Abb. 44 sind die Peakflächenverhältnisse von 2-IHDA/PCB 101 und 2-IODA/PCB 101 gegen die Detektortemperatur aufgetragen.



**Abb. 44: Einfluss der Detektortemperatur auf das Peakflächenverhältnis von 2-IHDA/ PCB 101 und 2-IODA/ PCB 101**

Wie aus dem Diagramm zu entnehmen, liegt für das PFV von 2-IHDA/PCB 101 eine maximale Signalintensität bei einer Detektortemperatur von 260 °C vor, wohingegen die höchste Intensität für das PFV von 2-IODA/PCB 101 bei 270 °C ermittelt wurde. Da der Intensitätsverlust bei einer Temperaturerhöhung auf 270 °C für 2-IHDA/PCB 101 nicht gravierend ist, und die Substanzen mit einer Methode nachgewiesen werden sollen, wurde für nachfolgende Arbeiten eine Detektortemperatur von 270 °C gewählt.

### 4.2.3 Optimierung der Aufarbeitung

Die Aufarbeitung erfolgte, wie auch bei der Synthese, in der Dunkelkammer unter Rotlicht, da anzunehmen ist, dass sich die isolierten Analyte ähnlich wie die synthetisierten Standards unter Einfluss von polychromatischem Lichtes (z.B. Tageslicht) zersetzen.

#### 4.2.3.1 Optimierung der Aufarbeitung für die Iodaldehyde

Für die Aufarbeitung wurden zwei Versuchslinien durchgeführt. Während die native Probe lediglich mit internem Standard (PCB 101) versetzt und aufgearbeitet wurde, wurde die zweite Probe mit einem Stamm-Mix aus 2-IHDA und PCB 101 gespickt.

##### *Aufarbeitungsversuch 1 :*

Jeweils 1 g der Schilddrüse wurde mit 2,5 mL Methanol versetzt und mit dem Ultraturax (9500 U/min) zerkleinert. Anschließend wurde dieses Proben-Lösemittel-Gemisch 10 min im Ultraschallbad durchmischt. Im Anschluss wurden 2,5 mL Hexan hinzugefügt und weitere 10 min mit Ultraschall behandelt. Zur Abtrennung der festen Matrixbe-

standteile wurde das Gemisch über einen Faltenfilter filtriert. Dieser enthielt ca. 0,5 g wasserfreies Natriumsulfat, um mögliche Wasserreste aus der Lösung zu entfernen. Durch Nachspülen des Faltenfilters mit je 2 mL Hexan und Methanol sollte eine möglichst quantitative Überführung der Analyte gewährleistet werden. Das erhaltene Filtrat wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 0,5 mL eingeeengt, mit Hilfe eines Maßkolbens auf das Zielvolumen von 1 mL mit Hexan aufgefüllt und am GC-ECD vermessen.

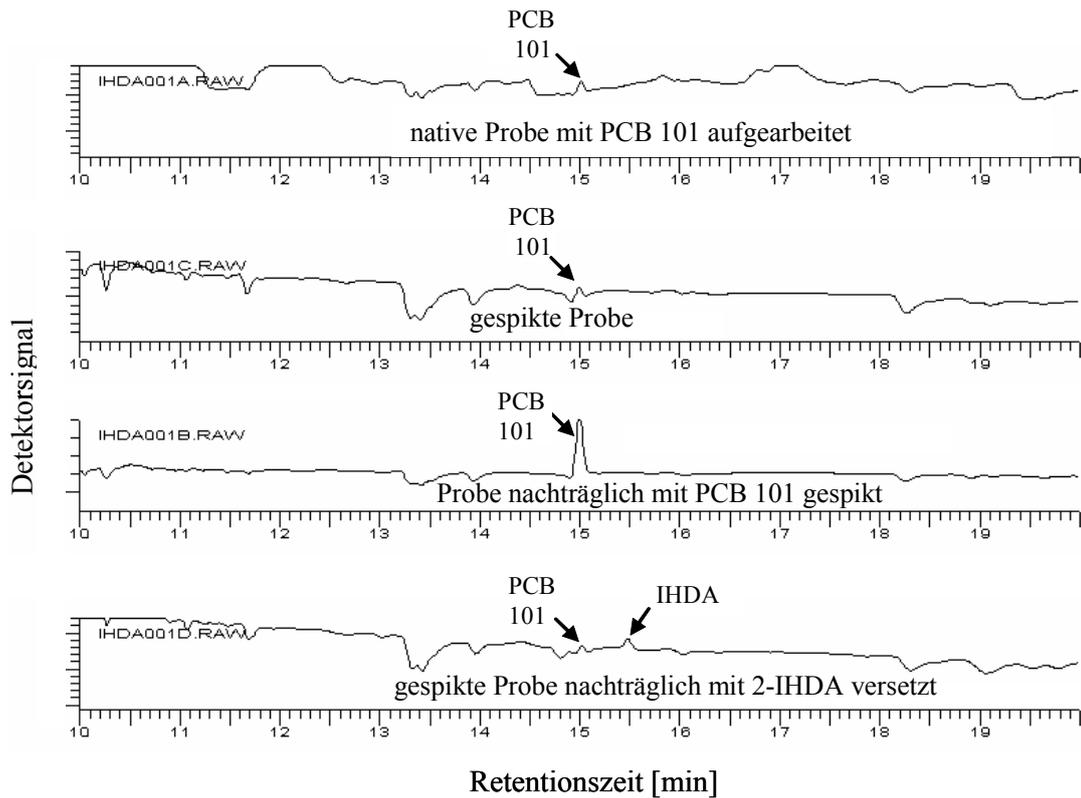
Bei dieser Aufarbeitung konnten nach der Zerkleinerung mit dem Ultraturax noch faserige Probenanteile festgestellt werden, so dass sich weitergehende Aufarbeitungen nicht nach dieser Methode empfehlen. Auch nach dem Einrotieren konnte ein Niederschlag in der Lösung festgestellt werden.

Im Ergebnis dieses Versuches konnte kein 2-IHDA in den Proben, weder in der nativen noch in der gespikten Probe, nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen sind hierbei, dass das in den Thyroidzellen eingeschlossene 2-IHDA nicht zugänglich gemacht werden konnte, da die Zerkleinerung mit Ultraturax nicht effektiv genug war oder aber, dass die Aufreinigung der Analytlösung nicht ausgereicht hat.

Alle Chromatogramme zeigten massive Matrixpeaks, die vermutlich durch mitgeführte stickstoffhaltige Verbindungen, z.B. Proteine hervorgerufen wurden, da auch für diese eine Nachweisfähigkeit des ECDs besteht.

Die Messungen mit dem ECD brachten trotz der Empfindlichkeit für Halogenverbindungen nicht das gewünschte Ergebnis. Auch der ISTD PCB 101 konnte nicht in der zu erwartenden Intensität detektiert werden.

Bei einer detaillierten Betrachtung (Abb. 45) der entsprechenden Chromatogrammabschnitte zeigten sich kleinere Analyt-Peaks, die anhand der Retentionszeit und einer Peakübereinstimmung bei nachträglicher Dotierung identifiziert wurden.



**Abb. 45: Vergrößerte Chromatogramm-Ausschnitte der aufgearbeiteten Proben**

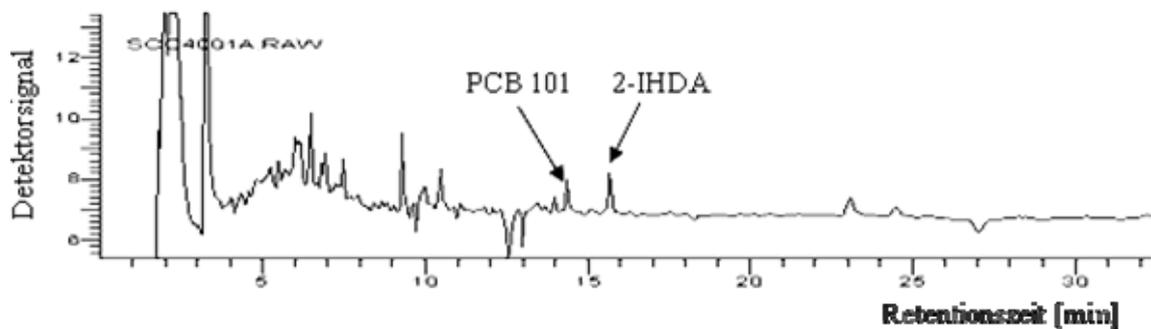
Eine mögliche Lösung des Problems ist eine andere Zerkleinerungstechnik, eine Aufreinigung über Kieselgel (vgl. Abschnitt 4.2.3.4) und zu Vergleichszwecken eine höhere Dotierung der Proben mit dem Standard 2-IHDA. Für weitere Untersuchungen wurde außerdem angedacht, die Schilddrüsen zunächst mit flüssigem Stickstoff zu behandeln, um erstens die Zellen der Schilddrüse „zu sprengen“ und darin eingeschlossenes 2-IHDA zugänglich zu machen und zweitens den Anteil an fasrigen Bestandteilen zu verringern. Des Um eine bessere Homogenität des Probenmaterials zu erzielen wurden die Proben vor der Ultraturaxbehandlung noch mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zerkleinert.

Als Fazit dieses Versuches bleibt festzuhalten, dass sich diese Aufarbeitung nicht für den Nachweis von 2-IHDA in biologischen Proben eignet.

#### *Aufarbeitungsversuch 2:*

Die hier aufgeführten Aufarbeitungsschritte wurden an je 1 g Schilddrüse durchgeführt, wobei die native Probe mit PCB 101 und die gespikte Probe mit 2-IHDA-Standard und mit PCB 101 als ISTD versetzt wurde. Durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff wurden die Proben zunächst vorbehandelt. Dabei wurde angestrebt, dass die Zellen der Thyreozyten durch den gestiegenen Zellinnendruck platzen. Anschließend wurden die

Proben mit 5 mL Hexan/Essigester (9 : 1) versetzt und mit Hilfe des Ultraturax homogenisiert. Zur besseren Durchmischung wurden die Proben 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Es folgte eine grobe Vorfiltrierung der gewonnenen Extrakte mittels Faltenfilter, welcher mit wasserfreiem Natriumsulfat bestückt war. Das erhaltene Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und einem weiteren Clean-up durch eine Kieselgelsäule unterzogen. Die Fraktionen 3 bis 10 wurden wiederum als Hauptfraktion vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeeengt. Der aufkonzentrierte Extrakt wurde zum Schluss mit Hexan auf ein definiertes Volumen von 1 mL eingestellt und mittels GC-ECD (vgl. Abb. 46) vermessen.

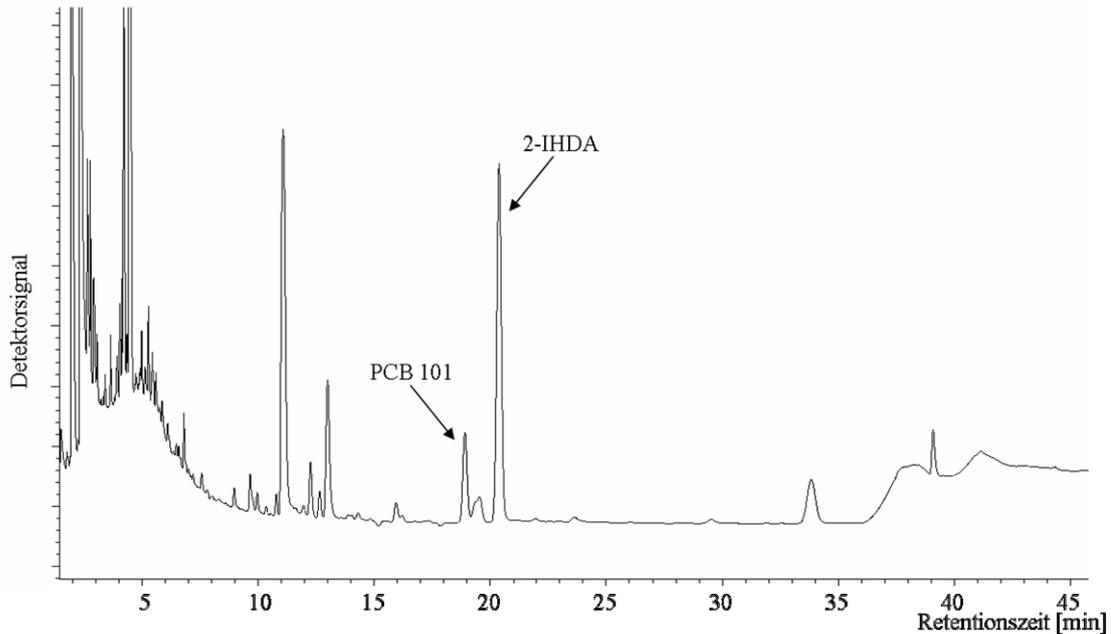


**Abb. 46: Chromatogramm einer nach Aufarbeitungsversuch 2 gereinigten Schilddrüse**

Als Ergebnis dieser Aufarbeitung konnte 2-IHDA in den Proben nachgewiesen werden. Hierbei sind trotzdem noch Verunreinigungen durch Matrixkomponenten erkennbar, die sich negativ auf die Nachweisgrenzen und die Haltbarkeit der analytischen Säule auswirken könnten.

#### *Aufarbeitung 3:*

Für eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurde während der Aufarbeitung ein weiterer Schritt zur Homogenisierung der Probenmatrix hinzugefügt. Nachdem die Schilddrüse mit flüssigem Stickstoff behandelt und grob zerkleinert wurde, erfolgte eine Verreibung der Schilddrüse unter Zugabe von weiterem flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill. Im Anschluss wurde jeweils 1 g Gewebe abgewogen und dieses im Extraktionsmedium (Hexan/Essigester, 9 : 1) mittels Ultraturax weiter homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu Aufarbeitung 2. Die nachstehende Abb. 47 zeigt ein GC-ECD-Chromatogramm einer solchen Probe.



**Abb. 47: Chromatogramm einer nach Aufarbeitungsversuch 3 gereinigten Schilddrüse**

Wie auch bei Aufarbeitungsversuch 2 sind hier nicht alle Matrixkomponenten abgetrennt worden. Durch die zusätzliche Homogenisierungsmethode konnte allerdings eine geringere Schwankungsbreite der Analysenergebnisse einer Probe erreicht werden. Eine Änderung des Temperaturprogrammes im Gaschromatographen erzielte außerdem eine Verbesserung des Grundrauschens im Bereich der Analytsignale, was wiederum zu einer eindeutigeren Identifizierung der Analytpeaks führte. Des Weiteren wurden in diesem Versuch die Analyte mittels Standardaddition quantifiziert, um den Einfluss der Matrix zu berücksichtigen.

Zusätzlich dazu wurde die Aufarbeitung hinsichtlich der HPLC-Messung optimiert. Die grundsätzlichen Arbeitsschritte der Extraktion und des Clean-ups unterschieden sich dabei nicht von der Methode für die GC-Messung. Der Rückstand aus der Kieselgelfraktionierung wurde lediglich statt in Hexan/Essigester (9 : 1), da dieses nicht im Eluenten (Acetonitril) der HPLC löslich ist, in 1 mL Methanol aufgenommen und der interne Standard angepasst (für HPLC-Messung PCB 180).

#### **4.2.3.2 Optimierung der Aufarbeitung für die Iodlactone**

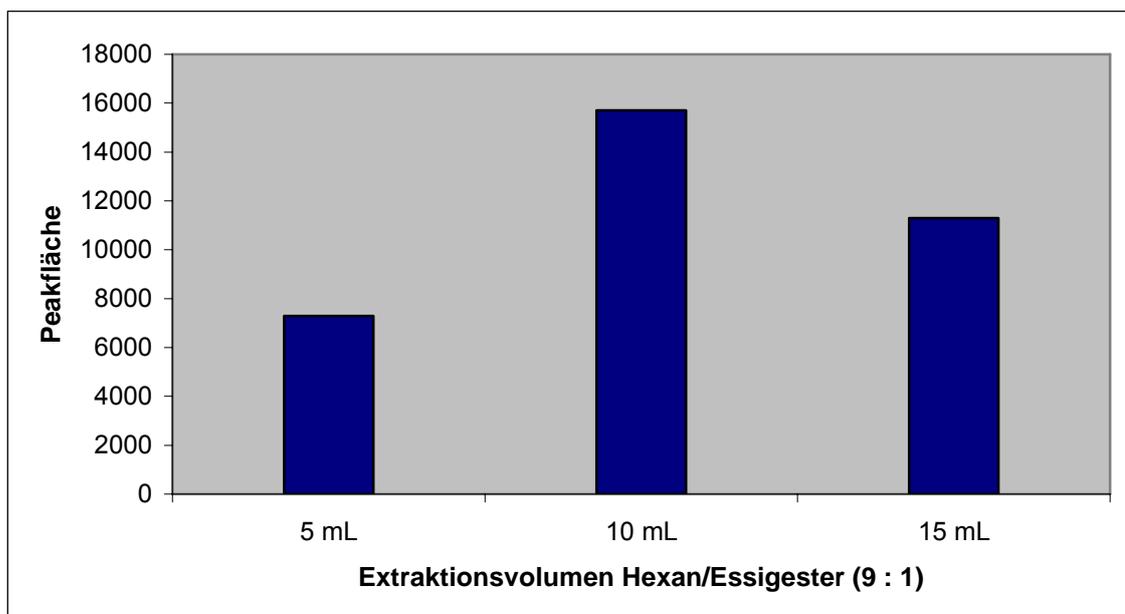
Die bestehende optimierte Methode zur Bestimmung der Iodaldehyde bildete die Grundlage für den Nachweis der Iodlactone in den biologischen Proben. Die bereits verwendeten Verfahren zur Probenzerkleinerung und Homogenisierung wurden zu diesem Zweck auf die Iodlacton-Analyse übertragen.

Da im Verlauf dieser Arbeit eine gemeinsame Methode zur parallelen Bestimmung der Iodlactone und Iodaldehyde entwickelt werden sollte, wurde hierbei ebenso mit Hexan/Essigester (9 : 1) extrahiert. Hinsichtlich der Optimierung dieses Analysenschrittes wurden verschiedene Volumina des Extraktionsgemisches getestet. Um das Ziel einer vollständigen Extraktion der Analyte zu erreichen, wurden die dabei eingesetzten Proben nach entsprechender Probenzerkleinerung mit 5 mL, 10 mL bzw. 15 mL Hexan/Essigester (9 : 1) extrahiert und entsprechend der in Abb. 21 (Seite 54) dargestellten Methode weiter aufgearbeitet. Zur Quantifizierung der Analyte wurde die bereits erwähnte Standardadditionsmethode verwendet.

Die nachfolgende Abb. 48 stellt den Einfluss des Extraktionsvolumens auf die Intensität der Peakfläche von AA- $\delta$ -IL anhand einer LC-MS/MS-Messung dar. Für die Gegenüberstellung wurden dabei die jeweiligen Messwerte der Konzentrationsstufe von 0,1 ng/ $\mu$ L verwendet (vgl. Messwerte Tab. 26).

**Tab. 26: Messwerte zum Einfluss des Extraktionsvolumens**

Extraktionsvolumen	Peakfläche (AA- $\delta$ -IL)
5 mL	7290
10 mL	15700
15 mL	11300



**Abb. 48: Einfluss des Extraktionsvolumens auf die Peakflächen von AA- $\delta$ -IL**

Durch den Vergleich der Peakflächenintensität konnte ein Optimum bei 10 mL Extraktionsvolumen ermittelt werden. Die Steigerung des Extraktionsvolumens von 5 mL auf 10 mL führte dabei zu einer Intensitätssteigerung von 215 %. Ferner konnte bei diesem Versuch gezeigt werden, dass eine weitere Erhöhung des Lösemittelvolumens nicht zu einem Anstieg der Signalintensität führte. Eine mögliche Ursache für diese Negativentwicklung der Peakflächen könnte im Zerfall des Analyten durch einen erhöhten Zeitaufwand beim Abziehen des Lösemittels und/oder eine längere thermische Belastung durch das Heizbad beim Abrotieren des Extraktionsmittels gesehen werden.

Für weitere Analysen wurde für die Extraktion 10 mL Hexan/Essigester (9 : 1) verwendet. Weiterführende Optimierungsversuche bezüglich der Probenaufreinigung sind in den Abschnitten 4.2.3.3 und 4.2.3.4 näher erläutert.

#### **4.2.3.3 Anreicherungsversuche mittels SPME**

Um die Aufarbeitung zu vereinfachen und störende Matrixbestandteile abzutrennen wurden SPME-Versuche an den synthetisierten Standards durchgeführt. Da die Substanzen nicht wasserlöslich sind, konnte hierbei nur das Verfahren der Headspace-SPME angewendet werden. Ein Lösen der Substanzen in einem organischen Agens hätte zu einer Belegung der Fasern mit Lösemittelmolekülen geführt und die Adsorption der Analyte an die Faser verhindert.

Als Fasermaterialien wurden PDMS, PA, sowie die Kombinationen PDMS/DVB, Carboxen/PDMS, und CW/DVB in unterschiedlicher Schichtdicke getestet. Neben den Anreicherungszeiten (30 bis 180 min) wurden die Anreicherungstemperaturen (RT, 30 °C und 40 °C) und Desorptionszeiten (3 bis 5 min) variiert. Diese Versuche wurden ausschließlich anhand der Iodaldehyde durchgeführt, da die Synthese der Iodlacton-Standards sehr kostenintensiv ist.

Trotz der verschiedenen Optimierungsversuche konnten die Iodaldehyde nicht nachgewiesen werden. Lediglich der nicht-iodierte Aldehyd und der ISTD PCB 101 wurden an den verschiedenen Fasern angereichert. Mögliche Ursachen hierfür könnten in einer unzureichenden Flüchtigkeit oder einer Zersetzung der Analyte zu finden sein. Zu diesem Zweck wurde eine Probe über 3 Tage hinweg bei 30 °C temperiert und anschließend aus dem Dampfraum eine Probe mittels gasdichter Spritze entnommen. Bei der GC-MS-Analyse zeigt sich auch hier, dass nur der nicht-iodierte Aldehyd angereichert wurde. Eine mögliche Zersetzung während der Anreicherung konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass der noch vorhandene Feststoff gelöst und mittels GC-MS ver-

messen wurde. Hierbei waren die Iodaldehyde eindeutig nachweisbar. Die Ursache für die Nicht-Anreicherung liegt vermutlich in der unzureichenden Flüchtigkeit der Substanzen begründet.

#### 4.2.3.4 Optimierung der Probenaufarbeitung

Trotz Verwendung nachweisempfindlicher Detektoren stellt ein Hauptbestandteil vieler Bestimmungsmethoden die Probenaufreinigung dar. Wie bereits im Abschnitt 4.2.3.1 gezeigt, reicht ein einfaches Filtrieren der Probenlösung oft nicht aus. Um eine bessere Nachweisempfindlichkeit in den biologischen Proben zu erreichen und des weiteren die Messinstrumente vor einer zu großen Kontamination zu schützen, wurden die im Folgenden beschriebenen Schritte des Proben-Cleans-up entwickelt und optimiert. Die gewonnenen Ergebnisse werden exemplarisch an 2-IHDA und AA- $\delta$ -IL aufgeführt.

##### *Säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel:*

Zur Bestimmung der Iodaldehyde wurden je 3 g Kieselgel 60 in eine Glaskartusche eingewogen und mit dem entsprechend verwendeten Lösemittel/Elutionsmittel die feste Phase gewaschen.

Bei Erreichen der Phasengrenze (gasförmig – flüssig) nach dem Waschen wurden 100  $\mu$ L des Stamm-Mixes (2-IHDA c = 103 ng/ $\mu$ L und PCB 101 c = 7,3 ng/ $\mu$ L) aufgegeben. Für die Bestimmung des Wanderungsverhaltens der Standards werden 20 Fraktionen von je 1 mL genommen, wobei die erste Fraktion sich wie folgt gestaltet:

100  $\mu$ L der Probenaufgabe und 1 mL des Elutionsmittels, so dass sich demnach ca. 1,1 mL in der Fraktion 1 befinden.

Getestet werden unterschiedliche Zusammensetzungen von Hexan und Essigester bzw. auch Hexan als Reinsubstanz. Es wurden folgende Varianten erprobt (Tab. 27):

**Tab. 27: Verwendete Elutionsmittel bzw. Elutionsmittelgemische und ihre Zusammensetzung**

<b>Elutionsmittel</b>	<b>Zusammensetzung (v/v)</b>
Hexan	rein
Hexan/Essigester	9 : 1
Hexan/Essigester	8 : 2
Hexan/Essigester	7 : 3
Hexan/Essigester	6 : 4

Die Messung der einzelnen Fraktion wurde am GC-ECD durchgeführt, da bereits kleine Konzentrationen von organischen Halogenverbindungen nachweisbar sind. Für die Auswertung der Versuche wurden die detektierten Peakflächen nach der 100 %-Methode ausgewertet. Berechnet wurde der prozentuale Anteil an der Gesamtfläche aller Fraktionen, die die Analyte enthalten.

$$\text{prozentualer Anteil an der Gesamtfläche} = \frac{\text{Fläche des Analyten in Fraktion } x}{\text{Summe aller Flächen des Analyten}} * 100\%$$

Betrachtet wurde dabei nicht nur 2-IHDA als nachzuweisender Analyt, sondern auch das Elutionsverhalten von PCB 101, welches als interner Standard in den späteren Untersuchungen mitgeführt werden sollte (Messwerte vgl. Anhang Tab-A 12).

Bei allen durchgeführten Versuchen war festzustellen, dass sich die Analyte nicht nur auf eine Fraktion beschränken, sondern sich in mindestens 5 Fraktionen befinden, was zur Folge haben muss, dass diese Fraktionen im späteren Verlauf der Untersuchungen an biologischen Proben zu vereinigen sind.

Um die gewonnenen Ergebnisse zu verdeutlichen, wurden in einer Graphik (siehe Abb. 49) die prozentualen Anteile an der Gesamtfläche den entsprechenden Fraktionen zugeordnet.

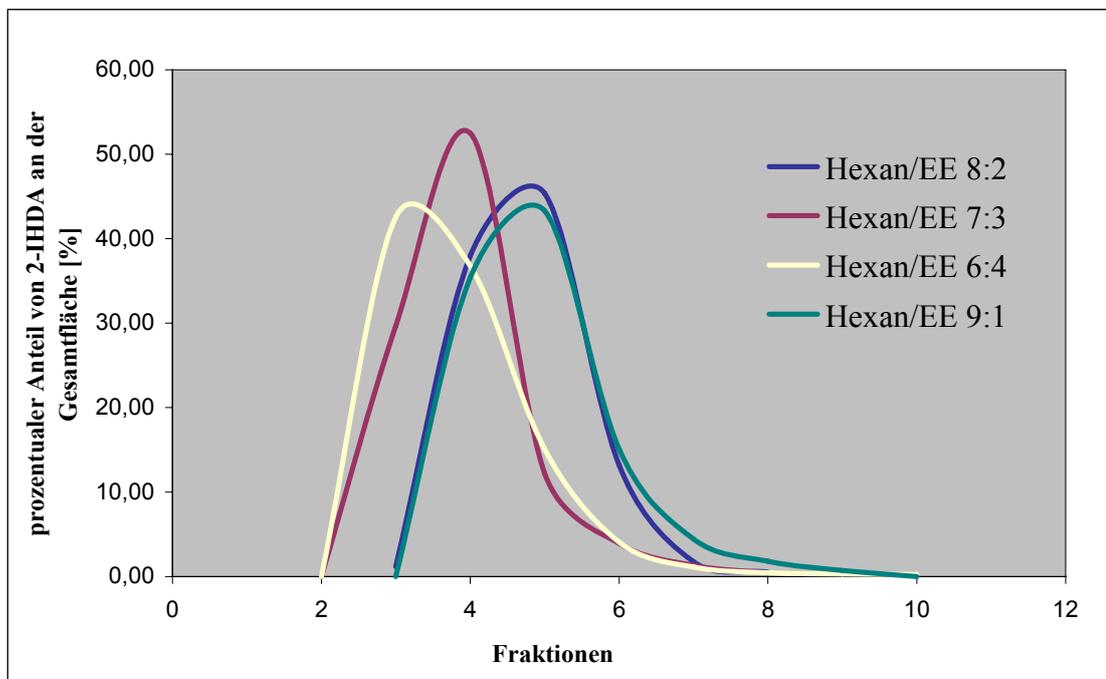


Abb. 49: Verteilung von 2-IHDA in den Fraktionen der säulenchromatographischen Aufreinigung mit unterschiedlichen Elutionsgemischen

Auffällig war, dass mit steigendem Hexan-Anteil die Analyte in der Säule langsamer transportiert wurden und somit später eluierten. Außerdem war augenscheinlich eine schmalere Bande für den größten Anteil der Analytkonzentration zu verzeichnen.

Mit Hexan als Elutionsmittel konnte 2-IHDA nicht wieder von der Säule eluiert und in keiner der zwanzig Fraktionen detektiert werden, lediglich PCB 101 wurde in den Fraktionen 8 bis 15 gefunden.

Aufgrund seiner Polarität muss demzufolge 2-IHDA mit einem polarerem Elutionsmittel bzw. einem Elutionsmittelgemisch extrahiert werden. In Abhängigkeit der Matrix sollte allerdings auf eine zu hohe Polarität verzichtet werden. Es ist anzunehmen, dass die Bestandteile der biologischen Proben einen stärker polaren Charakter aufweisen, als die zu untersuchenden Analyte. Als optimal erschien demnach ein Gemisch mit Hexan und Essigester im Verhältnis 9 : 1 (v/v).

Für die Gewinnung der Iodlacton-Reinstandards, sowie die Bestimmung der Iodlactone in der biologischen Matrix wurde das gleiche Verfahren angewendet. Aufgrund von dünnschichtchromatographischen Voruntersuchungen konnte für das Lösemittelgemisch Hexan/Essigester (9 : 1) keine ausreichenden Trennung für die Analyte von ihren Ausgangsverbindungen erzielt werden. Als Folge dieser Beobachtung wurden daraufhin verschiedene Elutionsgemische bezüglich ihrer Trenneffizienz mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel-DC-Platte getestet. Die Detektion der Substanzen erfolgt bei einer Wellenlänge von 254 nm und mittels Sprühreagenz bestehend aus  $[\text{Ce(IV)SO}_4]$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , welches unter Wärmezufuhr eine blaue Farbreaktion bewirkte. Für die Trennversuche der Synthesegemische wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Elutionsmittel erprobt (vgl. Tab. 28).

**Tab. 28: Elutionsmittel bzw. Elutionsmittelgemische zur dünn-schichtchromatographischen Auftrennung**

Elutionsmittel	Zusammensetzung (v/v)
Methanol	rein
Ethanol	rein
Methanol/Essigester	1 : 1
Methanol/Essigester	1 : 3
Methanol/Essigester	1 : 5
Essigester	rein
Diethylether (Ether)	rein
Hexan/Ether	1 : 1
Hexan/Ether	2 : 1
Hexan/Ether	3 : 1
Hexan/Essigester	1 : 1
Hexan/Essigester	2 : 1
Hexan/Essigester	9 : 1

Die beste Trennleistung der verwendeten Elutionsmittel und Gemische wurde mit Hexan/Ether (2 : 1) erzielt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde anschließend eine säulenchromatographische Aufreinigung der synthetisierten Standardsubstanzen unternommen. Zu diesem Zweck wurde eine Chromatographiesäule mit 3 g Kieselgel befüllt, diese mit dem späteren Elutionsmittel gewaschen und anschließend der synthetisierte Standard aufgegeben. Nach Probenaufgabe, 200 µL des synthetisierten Standards, wurde begonnen mit Hexan/Ether zu eluieren, wobei 60 Fraktionen von je einem Milliliter geschnitten wurden. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels Argonstrom eingengt und mit Hilfe der DC auf ihre Reinheit überprüft. In diesem Zusammenhang konnten zwei Fraktionsbereiche ermittelt werden. Während der eine Bereich nur einen Substanzspot zeigte, welcher durch Massenspektrometrie als Iodlacton identifiziert wurde, konnte im zweiten Bereich noch ein weiterer Spot registriert werden, der durch nicht umgesetzte Arachidonsäure hervorgerufen wurde. Die vereinigten Fraktionen des zweiten Bereichs wurden anschließend nochmals mittels HPLC (Messbedingungen siehe Tab. 11 Seite 44) aufgereinigt, so dass ein Reinstandard für die NMR-Spektrometrie gewonnen werden konnte.

Die hierbei erzielten Ergebnisse wurden weiterführend für die Aufarbeitungs- und Aufreinigungsversuche von biologischen Probenmaterialien eingesetzt (vgl. 4.2.3.1 und 4.2.3.2), wobei eine Anpassung der Fraktionen vorgenommen wurde, da durch den Einfluss der Matrix der biologischen Proben es zu einer Verschiebung der Analyte in den einzelnen Fraktionen kam. Die geänderten Fraktionen sind in der nachstehenden Tab. 29 zusammengefasst und finden in der letztendlich durchgeführten Methode ihre Anwendung.

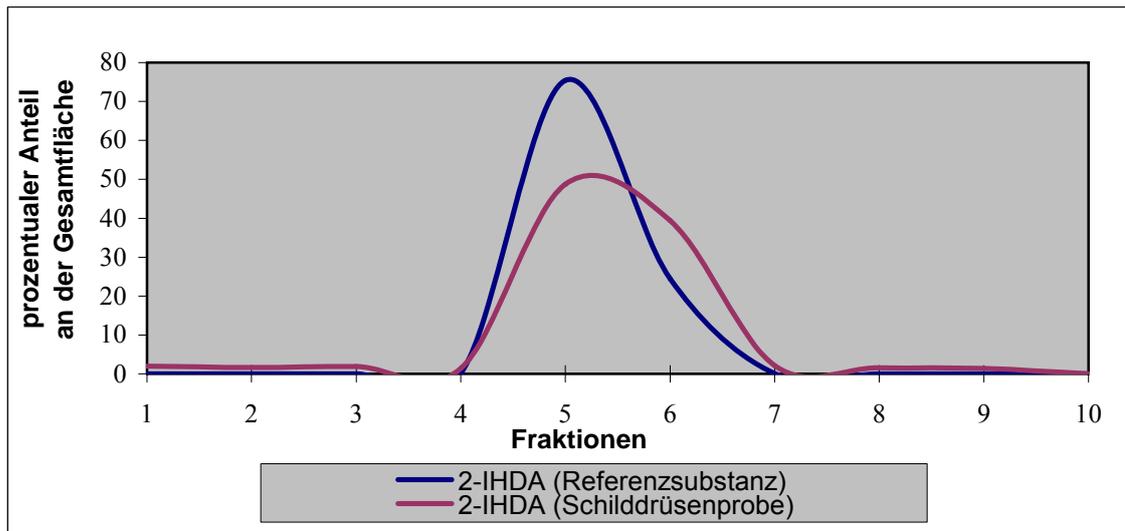
**Tab. 29: Fraktionen der Kieselgelaufreinigung bei der Probenaufarbeitung**

	Fraktionen (je 1 mL)	
	Iodaldehyde	Iodlactone
Vorlauf	1 – 3	1 – 13
Hauptlauf	4 – 13	14 – 73
Nachlauf	14 – 23	74 – 90

*Probenaufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie:*

Für eine weitere Aufreinigung der Schilddrüsenproben wurde zusätzlich zu der säulenchromatographischen Aufreinigung eine Abtrennung von Matrixbestandteilen mittels GPC durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde als Festphase ein Polymer aus Divinylbenzol und Styrol mit einem Vernetzungsgrad von 8 % verwendet. Durch den Einsatz von Biobeads SX-8 sollten vor allem die höhermolekularen Bestandteile (Molekulargewicht > 1000 Dalton) des Schilddrüsen-Extraktes, wie z.B. Proteine abgetrennt werden.

Die Versuche wurden hierbei anhand von Iodaldehyd-Standards sowie an Schilddrüsenproben durchgeführt. Es wurde Fraktionen von je 10 mL geschnitten, wobei die Iodlipide in den Fraktionen 4 bis 7 (Abb. 50) mittels ECD nachgewiesen werden konnten (Messwerte siehe Tab-A 13).



**Abb. 50: Verteilung von 2-IHDA in den Fraktionen der GPC**

Für weitere Arbeiten wurden die Fraktionen 3 bis 8 als Hauptlauf vereinigt und weiter aufgearbeitet (vgl. Tab. 30).

**Tab. 30: Fraktionen der GPC**

	Fraktion	Volumen
Vorlauf	1 bis 2	20 ml
Hauptlauf	3 bis 8	60 ml
Nachlauf	9 bis 10	20 ml

Eine erste Aussage bezüglich der Effizienz dieses zusätzlichen Aufreinigungsschrittes wurde anhand eines gravimetrischen Versuchs getroffen. Eine Schilddrüsenprobe wurde gemäß Abb. 21 (Seite 54) aufgearbeitet und der Extrakt aus 5 g Schilddrüsengewebe verschiedenen Aufreinigungsschritten unterworfen. Die einzelnen gewonnenen Fraktionen wurden bis zur Trockne einrotiert und anschließend gewogen. In der nachfolgenden Tab. 31 sind die ermittelten Mengen aufgezeigt.

Tab. 31: Auswaagen der Clean-up-Fractionen

Fraktion / Clean-up	Gewicht Kolben (mg)	Gewicht Kolben + Rückstand (mg)	Rückstand (mg)	Summe (mg)
ohne Clean-up	16386,5	16401,6	15,1	15,1
Vorlauf SC	17661,5	17662,6	1,1	14,9
Hauptlauf SC	17566,2	17579,6	13,3	
Nachlauf SC	15360,8	15361,3	0,5	
Vorlauf GPC	26853,0	26854,1	1,0	15,5
Hauptlauf GPC	51342,8	51356,0	13,2	
Nachlauf GPC	31858,9	31860,2	1,3	
Vorlauf GPC/SC	17708,9	17709,7	0,8	14,8
Hauptlauf GPC/SC	16368,3	16381,1	12,8	
Nachlauf GPC/SC	17776,1	17777,3	1,2	

Anhand dieses gravimetrischen Versuchs konnte gezeigt werden, dass alle drei Verfahrensweisen eine Matrixabtrennung im Hauptlauf bewirkten. Die besten Ergebnisse lieferte dabei die Kombination aus GPC und SC. Betrachtet man allerdings nicht nur die Hauptlauf fraktion, sondern die Rückstandssumme aus den drei Fraktionen scheint es durch die GPC zu einer Anreicherung von Substanzen zu kommen. Diese eluieren bei einer gaschromatographischen Analyse zur gleichen Zeit wie die Analyte und verfälschen somit das Ergebnis (vgl. Abb. 51, blauer Graph). Die Messdaten zu dem folgenden Chromatogramm sind in Tab-A 14 aufgeführt.

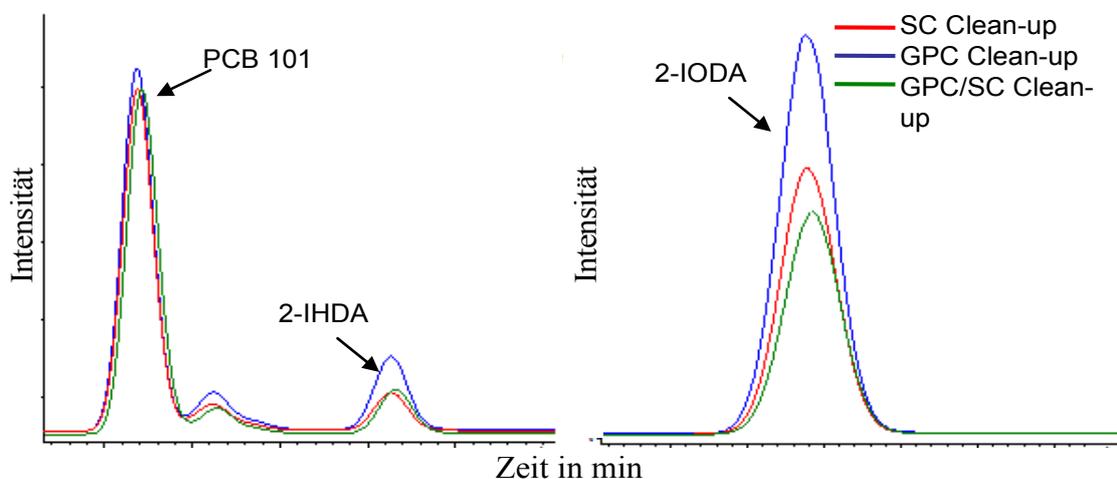
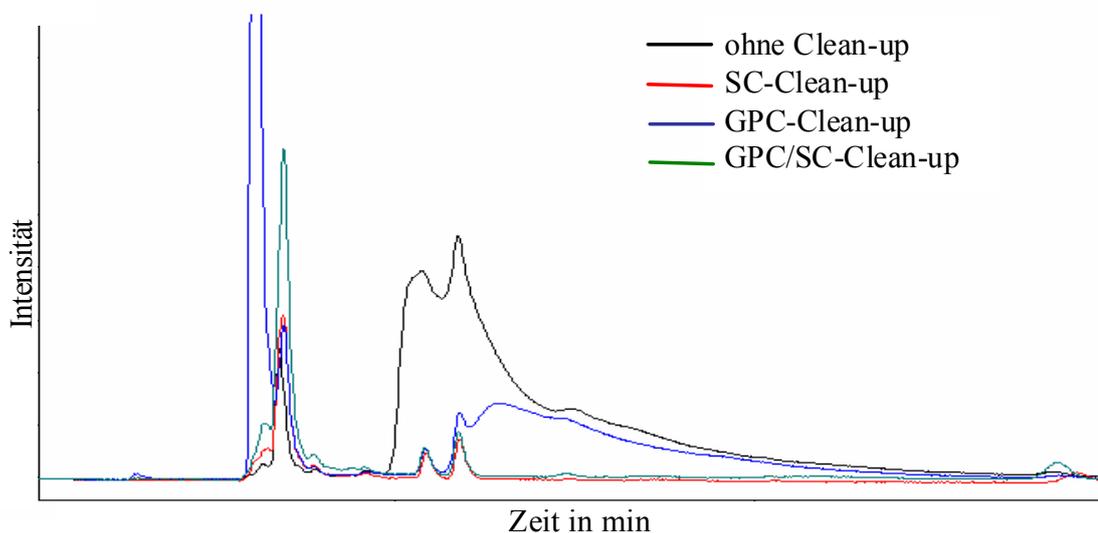


Abb. 51: GC-ECD-Chromatogrammausschnitte der verschiedenen Clean-up-Schritte

Bei einer Kombination von GPC und säulenchromatographischer Aufreinigung wurden geringere Peakflächen ermittelt als bei einem alleinigen Clean-up mittels SC, was darauf schließen lässt, dass es durch einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt zu einem Analytverlust kommt. Des Weiteren konnte anhand von Messungen mittels HPLC-UV festgestellt werden, dass durch eine gelchromatographische Probenvorbehandlung vorhandene störende Matrixbestandteile nicht vollständig abgetrennt wurden. Bei der Analysenwellenlänge von 200 nm sieht man eine erhöhte Grundlinie bei der GPC-Methode im Vergleich mit einer säulenchromatographischen Aufreinigung (vgl. Abb. 52). Die Erhöhung der Grundlinie hat dabei zur Folge, dass geringere Analytgehalte nicht mehr detektiert werden können. Auch bei dieser Untersuchung zeigt sich ein zusätzlicher Analytverlust durch eine Kombination von GPC und SC.



**Abb. 52: HPLC-Chromatogramm der verschiedenen Clean-up-Schritte**

Aufgrund der Anreicherung von Störkomponenten während der gelpermeationschromatographischen Aufreinigung, der höheren Verluste und dem hohen Verbrauch von Lösungsmitteln ist die GPC als zusätzlicher Clean-up Schritt nicht zu empfehlen. In den weiteren Versuchen kam deshalb nur die Säulenchromatographie zu Einsatz.

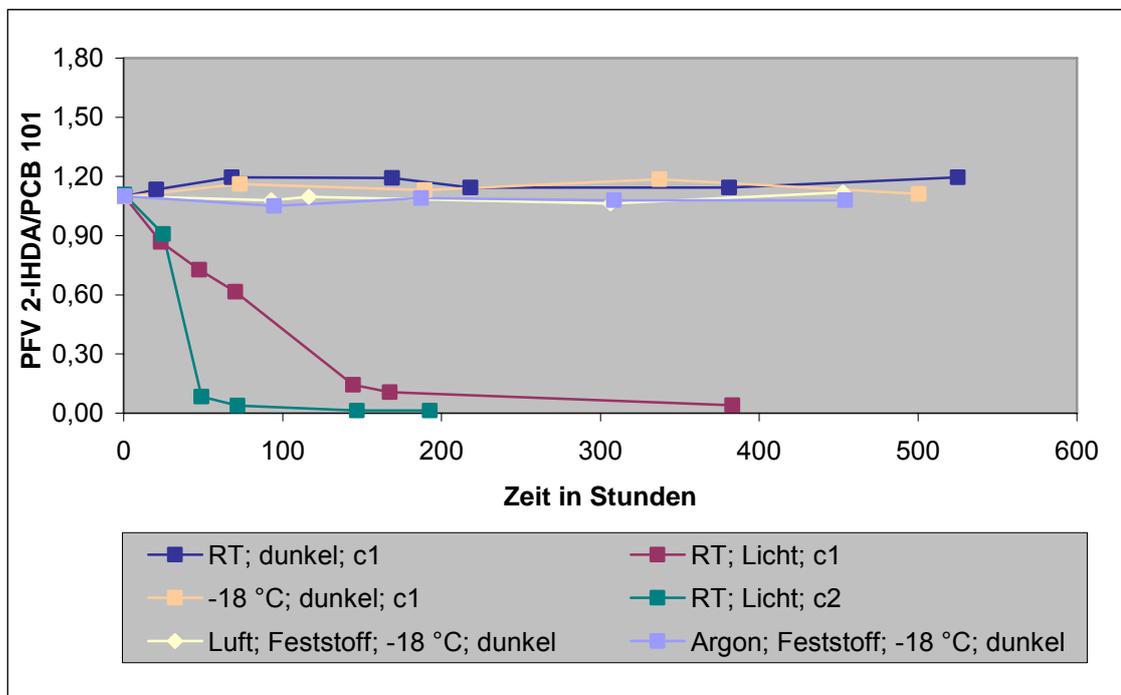
#### 4.2.4 Stabilitätsuntersuchungen

Erste Anzeichen eines Analytzerfalls wurden während der Synthese der Iodlipide beobachtet. Dies äußerte sich durch eine Farbveränderung der ehemals schwach gelblichen Lösung in einen bräunlich-violetten Feststoff beim Abziehen des Lösemittels bei der Synthese der Iodaldehyde. Aufgrund dieser Tatsache wurden im Folgenden verschiedene Experimente bezüglich der Stabilität der Substanzen vorgenommen.

#### 4.2.4.1 Stabilitätsuntersuchungen für die Iodaldehyde und Aldehyde

Die ersten Untersuchungen bezogen sich auf den Einfluss von Sauerstoff, Licht und Temperatur. Dies wird an dieser Stelle anhand von 2-IHDA mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen ( $c_1 = 1,90 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $c_2 = 0,95 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) näher erläutert.

Es wurden die Änderungen der Peakflächenverhältnisse von 2-IHDA zu PCB 101 ab dem Tag der Synthese innerhalb eines Zeitraumes von 20 Tagen chronologisch durch Messungen am GC-ECD verfolgt. Die Konzentration von PCB 101 für  $c_1$  betrug dabei  $1,01 \text{ ng}/\mu\text{L}$  und für  $c_2$   $5,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Die Messergebnisse sind in Abb. 53 graphisch dargestellt (Messwerte vgl. Tab-A 15 - Tab-A 22). Da PCB 101 unter gegebenen Bedingungen stabil ist, spiegelt eine Abnahme des Peakflächenverhältnisses den Abbau des Analyten wider.



**Abb. 53: Stabilitätsuntersuchungen von 2-IHDA unter verschiedenen äußeren Bedingungen**

Bereits nach einem Tag konnte unter Lichteinfluss ein deutlicher Abbau (ca. 20 %) des Iodaldehyds beobachtet werden. Visuell konnte bei der höher konzentrierten Lösung ( $c_2$ ) eine leichte Rosafärbung beobachtet werden, die sich im weiteren Verlauf der Untersuchung verstärkte. Dies führte zu der Annahme, dass es durch Licht zu einer Bildung von  $\text{I}_2$  kommt und der Iodaldehyd durch eine homolytische Spaltung abgebaut wird (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Nach 2 Tagen ließ das Peakflächenverhältnis von  $c_2$  auf einen annähernd vollständigen Abbau des Produktes schließen. Bei der niedriger kon-

zentrierten Lösung war das gleiche Ausmaß des Zerfalls ( $PFV = 0,1$ ) erst nach 7 Tagen zu beobachten. Aufgrund der hohen Verdünnung zeigte die Lösung c1 nur eine leichte Rosafärbung.

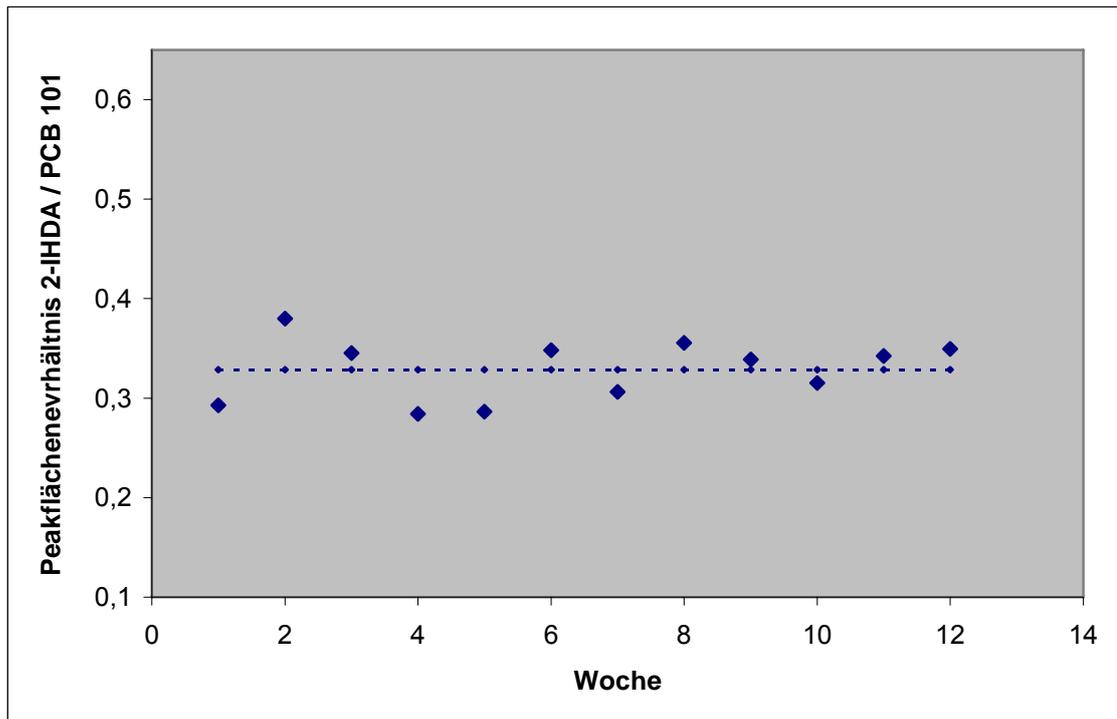
Bei den Proben, die unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und bei  $-18\text{ °C}$  gelagert wurden, zeigte sich keine Verkleinerung des PFVs. Dies ließ den Schluss zu, dass die Temperatur keinen Einfluss auf die Stabilität der Iodlipide hat.

Auswirkungen von Sauerstoff auf die Stabilität der Iodlipide wurden bei den Iodaldehyden anhand von Feststoffproben durchgeführt. Zum Einen wurde dafür die Probe unter Raumluft (Sauerstoff) und zum Anderen unter Argon gelagert. Für den chronologischen Verlauf wurden die Proben jeweils am Tag der Messungen eingewogen und auf eine Konzentration an 2-IHDA von ca.  $1,9\text{ ng}/\mu\text{L}$  verdünnt. Um den Vergleich der Proben trotz unterschiedlicher Einwaagen zu ermöglichen wurden die Peakflächen des Iodaldehyds auf eine Konzentration von exakt  $1,9\text{ ng}/\mu\text{L}$  extrapoliert bevor das Peakflächenverhältnis gebildet wurde. Auch bei diesem Experiment zeigt sich keine Abnahme des PFVs in der Zeit der Untersuchungen. Dies ließ wiederum darauf schließen, dass die Iodlipide nicht zersetzt werden.

Unter der Voraussetzung des Lichtausschlusses schienen sowohl die Feststoffe als auch die Lösungen der Iodlipide über einen begrenzten Zeitraum hinweg stabil zu sein. Da die Synthese mit einem zum Teil erheblichen Kosten- und Zeitaufwand einhergeht, sollte in einem weiteren Experiment nochmals die Stabilität der Substanzen unter den entsprechenden Lagerbedingungen (dunkel, Tiefkühler, Feststoff und Lösungen) über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Hierzu wurden je 12 Proben der Iodaldehyde eingewogen und wöchentlich eine dieser Proben in Hexan/Essigester (9 : 1, v/v) gelöst. Die Konzentration der Analyte wurde auf  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$  eingestellt. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe des internen Standards PCB 101 ( $c = 10,2\text{ ng}/\mu\text{L}$ ) mittels GC-MS (Full-Scan und SIM) vermessen.

Abb. 54 stellt die Abhängigkeit des PFVs 2-IHDA/PCB 101 von der Zeit dar (Messwerte vgl. Anhang Tab-A 23).

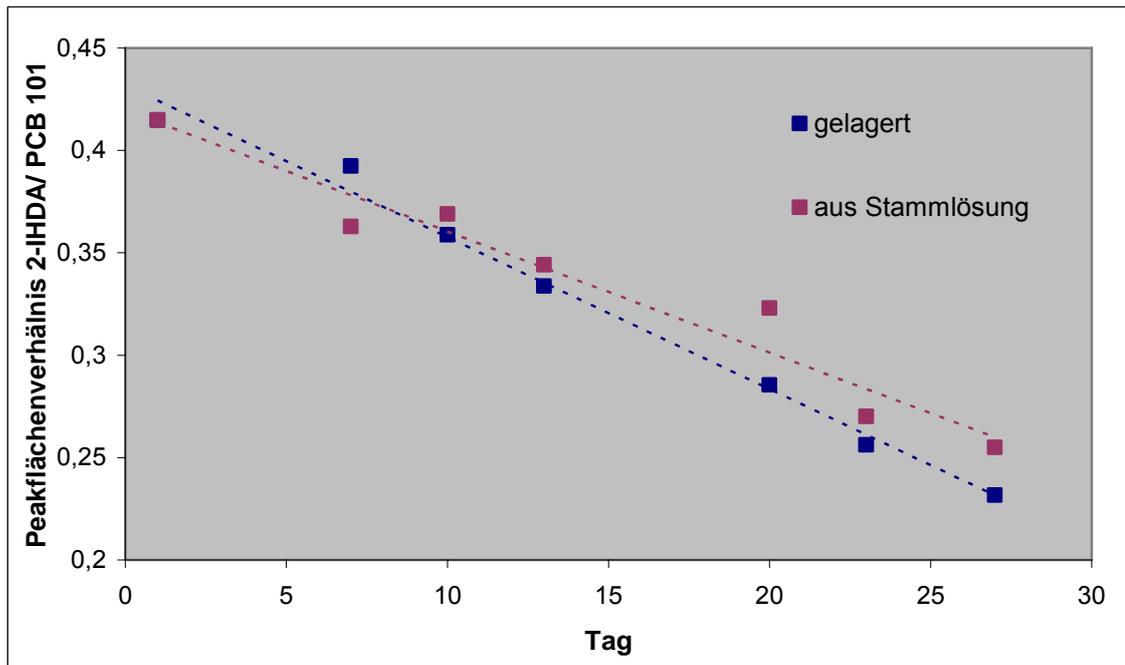


**Abb. 54: Langzeit-Stabilitätsuntersuchungen von 2-IHDA (Feststoff)**

Hierbei lässt sich durch die Trendanalyse nach Neumann ein Prüfwert von 2,116 ermitteln, der größer ist als der tabellierte Wert von 1,1276 ( $P = 0,95$ ;  $n = 12$ ). Es liegt demnach kein Trend vor und es kann von einer Stabilität der Feststoffe unter den gegebenen Lagerbedingungen in einem Zeitraum von 12 Wochen gesprochen werden.

Zusätzlich sollte nochmals die Stabilität von bereits hergestellten Lösungen unter den gegebenen Lagerbedingungen untersucht werden. Zunächst wurde je eine Stammlösung der Analyte mit einer Konzentration von  $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  in Hexan/Essigester (9 : 1, v/v) hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden durch weitere Verdünnung zwei Lösungen mit einer Konzentration von  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  bzw.  $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$  angefertigt. Die Lösungen wurden wie die Feststoffe bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  im Dunklen gelagert. Neben den aufbewahrten Verdünnungen ( $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  bzw.  $c = 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) wurden am Tag der Messung aus der Stammlösung ( $c = 4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) erneut Lösungen gleicher Konzentration hergestellt. Durch Vergleich der Messergebnisse sollten Rückschlüsse bezüglich des Einflusses der Konzentration auf die Stabilität gezogen werden. Für die Messungen mittels GC-MS wurde PCB 101 ( $c = 10,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) als interner Standard eingesetzt.

In Abb. 55 ist exemplarisch die Stabilität einer 2-IHDA-Lösung dargestellt. Der blaue Graph stellt dabei den zeitlichen Verlauf einer gelagerten  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ -Lösung dar, wohingegen der rote Graph den Verlauf einer am Tag der Messung neu hergestellten Lösung ( $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) zeigt (Messwerte siehe Tab-A 24).



**Abb. 55: Stabilitätsuntersuchung einer 100 ng/μL-Lösung von 2-IHDA (SIM)**

(gelagert = gelagerte verdünnte Lösung, aus Stammlösung = aus Stammlösung am Tag der Messung neu hergestellte Lösung)

Es ergab sich bei der Trendanalyse nach Neumann für die gelagerte verdünnte Lösung ein Prüfwert von 0,210 und für die aus der Stammlösung „frisch“ verdünnte Lösung ein Prüfwert von 0,357. Diese Werte sind beide geringer als der tabellierte Wert von 0,9359 ( $n = 7$ ; 95 %). Für beide Lösungen konnte mit dieser Analyse eindeutig gezeigt werden, dass ein Trend vorlag und die Lösungen unabhängig von ihrer Konzentration abgebaut werden.

Alle Lösungen zeigen dabei einen fast linearen Abfall der Iodaldehydkonzentration. Die durchschnittliche Halbwertszeit der Proben lag bei etwa einem Monat (vgl. Tab. 32).

**Tab. 32: Ermittelte Halbwertszeiten der Iodaldehydlösungen**

Lösung	Mittlere Halbwertszeit [d]
100 ng/μl 2-IHDA	30,70 +/- 0,57
100 ng/μl 2-IHDA Stamm	36,05 +/- 1,48
200 ng/μl 2-IHDA	30,50 +/- 1,41
200 ng/μl 2-IHDA Stamm	37,40 +/- 3,82
100 ng/μl 2-IODA	33,10 +/- 0,71
100 ng/μl 2-IODA Stamm	34,15 +/- 3,32

Für analytische Zwecke sind aufbewahrte Lösungen damit ungeeignet. Für alle folgenden Untersuchungen wurden stets neue Lösungen aus den Feststoffen hergestellt. Eine

Ursache für die Zersetzung ist bis dato ungeklärt, da die Feststoffe unter den gegebenen Bedingungen stabil blieben.

Bei den Stabilitätsuntersuchungen von 2-IHDA war außerdem zu beobachten, dass sich neben 2-IHDA auch HDA abbaute. Ebenso wurde eine Erniedrigung der Peakfläche bei ODA festgestellt. Ausgehend von diesen Auffälligkeiten wurden auch die Aldehyde hinsichtlich ihrer Stabilität in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Da die Reinheit der Syntheseprodukte anhand von nicht umgesetzten HDA bzw. ODA ermittelt werden sollte, musste zunächst festgestellt werden, bei welchen Konzentrationen die beiden Aldehyde stabil blieben.

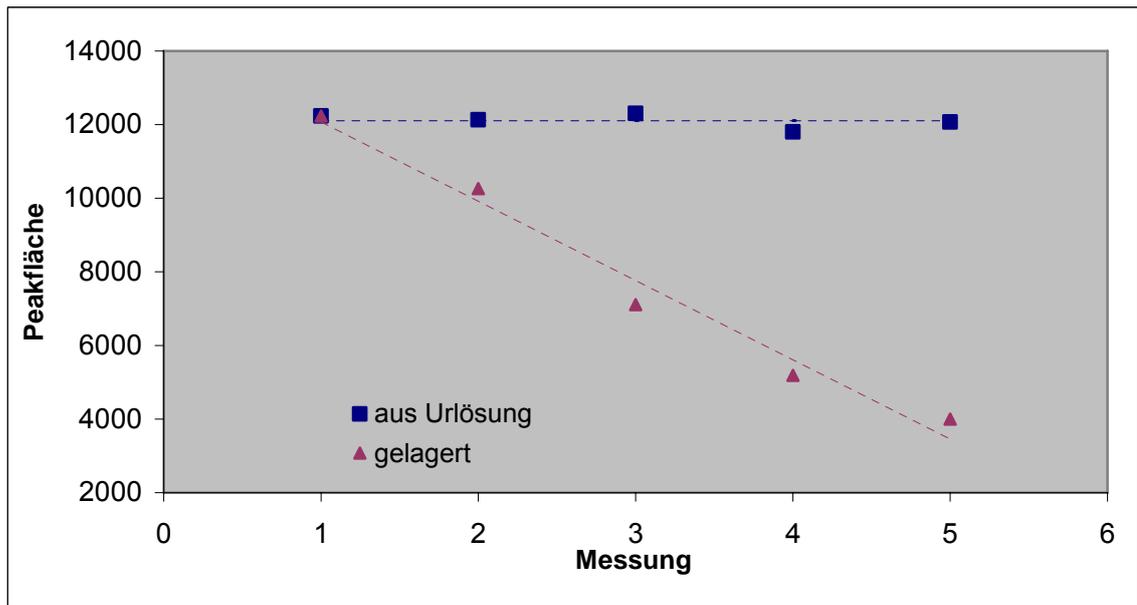
Zu diesem Zweck wurden Lösungen für HDA von 200 pg/ $\mu$ L, 1 ng/ $\mu$ L und 10 ng/ $\mu$ L hergestellt. Die Messungen erfolgten mittels GC-MS und die Dauer der Untersuchung betrug 3 Tage. Es stellte sich anhand der kleiner werdenden PFV heraus, dass sich HDA in den Lösungen mit den Konzentrationen 200 pg/ $\mu$ L und 1 ng/ $\mu$ L abbaute, während es in der Lösung mit einer Konzentration von 10 ng/ $\mu$ L stabil blieb (vgl. Tab-A 25). Auf gleiche Weise erfolgte die Überprüfung der Stabilität von ODA. Bei ODA zeigte sich eine Stabilität erst ab einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ L (vgl. Tab-A 26). Da der Abbau nur über einen begrenzten Zeitraum von 3 Tagen beobachtet wurde, können keine Aussagen getroffen werden, wie lange die Lösungen haltbar sind. Sie sollten daher immer direkt vor ihrem Einsatz hergestellt werden

#### 4.2.4.2 Stabilitätsuntersuchungen für die Iodlactone

Da sich bereits bei den Iodaldehyden eine Instabilität der Substanzen unter Lichteinfluss zeigte und die Iodlactone diesen in ihrer Struktur ähneln, wurden die äußeren Bedingungen für die Lagerung der Iodlactone übernommen. Ebenso wie 2-IHDA und 2-IODA wurden die Synthesestandards der Iodlactone unter Lichtausschluss bei -18 °C im Gefrierschrank gelagert. Rückschlüsse auf die Lösungsstabilität konnten jedoch nicht gezogen werden, so dass diese ebenfalls untersucht wurde.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden anhand von AA- $\delta$ -IL durchgeführt und auf EPA- $\delta$ -IL und DHA- $\gamma$ -IL übertragen. Zur besseren Handhabung des Iodlactonstandards wurde dieser aufgrund seiner öligen Konsistenz in Methanol gelöst und wies eine Konzentration von 22,10  $\mu$ g/ $\mu$ L auf. Von diesem Urstandard wurden zwei weitere Verdünnungen ( $c_1 = 110,50$  ng/ $\mu$ L und  $c_2 = 6,0775$  ng/ $\mu$ L) hergestellt, wobei Letztere zur Herstellung der Kalibrierstufen in einem Konzentrationsbereich von 30 pg/ $\mu$ L - 500 pg/ $\mu$ L diente. Der Versuchsplan beinhaltete dabei, dass zum Einen die Stabilität der Urlösung

betrachtet wurde, indem über einen Zeitraum von 15 Tagen immer neue Verdünnungslösungen hergestellt wurden und zum Anderen, dass die aufbewahrte Verdünnungslösung (c2) über den definierten Zeitraum bezüglich ihrer Stabilität untersucht wurde. Die Gegenüberstellung der Peakflächen als Maß der Lösungsstabilität erfolgte anhand der Kalibrierstufe mit einer Konzentration von 100 pg/ $\mu$ L, welche mittels LC-MS/MS vermessen wurde. Die dargestellte Abb. 56 zeigt die Lösungsstabilität von AA- $\delta$ -IL in Abhängigkeit der Konzentration (Messdaten siehe Anhang Tab-A 27).



**Abb. 56: Lösungsstabilität von AA- $\delta$ -IL**

(gelagert = gelagerte Verdünnungslösung (c2), aus Urlösung = aus Urlösung am Tag der Messung neu hergestellte Lösung)

Anhand der Graphik verdeutlicht sich, dass die verdünnte Lösung ( $c_2 = 6,08 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) einem stetigen Abbau unterlag und auch unter den optimierten Lagerbedingungen nicht stabil war. Im Gegensatz dazu schien die Urlösung ( $c = 22,10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) keiner Zersetzung zu unterliegen. Bestätigt wurde diese Annahme wiederum durch eine Trendanalyse nach Neumann, die für die verdünnte Lösung einen eindeutigen Trend aufzeigte, während dies bei der gelagerten Urlösung nicht der Fall war ( Tab. 33).

**Tab. 33: Trendtest nach Neumann für die Lagerstabilität von AA- $\delta$ -IL**

	<b>Prüfwert</b>	<b>Tabellenwert (P =0,95; n = 5)</b>	<b>Trend</b>
Urlösung	2,396	0,8204	nein
Verdünnungslösung c2	0,399		ja

Als Schlussfolgerung dieser Untersuchungen bleibt festzustellen, dass die Stabilität der Analyte konzentrationsabhängig ist, und dass für eine gleich bleibende Qualität der verwendeten Lösungen eine ständige Neuherstellung der Verdünnungslösungen unabdingbar ist. Dieser Fakt konnte sowohl für die Iodlactone als auch für die Iodaldehyde belegt werden.

#### 4.2.5 Bestimmung der Reinheit der Iodlipide

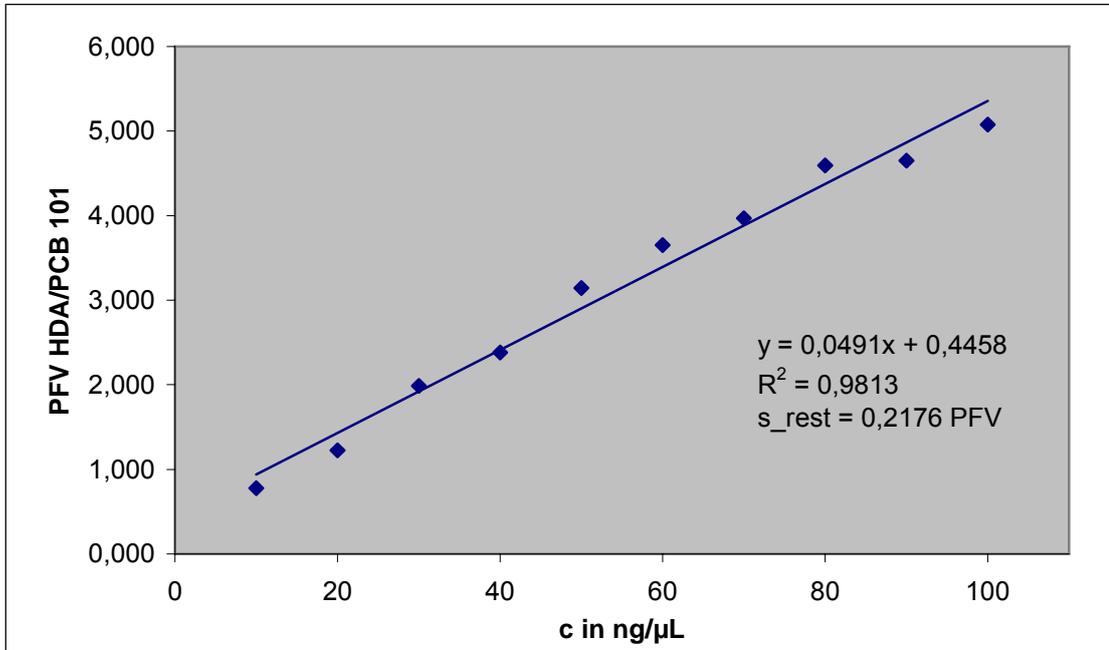
Da die Standards selbst synthetisiert wurden, und diese zur Quantifizierung der Analyte in den biologischen Proben herangezogen werden sollten, musste zunächst die Reinheit der synthetisierten Standards bestimmt werden. Erste Indizien für die Reinheit der Standards lieferten die NMR-Spektren, die durch Verunreinigungen > 5 % zusätzliche Signale zeigen würden. Im Rahmen der Iodlacton-Herstellung konnte beobachtet werden, dass diese Synthesen nur mit geringeren Ausbeuten der Standards durchzuführen waren. Aus diesem Grund wurde das Aufreinigungsverfahren, welches bereits in Abschnitt 4.2.3.2 (Seite 84) beschrieben wurde, angewendet, so dass anschließend Standards mit einer Reinheit größer 95 % erhalten wurden.

Durch die optimierte Synthese der Iodaldehyde wurden Reaktionsansätze mit deutlich höherer Ausbeute erzielt. Aus diesem Grund wurde hierbei auf eine zeitaufwendige Aufreinigung verzichtet und die Reinheit verschiedenartig bestimmt. Zur Bestimmung der Iodaldehydkonzentration im Syntheseprodukt wurde zum Einen der nicht umgesetzte Aldehyd und zum Anderen das nicht verbrauchte Iod herangezogen. Die dazu verwendeten Methoden sind in den nachfolgenden Abschnitten 4.2.5.1 und 4.2.5.2 näher erläutert.

##### 4.2.5.1 Reinheitsbestimmung mittels GC-MS

Unter der Bedingung, dass bei der Iodierung des Aldehyds keine weiteren Nebenprodukte entstehen, können aus der nicht umgesetzten Menge an Aldehyd Rückschlüsse bezüglich der Reinheit des Syntheseproduktes gezogen werden. Die Quantifizierung des Aldehyd-Rückstandes erfolgte mittels GC-MS, indem Kalibrierreihen für HDA bzw. ODA in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 100 ng/ $\mu$ L aufgenommen wurden.

Zum Ausgleich von Messunsicherheiten wurde der interne Standard PCB 101 in einer Konzentration von 10,2 ng/μL zu jeder Kalibrierstufe hinzugefügt. Zur Erstellung der Kalibrierfunktion wurde das Peakflächenverhältnis von Aldehyd/PCB 101 gegen die Konzentration aufgetragen und mittels linearer Regression die Gleichung ermittelt (vgl. Abb. 57; Messwerte siehe Tab-A 28).



**Abb. 57: Kalibrierung HDA (SIM)**

Die Konzentration des Produktgemisches von 2-IHDA und HDA bzw. 2-IODA und ODA zur Bestimmung des Aldehyd-Restgehaltes betrug ca. 200 ng/μL (abhängig von der Einwaage). Anhand der detektierten Peakflächen bzw. der ermittelten Peakflächenverhältnisse (HDA/PCB 101 bzw. ODA/PCB 101) wurden die Konzentrationen an HDA bzw. ODA in ng/μL berechnet.

Entsprechend der Formel

$$\text{Reinheit [\%]} = 100 \% - \frac{c_1}{c_2} * 100 \%$$

mit  $c_1$  ermittelte Konzentration von HDA bzw. ODA in ng/μL  
 $c_2$  Einwaagen-abhängige Konzentration des Gemisches in ng/μL

konnte anschließend die Reinheit bzw. der prozentuale Massenanteil des Analyten im Produktgemisch ermittelt werden. Die für die einzelnen Chargen ermittelten Reinheiten der Syntheseprodukte sind in der nachstehenden Tab. 34 aufgelistet (vgl. Tab-A 29 und Tab-A 30).

**Tab. 34: Reinheiten der synthetisierten Chargen**

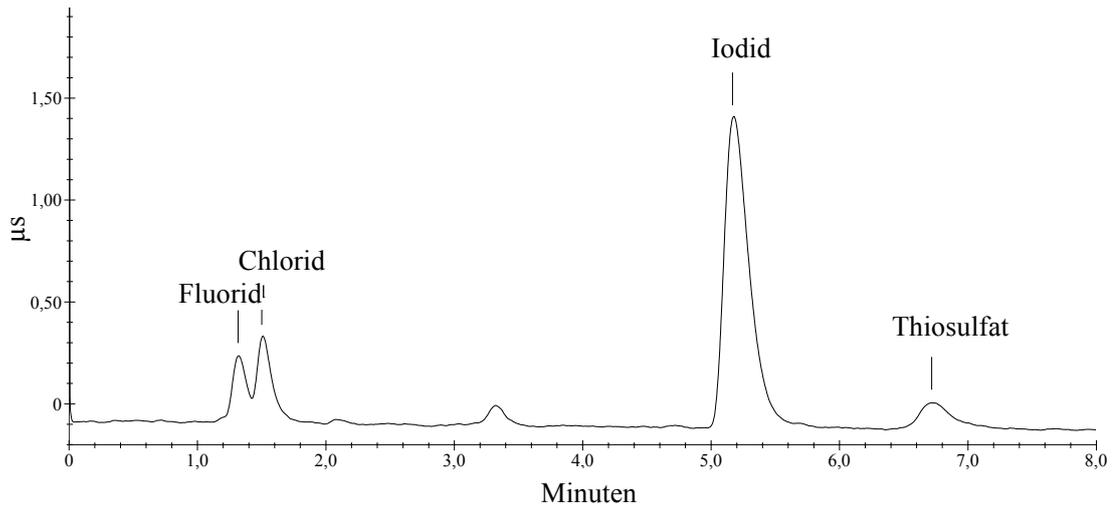
Charge	Reinheit [%]	
	IHDA	IODA
1	94,6	88,6
2	92,3	83,9
3	92,4	82,4
4	93,3	85,1

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand der optimierten Synthese 2-IHDA mit einer Reinheit größer 90,6 % und 2-IODA mit einer Ausbeute größer 78,8 % hergestellt wurden. Für jede neu synthetisierte Charge muss jedoch die Reinheit erneut bestimmt werden, damit diese bei der Quantifizierung der Analyte in den biologischen Proben berücksichtigt werden kann.

#### 4.2.5.2 Reinheitsbestimmung mittels Ionenchromatographie

Die zweite Variante zur Bestimmung der Produktreinheit stellte die Quantifizierung des nicht umgesetzten Iods dar. Hierbei wurde ausgenutzt, dass das durch die Iodierung entstandene Iodid durch Quecksilber-(II)-chlorid abgefangen wurde (vgl. Abb. 19, Seite 48). Der entstandene orange Niederschlag konnte daraufhin abfiltriert werden, während das unverbrauchte Iod durch Nachspülen des Filters mit Dichlormethan in der flüssigen Phase verblieb. Beim Waschen des Filtrates mit Natriumthiosulfat wurde das Iod zu Iodid reduziert und befand sich anschließend in der wässrigen Phase. Für die quantitative Bestimmung wurde die wässrige Phase in einen 25-mL-Maßkolben überführt und mit Eluent aufgefüllt (Arbeitsbedingungen siehe Tab. 17, Seite 47). Die Probelösung wurde mit dem IC-Elutionsmittel verdünnt (1 : 100) und der Ionenchromatographie zugeführt.

Die Gehaltsberechnung des jeweiligen Iodaldehyds erfolgte anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibrierung für Iodid, wobei der Überschuss an zugesetztem Iod berücksichtigt wurde (Messwerte und Berechnung siehe Anhang Tab-A 31 und Tab-A 32). Die Abb. 58 zeigt das Chromatogramm der IC mit einer Retentionszeit von 5,2 min für Iodid und 6,8 min für Thiosulfat.



**Abb. 58: Chromatogramm einer ionenchromatographischen Messung von Iodid**

Bei dieser Methode wurden Reinheiten von über 100 % errechnet, die jedoch nicht reproduzierbar waren.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass diese Methode nicht zur Bestimmung der Reinheit geeignet ist. Eine mögliche Ursache für die Überbefunde ist im Sublimationsverhalten von Iod zu sehen. Bereits bei Raumtemperatur geht dieses direkt vom festen Aggregatzustand in den gasförmigen über, so dass bei der Aufarbeitung (z.B. Waschen des Filtrerrückstandes) Verluste von Iod auftreten können, die ein falsch positives Ergebnis hervorrufen.

#### 4.2.6 Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-Methode

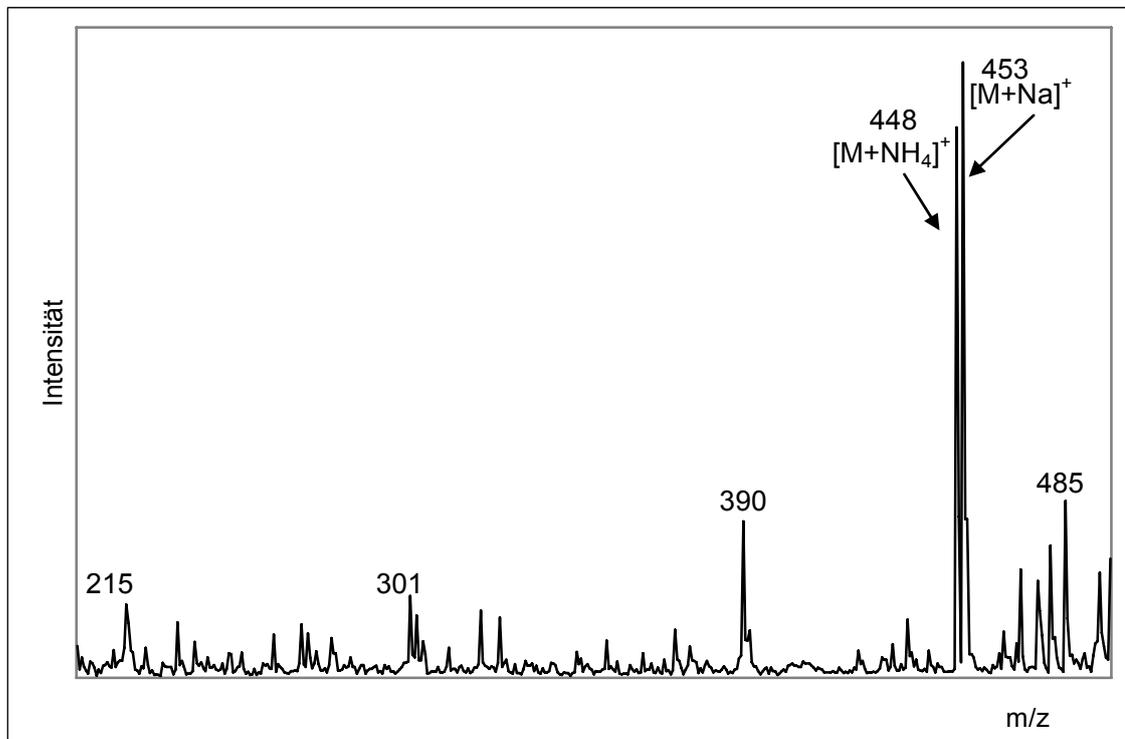
Anhand vorangegangener Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass 1 ng/ $\mu$ L von 2-IHDA ein um Faktor 100 stärkeres Signal am GC-ECD generierte als die gleiche Konzentration von AA- $\delta$ -IL. Eine mögliche Ursache stellt dabei die geringere Flüchtigkeit der Iodlactone bedingt durch die Molekülstruktur dar. Aufgrund der verminderten Gaschromatographierbarkeit und dem zu erwartenden Konzentrationsbereich in den biologischen Proben konnte somit eine gaschromatographische Methode zum Nachweis der Iodlactone ausgeschlossen werden. Als Alternative sollte daher eine flüssigchromatographische Methode entwickelt werden. In den folgenden Abschnitten 4.2.6.1 und 4.2.6.2 werden die verschiedenen Optimierungsversuche bezüglich der MS/MS- als auch der LC-Methode näher erläutert.

##### 4.2.6.1 Optimierung der MS/MS-Parameter

Der selektive Nachweis der Iodlipide mittels LC-MS/MS sollte im MRM-Modus durchgeführt werden. Bei diesem Modus wird im Q1 des Triple-Quadrupols zunächst

ein definiertes Masse-Ladungs-Verhältnis separiert, in Q2 fragmentiert und in Q3 wieder selektiv Fragmentationen abgetrennt. Eine grundlegende Bedingung dafür ist, dass die charakteristischen Fragmente zunächst bestimmt werden und die Ionisation reproduzierbar gestaltet werden kann. Des Weiteren müssen für eine maximale Signalintensität die verschiedenen Fokussierungs- und Beschleunigungsspannungen optimiert werden. Mit Hilfe der Gerätesoftware *Analyst* des Massenspektrometers API 2000 kann dies automatisch durchgeführt werden.

Zunächst wird eine Analytlösung kontinuierlich über die eingebaute Spritzenpumpe in die Ionenquelle infundiert, während Q1 alle bestehenden Ionen trennt, Q2 und Q3 fokussieren und den Ionenstrom weiterleiten und der Multiplier diese registriert (Q1-Scan siehe Abb. 59).



**Abb. 59: Q1-Scan von AA- $\delta$ -IL**

Nach dem Festlegen des Molekül-Ions bzw. Quasi-Molekülions ( $M \pm H$ ) wird dieses mittels Produktionen-Scan durch Q1 separiert, in Q2 fragmentiert, während Q3 alle entstehenden Fragmente nach Masse-Ladungsverhältnis trennt und an den Detektor weiterleitet. Bei der Auswahl des Mutterions muss allerdings bedacht werden, dass durch verschiedene Matrix- bzw. Lösemiteleinflüsse auch Addukte des Analyten mit z. B. Ammonium oder Natrium gebildet werden können, die dann als Ausgangsion fungieren (vgl. Abb. 35, Seite 68).

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Bildung der Addukte einer Gleichgewichtsreaktion unterliegt und von den jeweilig vorherrschenden Matrixbestandteilen abhängt. Um die dabei entstehenden Intensitätsschwankungen zu verhindern, können dem Laufmittel der HPLC verschiedene Modifier, z.B. Ammoniumformiat, zugesetzt werden, um das Gleichgewicht in Richtung des Adduktes zu verschieben (näher erläutert in Abschnitt 4.2.6.2, Seite 107).

Nach Auswahl der charakteristischen Ionen für den jeweiligen Analyten wurden mittels der geräteinternen Software die optimalen Fokussierungs- und Beschleunigungsspannungen ermittelt, so dass eine maximale Signalintensität erzielt wurde. Diese Optimierungsversuche wurden sowohl für den positiven als auch negativen Ionisationsmodus durchgeführt. Die folgende Tab. 35 zeigt die Parameter der zu optimierenden Einstellungen des Massenspektrometers.

**Tab. 35: Parameter zur Optimierung der MS-Einstellung**

<b>Parameter</b>	<b>positive Ionisierung</b>	<b>negative Ionisierung</b>
<i>Curtain Gas</i> (CUR) in kPa	20; 30; 40	20; 30; 40
<i>Ion Source Gas 1</i> (GS1) in kPa	30; 40; 50; 60	30; 40; 50; 60
<i>Ion Source Gas 2</i> (GS2) in kPa	15; 20; 25	15; 20; 25
<i>Collision Gas</i> (CAD) in kPa	6; 7; 8; 10; 12	6; 7; 8; 10; 12
<i>Declustering Potential</i> (DP) in V	10; 15; 20; 25; 30	-10; -15; -20; -25; -30
<i>Focusing Potential</i> (FP) in V	250; 300; 350; 400	-250; -300; -350; -400
<i>Entrance Potential</i> (EP) in V	5; 8; 10; 12	-5; -8; -10; -12
<i>Collision Cell Entrance Potential</i> (CEP) in V	15; 20; 25; 30	-15; -20; -25; -30
<i>Collision Energy</i> (CE) in V	10; 15; 20; 25; 30	-10; -15; -20; -25; -30
<i>Collision Cell Exit Potential</i> (CXP) in V	2; 3; 4; 5	-2; -3; -4; -5

Auf diese Weise wurden für alle Analyte die geeigneten Parameter (Spannungen im Verlauf des Ionenpfades) ermittelt und in einer gemeinsamen Multimethode zusammengefasst (vgl. Tab. 14, Tab. 15 und Tab. 16, Seite 46 und 47). Die Ionenquellen der LC-MS/MS erlauben sowohl eine positive als auch eine negative Ionisation in einer Messung, wobei der geeignete Modus von der Struktur der Analyte und den Bedingungen abhängt. Bei den Iodlactonen zeigte sich, dass der positive Ionisierungsmodus die besten Ergebnisse bezüglich der Signalintensität lieferte, während die negative Ionisie-

rung lediglich ein charakteristisches Tochterion hervorbrachte. Um aber die Sicherheit der qualitativen Aussage zu erhöhen, sollte neben dem Quantifier auch mindestens ein Qualifier gemessen werden. Das Verhältnis der Peakflächen dieser Fragmente dient dabei als Qualitätskriterium. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Ammoniumaddukte der Iodlactone einen intensiveren zweiten Übergang als die Natriumaddukte erzeugten, so dass dieser auch bei geringeren Konzentrationen als Qualitätsmerkmal herangezogen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten die Iodaldehyde lediglich im Negativ-Modus ionisiert werden, wobei auch hier der zweite, charakteristische Übergang fehlte. Aufgrund dieser Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass die Iodaldehyde nicht eindeutig über eine LC-MS/MS-Methode quantifizierbar sind, sich lediglich qualitative Aussagen treffen lassen und die vorher beschriebene GC-MS- bzw. GC-ECD-Methode für diese Analyte besser geeignet ist.

Letztendlich scheint ein paralleler Nachweis der beiden Analytgruppen aufgrund der strukturellen bzw. chemisch-physikalischen Eigenschaften mit den verwendeten Analysengeräten nicht möglich zu sein.

#### **4.2.6.2 Eluentenoptimierung**

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, ist es möglich durch Zusatz von Modifiern zum HPLC-Laufmittel das Gleichgewicht in Richtung eines bestimmten Adduktes zu verschieben, die Ionisierung zu begünstigen und Intensitätsschwankungen auszugleichen. Da sich die Iodaldehyde mittels LC-MS/MS nicht eindeutig analysieren ließen, beziehen sich die nachfolgenden Optimierungsversuche des Elutionsmittels ausschließlich auf die Iodlactone mit dem Ziel eine möglichst hohe Signalintensität zu erreichen, um auch geringe Konzentrationen in den biologischen Proben nachweisen zu können.

Die ersten allgemeinen Optimierungen betraf das Laufmittel an sich. Hierbei wurde anhand eines Mixes, bestehend aus je 2 ng/μL AA-δ-IL, DHA-γ-IL und EPA-δ-IL, die Trenneffizienz von unterschiedlichen Laufmittelzusammensetzungen getestet (siehe Tab. 36). Zwar ist es nicht unbedingt erforderlich, dass für eine LC-MS/MS-Messung die Analyte voneinander chromatographisch getrennt werden, aber da nur eine begrenzte Oberfläche als Ladungsträger in der Ionisierungsquelle vorliegt, kann es bei zu hohen Analytgehalten zu Konkurrenzreaktionen um die Tröpfchenoberfläche zwischen den Analyten kommen, so dass unter Umständen nicht alle Moleküle ionisiert werden können und falsch negative Ergebnisse generiert werden. Es wurde versucht die Analyte

soweit chromatographisch aufzutrennen, dass diese Konkurrenzreaktionen weitgehend vermieden werden können (Messdaten siehe Anhang Tab-A 33).

Als Maß für die Trennleistung des Systems dient die Auflösung zweier benachbarter Analytpeaks gemäß der Formel:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

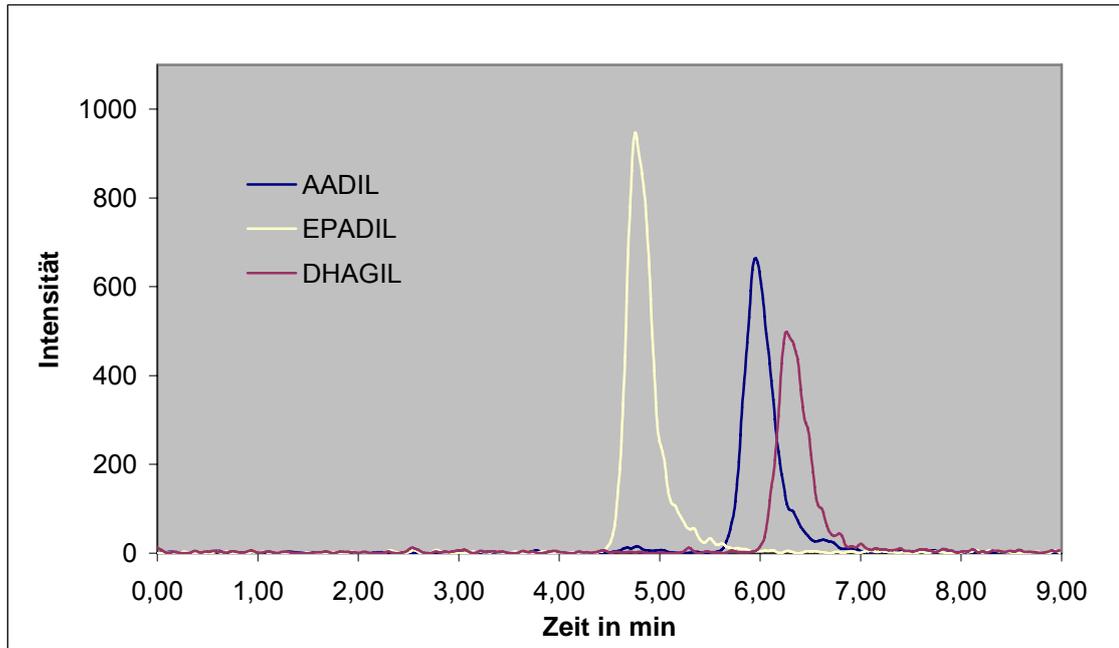
mit  $t_{R,i}$  - Retentionszeit der Substanz i in min

$w_{b,i}$  - Basispeakbreite der Substanz i in min

**Tab. 36: Auflösung der Analytpeaks in Abhängigkeit der Laufmittelzusammensetzung**

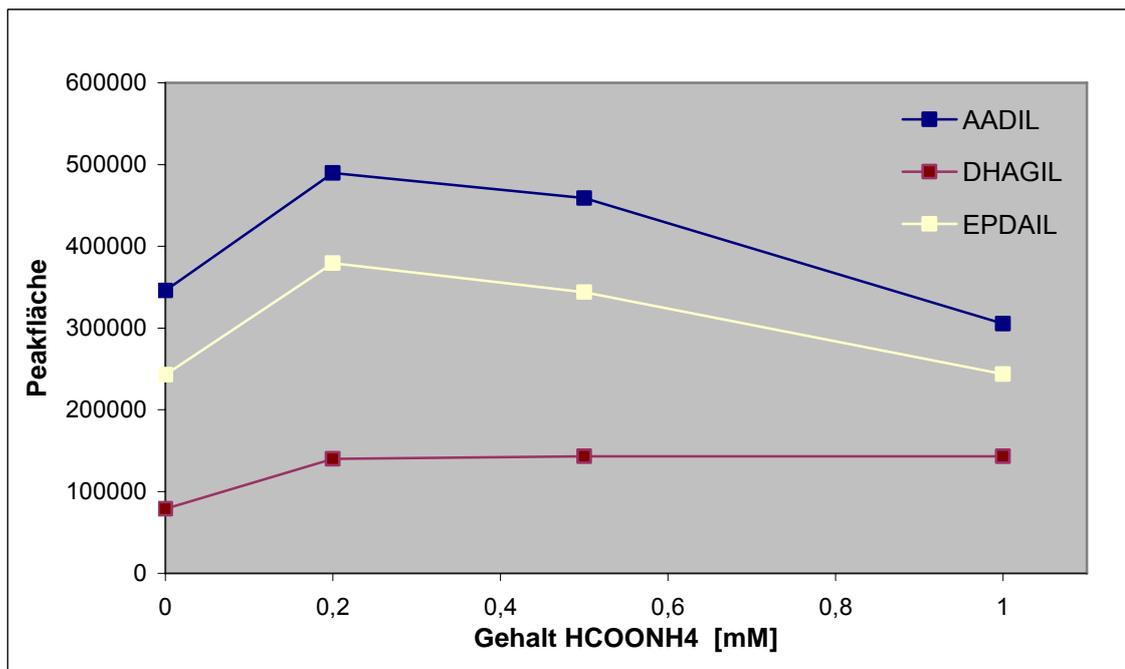
Laufmittelzusammensetzung	$R_{AA/EPA}$	$R_{AA/DHA}$	$R_{EPA/DHA}$
Methanol (100 %)	0,50	0,09	0,30
Methanol/ H <sub>2</sub> O (95/5, v/v)	1,09	0,12	1,14
Methanol/ H <sub>2</sub> O (90/10, v/v)	2,29	0,68	2,99

Wird bei diesem Verfahren ein Wert  $> 1,5$  erzielt, spricht man von einer Basislinientrennung der Substanzpeaks. Eine weitere Erhöhung des Wasseranteils (bis 20 %) führte zu einer maßgeblichen Verlängerung der Messdauer (Retentionszeiten  $> 20$  min), was aufgrund der Instabilität der verdünnten Analytlösungen sich hätte negativ auswirken können, so dass in Anbetracht der nicht erforderlichen Basislinientrennung und Messdauer eine Lösemittelzusammensetzung von Methanol/ H<sub>2</sub>O (90/10, v/v) als optimal angesehen wurde. Die folgende Abb. 60 zeigt ein Chromatogramm bei entsprechend gewählter Laufmittelmischung.



**Abb. 60:** LC-Chromatogramm bei Laufmittel Methanol/H<sub>2</sub>O (90/10, v/v)

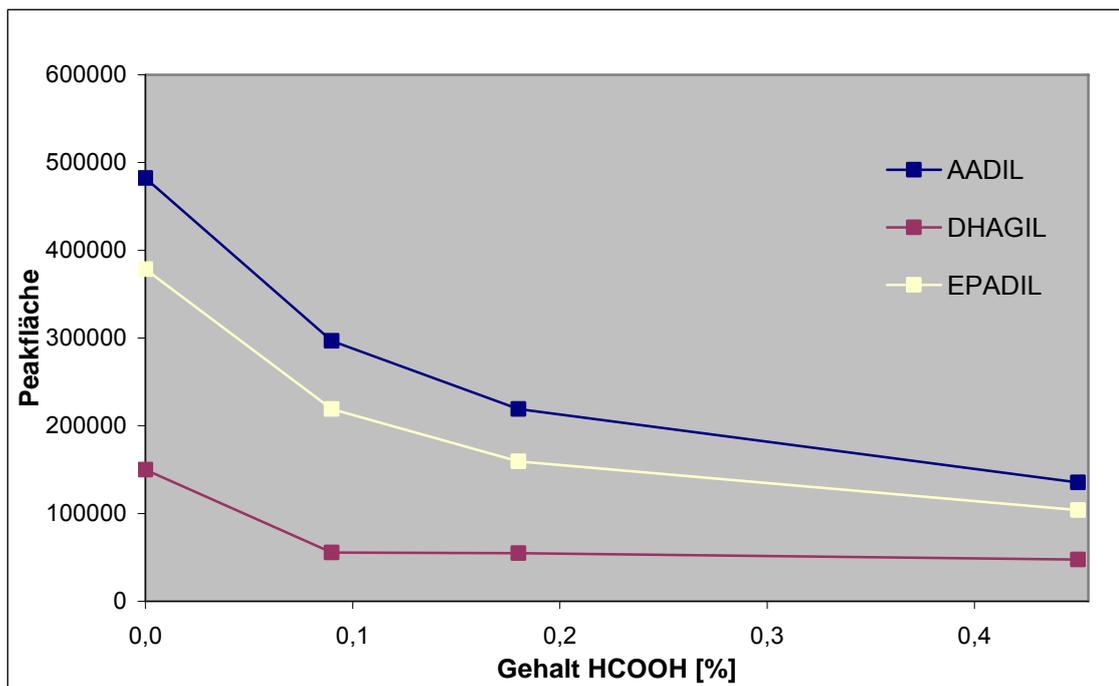
Im nächsten Schritt wurde nacheinander der Einfluss verschiedener Zusätze zum Laufmittel auf die Signalintensität untersucht. Durch Zusatz von Ammoniumformiat in Konzentrationen von 2 mM bis 10 mM zur wässrigen Phase erhielt man dabei eine Absolutkonzentration von 0,2 mM bis 1 mM im Gesamtlaufmittel. In Abb. 61 ist der Zusammenhang zwischen der Ammoniumformiatkonzentration und der Peakfläche ersichtlich.



**Abb. 61:** Einfluss eines Ammoniumformiat-Zusatzes auf die Signalintensität

Bei allen charakteristischen Fragmentationen ist zu erkennen, dass durch eine Zugabe von Ammoniumformiat im Laufmittel eine Intensitätssteigerung auftritt. Beispielsweise bei AADIL (Fragmentation  $m/z = 303$ ) wird durch den Zusatz von 0,2 mM Ammoniumformiat eine Peakflächenvergrößerung von 44 % erreicht. Ferner konnte beobachtet werden, dass durch weiteres Erhöhen der Ammoniumformiatkonzentration es wieder zu einem Abfall der Peakflächen kommt (vgl. Tab-A 34).

Ein weiteres probates Mittel in der LC-MS/MS zur Intensitätssteigerung der Signale ist der Zusatz von Ameisensäure zum Laufmittel. Der Zusatz soll die Ionisierbarkeit der Analyte steigern und ihnen den Übergang von der flüssigen Phase in den Dampfraum erleichtern. Im nachstehenden Versuch wurden variierende Gehalte von Ameisensäure der methanolischen Phase zugesetzt und deren Wirkung auf die Signalintensität bzw. die Peakflächen untersucht (siehe Abb. 62). Die Konzentration von Ammoniumformiat wurde konstant gehalten (0,2 mM absolut). Die dazugehörigen Messdaten befinden sich im Anhang Tab-A 35.



**Abb. 62: Einfluss eines Ameisensäure-Zusatzes auf die Signalintensität**

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, kam es durch den Zusatz von Ameisensäure nicht zu einer Intensivierung der Analytsignale, sondern zu einer stetigen Abnahme je höher der Ameisensäure-Gehalt wurde. Eine mögliche Ursache stellt dabei die Säurelabilität der Iodlactone dar. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der Lactonring unter Säurezusatz öffnet und die entsprechende Säure entsteht [86]. Des Weiteren stellt die C-I-

Bindung einen möglichen Angriffspunkt für die Säure dar. Aufgrund der Atomgröße von Iod stellt dieses eine gute Abgangsgruppe dar. Möglicherweise wird Iod im Lacton durch das Proton der Säure verdrängt. Beide Reaktionen würden dazu führen, dass die Peakfläche sinkt, da die voreingestellte Fragmentierung nicht mehr stattfinden kann. Anhand dieser Ergebnisse wurde auf einen Zusatz von Ameisensäure verzichtet.

Durch die hier aufgeführten Untersuchungen wurde ein Elutionsmittel von Methanol und Wasser im Verhältnis 9 : 1 mit einem Ammoniumformiatgehalt von 0,2 mM im Laufmittel als optimal angesehen und für die weiteren Messungen verwendet.

#### 4.2.7 Quantifizierung der Iodaldehyde und Iodlactone

Um eine quantitative Aussage für die Analyte in den biologischen Proben treffen zu können, ist es notwendig zunächst sicherzustellen, dass die verwendeten Methoden bzw. Analysengeräte für den Nachweis der Analyte geeignet sind. Zum Einen spielt dabei die Spezifität des Messverfahren eine tragende Rolle, d.h. ob eine Unterscheidung zwischen den Analyten und der Matrix möglich ist, um falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Zum Anderen ist es unabdingbar, festzustellen, ob die entsprechenden Analysengeräte das erforderliche Nachweisvermögen für die ausgewählten Analyte besitzen.

Während die massenspektrometrischen Nachweisverfahren (GC-MS und LC-MS/MS) durch die Detektion ausgewählter Massenspuren bzw. Fragmentionen eine sehr hohe Spezifität besitzen, sind die anderen Detektionsarten (UV, ECD) relativ unspezifisch, da sie nicht nur analytspezifische Eigenschaften registrieren, d.h. eine Unterscheidung zwischen Analyt und Matrix ist zum Teil nur anhand der Retentionszeit möglich.

Der Aspekt des Nachweisvermögens richtet sich nach der Fragestellung bzw. nach dem Erwartungsbereich für die entsprechenden Analyte. Hierbei spielt es eine Rolle, ob die Analyte beispielsweise als Minor- oder Majorkomponenten in der Matrix vorliegen. Für die in dieser Arbeit untersuchten Analyte besagt die Literatur, dass zum Beispiel bei einer Konzentration von 0,8  $\mu\text{M}$  AA- $\delta$ -IL eine vollständige Inhibierung der EGF-induzierten Proliferation beobachtet werden konnte [14]. Dies würde unter Berücksichtigung der molaren Masse von 430 g/mol einer Konzentration von 344 pg/ $\mu\text{L}$  entsprechen. Im Gegensatz dazu erfordert die vollständige Inhibierung der NADPH-Oxidase 20  $\mu\text{M}$  2-IHDA (entspricht 7,32 ng/ $\mu\text{L}$ ) [9].

#### 4.2.7.1 Nachweisgrenzen der Analyte

Mit abnehmendem Gehalt eines Analysenprobenbestandteils steigt der Einfluss zufälliger Abweichungen. Um dennoch Analysenergebnisse von zufriedenstellender relativer Präzision zu erzielen und Gehalte in der Analysenprobe von denen einer Leerprobe zu unterscheiden, ist es notwendig die Nachweisgrenze und Erfassungsgrenze zu bestimmen. Die hier verwendete DIN 32645 beschreibt dafür zwei verschiedene Methoden. Bei der direkten Methode (Leerwertmethode) werden die Nachweis- und Erfassungsgrenzen anhand der Unsicherheit der Leerwerte berechnet. Als Leerprobe sollte unter Idealbedingung eine Probe gleicher Zusammensetzung wie die Analysenprobe mit Ausnahme der zu untersuchenden Komponente verwendet werden. Da aber gerade bei biologischen Proben dies nicht immer zu realisieren ist, schlägt die DIN 32645 eine zweite, die indirekte Methode nach dem Kalibrierkurvenmodell vor. Hierbei wird die Unsicherheit des Leerwertes über die Extrapolation der Regressionsdaten einer Kalibriergeraden ermittelt [85, 87].

Während die Nachweisgrenze nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein eines Bestandteils liefert, beschreibt die Erfassungsgrenze den kleinsten Gehalt, der mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit angegeben werden kann.

Mathematisch berechnet sich die Nachweisgrenze wie folgt:

$$x_{NG} = \frac{s_L}{b} * t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}} \quad \text{Leerwertmodell}$$

$$x_{NG} = s_{x0} * t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad \text{Kalibrierkurvenmodell}$$

mit	$x_{NG}$	Nachweisgrenze
	$s_L$	Standardabweichung der Messwerte der Leerprobe
	$s_{x0}$	Verfahrensstandardabweichung
	$t_{f;\alpha}$	Quantil der t-Verteilung ( $f = n-2$ ; $\alpha = 0,05$ )
	$m$	Anzahl der Messungen an der Analysenprobe
	$n$	Anzahl der Parallelbestimmungen
	$\bar{x}$	Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben
	$Q_x$	Summe der Abweichungsquadrate bei der Kalibrierung

Unter der Bedingung, dass die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art (Signifikanzniveau  $\alpha$ ) gleich der Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art ( $\beta$ ) ist, kann die Erfassungsgrenze  $x_{EG}$  abgeschätzt werden nach:

$$x_{EG} = 2 * x_{NG}$$

Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden die in der folgenden Tab. 37 aufgeführten Konzentrationsbereiche mit mindestens 3 Parallelbestimmungen vermessen. Die verwendeten Konzentrationsbereiche wurden sowohl nach dem Nachweisvermögen des Analysengerätes, indem die kleinste detektierbare Konzentration zunächst empirisch bestimmt wurde, als auch nach dem Erwartungsbereich ausgewählt.

**Tab. 37: Konzentrationsbereiche zur Bestimmung der Nachweisgrenzen**

Messart	Zusatzangabe	Substanz	vermessene Konzentrationsbereiche
LC-MS/MS		AA- $\delta$ -IL	31,25 – 500 pg/ $\mu$ L
		DHA- $\gamma$ -IL	
		EPA- $\delta$ -IL	
GC-ECD	Flüssiginjektion	2-IHDA	100 – 600 pg/ $\mu$ L
		2-IODA	
	on-column	2-IHDA	20 – 200 pg/ $\mu$ L
		2-IODA	
GC-MS	Fullscan	2-IHDA	5 – 50 ng/ $\mu$ L
		2-IODA	
	SIM	2-IHDA	5 – 50 ng/ $\mu$ L
		2-IODA	
HPLC-UV	gelöst in Acetonitril	2-IHDA	1 – 6 ng/ $\mu$ L
		2-IODA	
	gelöst in Methanol	2-IHDA	0,5 – 5 ng/ $\mu$ L
		2-IODA	

Für die Iodlactone wurden aufgrund der schlechten Gaschromatographierbarkeit keine Nachweisgrenzen für GC-MS und GC-ECD bestimmt, da diese nur in Konzentrationen außerhalb des Erwartungsbereiches mittels GC bestimmbar waren. Des Weiteren wurde auf die Festlegung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die HPLC-UV-Messungen verzichtet, da die verwendete LC-MS/MS-Methode als selektivere bzw. sichere Detektion angesehen wurde.

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen der Iodaldehyde mittels LC-MS/MS wurde ebenfalls verworfen, da bei dieser Methode das zweite charakteristische Fragmention bereits bei der Methodenoptimierung nicht detektiert werden konnte und damit eine eindeutige Identifizierung nicht möglich war.

Die Tab. 38 zeigt die ermittelten Nachweisgrenzen und abgeschätzten Erfassungsgrenzen (nach Kalibrierkurvenmodell) für die untersuchten Analyte bei den durchgeführten Messverfahren (Messdaten und Kalibrierkurven siehe Anhang Tab-A 36 - Tab-A 49 und Abb-A 4 - Abb-A 18) .

**Tab. 38: Erzielte Nachweisgrenzen ( $x_{NG}$ ) und abgeschätzte Erfassungsgrenzen ( $x_{EG}$ )**

Messart	Zusatzangabe	Substanz	$x_{NG}$	$x_{EG}$
LC-MS/MS		AA- $\delta$ -IL	46,4 $\pm$ 24,9 pg/ $\mu$ L	92,8 $\pm$ 48,9 pg/ $\mu$ L
		DHA- $\gamma$ -IL	12,0 $\pm$ 8,9 pg/ $\mu$ L	23,9 $\pm$ 17,8 pg/ $\mu$ L
		EPA- $\delta$ -IL	46,6 $\pm$ 21,8 pg / $\mu$ L	93,2 $\pm$ 43,6 pg/ $\mu$ L
GC-ECD	Flüssig- injektion	2-IHDA	66,8 $\pm$ 19,4 pg/ $\mu$ L	133,6 $\pm$ 38,8 pg/ $\mu$ L
		2-IODA	93,5 $\pm$ 24,3 pg/ $\mu$ L	187,0 $\pm$ 48,6 pg/ $\mu$ L
	on-column	2-IHDA	29,5 $\pm$ 15,5 pg/ $\mu$ L	59,0 $\pm$ 31,0 pg/ $\mu$ L
		2-IODA	46,9 $\pm$ 16,3 pg/ $\mu$ L	93,8 $\pm$ 32,6 pg/ $\mu$ L
GC-MS	Fullscan	2-IHDA	4,81 $\pm$ 0,69 ng/ $\mu$ L	9,63 $\pm$ 1,38 ng/ $\mu$ L
		2-IODA	4,60 $\pm$ 0,47 ng/ $\mu$ L	9,21 $\pm$ 0,94 ng/ $\mu$ L
	SIM	2-IHDA	3,54 $\pm$ 0,93 ng/ $\mu$ L	7,08 $\pm$ 1,85 ng/ $\mu$ L
		2-IODA	4,08 $\pm$ 1,69 ng/ $\mu$ L	8,17 $\pm$ 3,39 ng/ $\mu$ L
HPLC-UV	gelöst in Acetonitril	2-IHDA	938 $\pm$ 101 pg/ $\mu$ L	1876 $\pm$ 202 pg/ $\mu$ L
		2-IODA	741 $\pm$ 45 pg/ $\mu$ L	1482 $\pm$ 90 pg/ $\mu$ L
	gelöst in Methanol	2-IHDA	378 $\pm$ 89 pg/ $\mu$ L	756 $\pm$ 178 pg/ $\mu$ L
		2-IODA	295 +/- 20 pg/ $\mu$ L	590 +/- 40 pg/ $\mu$ L

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die GC-MS-Messung eine nicht ausreichende Empfindlichkeit gegenüber den Analyten aufweist. Zwar könnten Gehalte im Bereich der maximalen Inhibierung der NADPH-Oxidase (7,32 ng/ $\mu$ L) noch nachgewiesen werden, aber den ermittelten Konzentrationen der Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze (geschätzt 3 \*  $x_{NG}$ ) nicht gerecht werden. Eine quantitative Aussage wäre demnach nicht möglich.

Die Ergebnisse der HPLC-UV-Messungen zeigen, dass durch die Wahl des geeigneten Lösemittels bei gleichen Messbedingungen niedrigere Nachweisgrenzen möglich sind. Allerdings stellt diese Methode im Vergleich zur GC-ECD-Messung ein um einen Faktor 10 unempfindlicheres Verfahren da, so dass sehr geringe Gehalte nicht detektierbar sind und diese Methode nur für die Screeninganalytik zu verwenden ist. Aufgrund dieser Tatsache und der Unselektivität des UV-Detektors bezüglich der Unterscheidung

von Analyt und Matrix im Vergleich zum Elektroneneinfangdetektor wurde entschieden, dass die weitere quantitative Bestimmung der Iodaldehyde in den biologischen Proben mittels GC-ECD erfolgen soll. Beim Vergleich der Probenaufgabetechnik konnten für die on-column-Technik geringere Nachweisgrenzen ermittelt werden, die jedoch eine stärkere Streuung der Messwerte zeigte. Eine mögliche Begründung dafür stellt die manuelle Injektion dar, die einen größeren zufälligen Fehler bedingt als eine automatisierte Flüssiginjektion mit Hilfe eines Autosamplers.

Im Rahmen der Nachweisgrenzenbestimmung für die Iodlactone mittels LC-MS/MS bleibt festzuhalten, dass durch diese Methode Gehalte im Erwartungsbereich beispielsweise für AA- $\delta$ -IL (344 pg/ $\mu$ L) sowohl nachgewiesen als auch bestimmt werden können. Bei einer Festlegung von  $x_{NG}$  nach dem Leerwertmodell konnten sogar noch geringere Konzentrationen errechnet werden (AA- $\delta$ -IL =  $4,36 \pm 2,38$  pg/ $\mu$ L; DHA- $\gamma$ -IL =  $3,81 \pm 1,40$  pg/ $\mu$ L und EPA- $\delta$ -IL =  $3,52 \pm 1,62$  pg/ $\mu$ L), da aber keine biologische Leerprobe zur Verfügung stand, sind vielmehr die Ergebnisse der indirekten Methode als richtig zu werten.

#### 4.2.7.2 Externe Kalibrierung

Wie aus den bisher aufgezeigten Ergebnissen zu entnehmen ist, sind unter den gegebenen Möglichkeiten die GC-ECD-Messung für die Iodaldehyde und die LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Iodlactone die Messverfahren der Wahl.

Für eine externe Kalibrierung werden Standardlösungen steigender Konzentrationen vermessen und der Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem gemessenen Detektorsignal in einer Kalibrierfunktion dargestellt. Dieses Verfahren ist die einfachste und zugleich am häufigsten eingesetzte Methode zur quantitativen Bestimmung eines Analytgehaltes bzw. einer Analytkonzentration. Sie wird bevorzugt, wenn viele Proben mit ähnlicher Matrix analysiert werden sollen und systematische Fehler (z.B. Verflüchtigung, Volumenfehler u.a.) vernachlässigbar klein sind. Eine Erweiterung dieser Methode ist die Verwendung einer externen Kalibrierung unter Zuhilfenahme eines internen Standards, der beispielsweise Dosierunsicherheiten und Messunsicherheiten durch Intensitätsschwankungen ausgleicht. Der Zusammenhang zwischen der ermittelten Peakfläche bzw. dem Peakflächenverhältnis und der Konzentration ist in Abb. 63 und Abb. 64 aufgezeigt (vgl. Anhang Tab-A 50 und Tab-A 51).

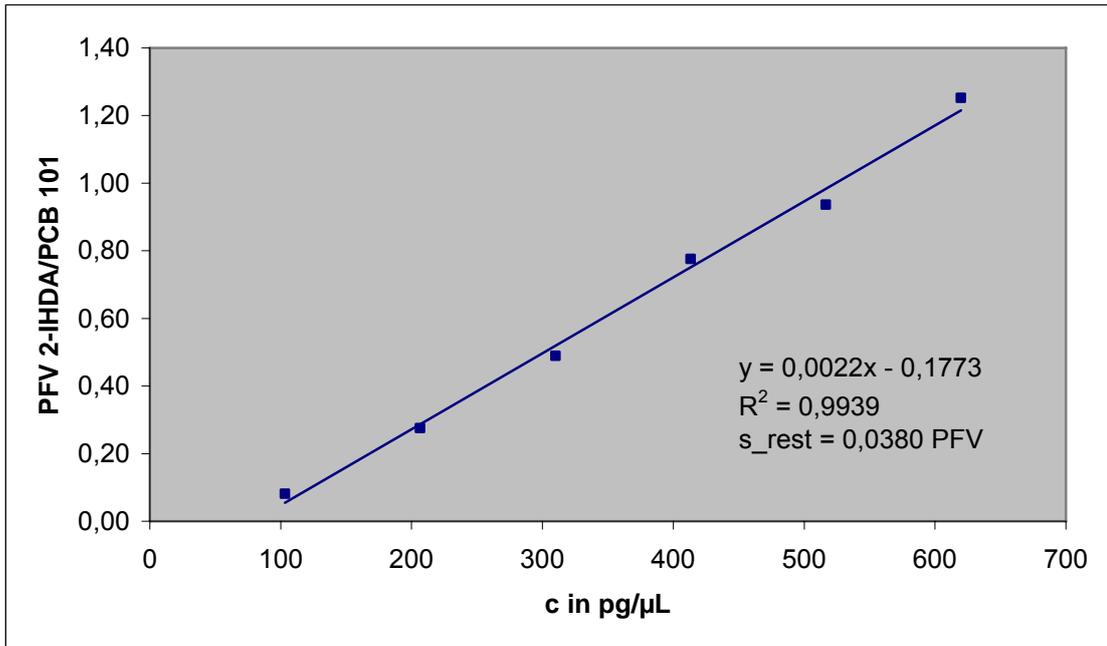


Abb. 63: Externe Kalibrierung von 2-IHDA mit internem Standard PCB 101 (GC-ECD)

Im Gegensatz zur GC-ECD-Messung wurde für die Iodlactonbestimmung mittels LC-MS/MS kein interner Standard verwendet. Zum Einen, da diese Methode eine höhere Spezifität aufweist und zum Anderen, weil kein geeigneter Standard zur Verfügung stand, der den Iodlactonen strukturell ähnlich war.

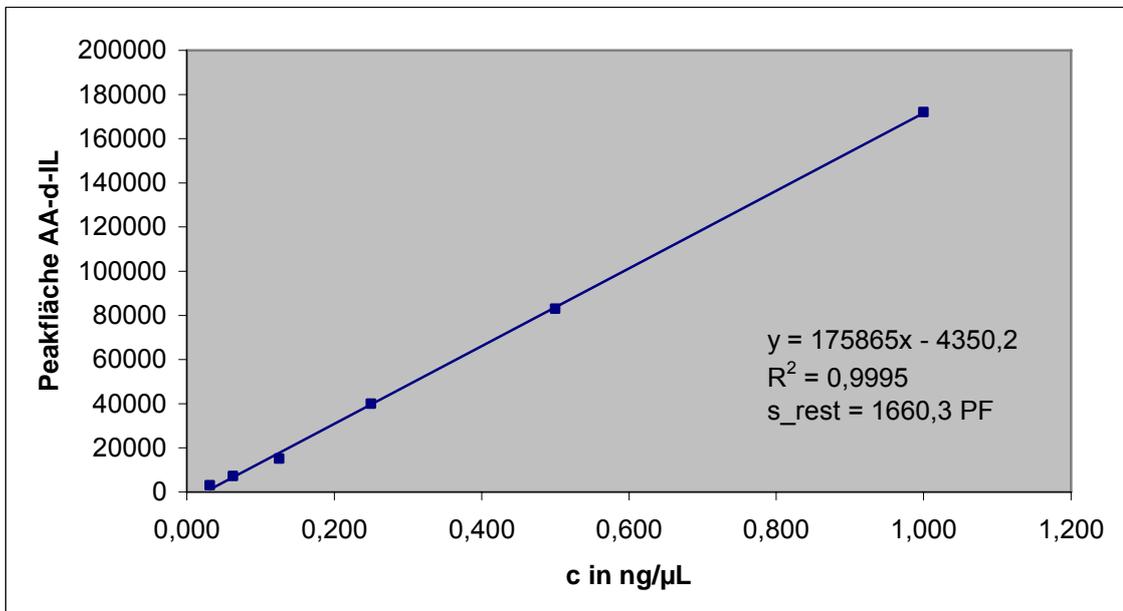


Abb. 64: Externe Kalibrierung von AA-δ-IL (LC-MS/MS)

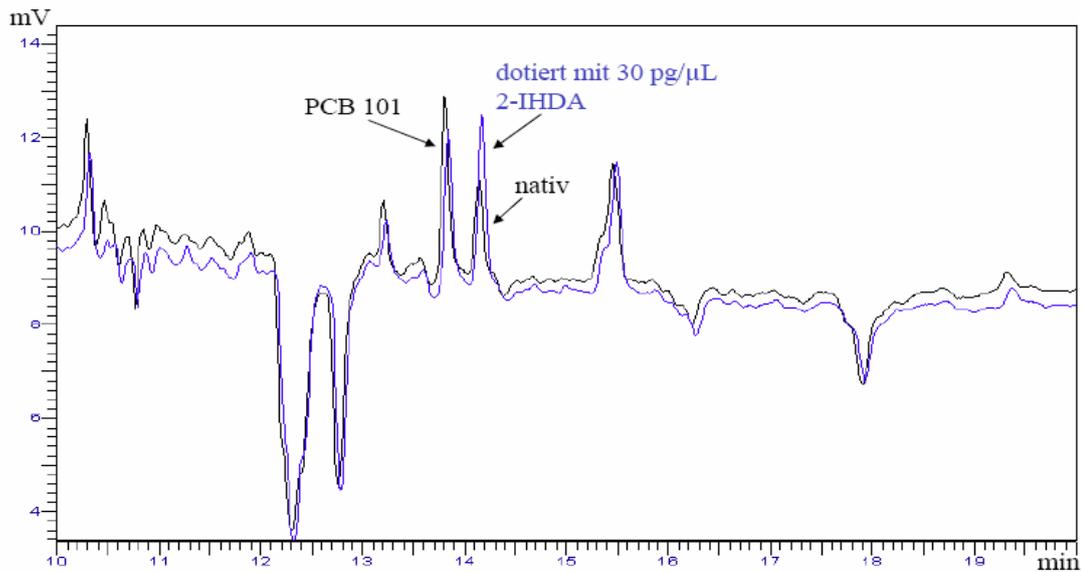
Wie aus beiden Diagramm zu entnehmen ist, besteht für die Analyte ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakfläche bzw. dem Peakflächenverhältnis und der Kon-

zentration. Die errechneten Verfahrenstandardabweichungen betragen bei diesen Kalibrierungen 16,94 pg/ $\mu$ L für 2-IHDA und 9,44 pg/ $\mu$ L für AA- $\delta$ -IL.

Aus weiterführenden Untersuchungen ergab sich, dass zwar für die Standardlösungen innerhalb der Kalibrierreihen eine gute Präzision erzielt werden konnte, dass aber unter Einfluss der Probenmatrix es zu verringerten Signalintensitäten kam. Besonders bei der LC-MS/MS kommt dieser Fakt zum Tragen, da nur eine begrenzte Anzahl von Ladungsträgern auf der Tröpfchenoberfläche zur Verfügung steht und durch vergrößerte Anzahl von Matrixmolekülen die Ionisierung der Analytmoleküle erschwert wird. Trotz aufwendiger Probenaufreinigung kann dieser Aspekt in einer komplexen biologischen Matrix nie ausgeschlossen werden. Um dieser Tatsache entgegenzuwirken bzw. den Einfluss der Matrix zu berücksichtigen, wurde versucht eine matrixangepasste Kalibrierung durchzuführen.

#### **4.2.7.3 Matrixangepasste Kalibrierung**

Ein probates Mittel bei der quantitativen Bestimmung unter Berücksichtigung der vorherrschenden Matrix ist eine matrixangepasste Kalibrierung. Hierbei werden Proben verwendet, die den Analysenproben äquivalent sind, aber die zu untersuchende Komponente nicht enthalten. Da in den Schilddrüsen ca. 70 – 80 % des humanen Iods lokalisiert sind und somit nicht davon ausgegangen werden konnte, dass diese keine Analyte beinhalten, wurden porcine Backendrüsen als Vergleichsmatrix herangezogen. Diese wurden entsprechend des Schemas Abb. 21 (Seite 54) aufgearbeitet und mittels GC-ECD vermessen. Ein Ausschnitt des Chromatogramms von einer nativen und nachträglich mit 2-IHDA gespickten Backendrüse ist in Abb. 65 aufgezeigt.



**Abb. 65: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Backendrüse (nativ und mit Dotierung von 2-IHDA)**

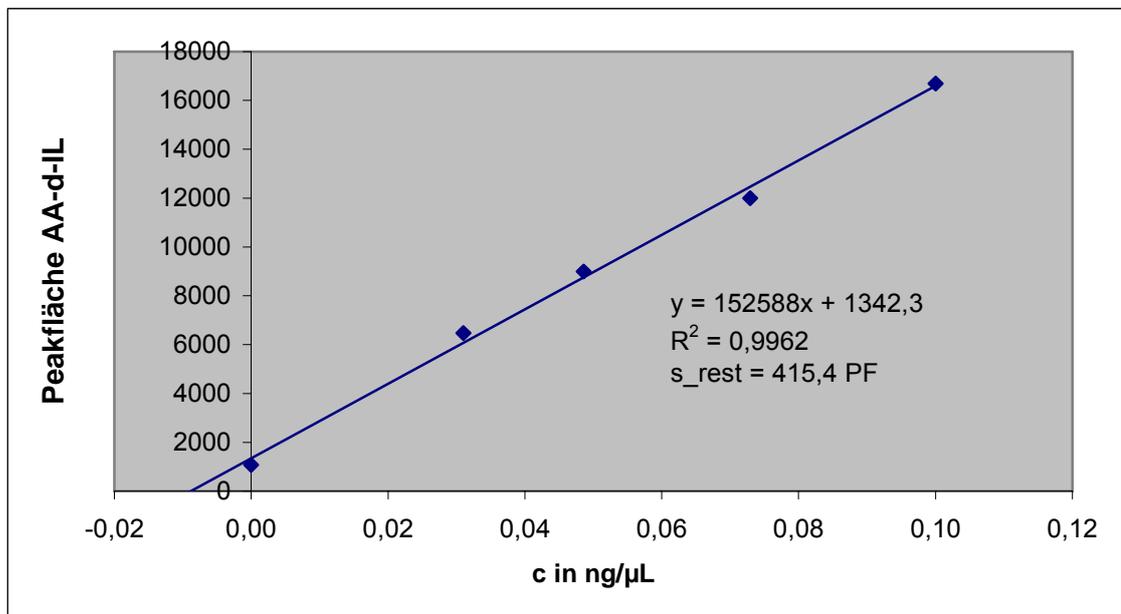
Wie deutlich im Chromatogramm zu erkennen ist, konnte auch in der Backendrüse 2-IHDA nachgewiesen werden. Da es sich bei dem registrierten Peak um 2-IHDA handelt, wurde durch eine zusätzliche Proben-dotierung mit 30 pg/µL 2-IHDA-Standard abgesichert. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch andere Drüsen (z.B. Brustdrüse) in der Lage sind geringe Mengen an Iod aufzunehmen [19]. Unter Einwirkung von Peroxidasen könnte dies zu einer Bildung von 2-IHDA in der Backendrüse geführt haben. Aus den aufgeführten Gründen stellt die matrixangepasste Kalibrierung mit Backendrüsen keine Alternative für die quantitative Bestimmung der Iodlipide dar. Um dennoch den Einfluss der Probenmatrix zu berücksichtigen, wurde im nächsten Schritt eine Standardaddition durchgeführt.

#### 4.2.7.4 Standardaddition

Die Quantifizierung kann neben der bereits erwähnten externen Kalibrierung auch über die Standardaddition (SDA) erfolgen. Hierbei werden der zu untersuchenden Probe definierte Mengen an Analyt zugesetzt und diese anschließend vermessen. Die ermittelten Peakflächen bzw. Peakflächenverhältnisse werden gegen die Konzentration aufgetragen. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse gibt den negativen Wert der Konzentration der Probe an. Durch dieses Verfahren werden für jede Probe individuell die vorherrschenden Matrixeinflüsse berücksichtigt. Nachteilig hingegen ist die längere Analysendauer bzw. der erhöhte Zeitaufwand bei der Probenaufarbeitung. Eine

grundlegende Bedingung der Standardaddition ist, dass diese nur innerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierfunktion angewendet werden darf. Eine Festlegung des linearen Bereichs muss zunächst anhand einer externen Kalibrierung erfolgen. Diese wird auch benötigt um die Nachweis- und Erfassungsgrenzen zu bestimmen, da die Standardaddition keine Aussage darüber zulässt.

Für die quantitative Bestimmung der Iodlactone mittels LC-MS/MS wurden die nativen Proben im Bereich von 0,03 ng/μL bis hin zu 0,1 ng/μL Standardlösung aufgestockt. Die Abb. 66 zeigt den Zusammenhang zwischen der detektierten Peakfläche und der Konzentration. Anhand der Regressionsgeraden konnte für diese Probe ein AA-δ-IL-Konzentration von 0,0088 ng/μL bzw. unter Berücksichtigung der Probenaufarbeitung und -einwaage von 8,736 ng/g Gewebe ermittelt werden (vgl. Tab-A 52 / Tab-A 53).



**Abb. 66: Standardaddition der Probe SD-IL-1 (Messung 4)**

Im Gegensatz dazu wurden die Proben zur Bestimmung der Iodaldehydgehalte mittels GC-ECD im Bereich von 50 pg/μL bis 200 pg/μL aufdotiert. Der interne Standard PCB 101 wurde in einer Konzentration von 100 pg/μL verwendet. Als Beispiel sei an dieser Stelle die Standardaddition der Probe SD-IA-8 für 2-IHDA dargestellt (vgl. Abb. 67).

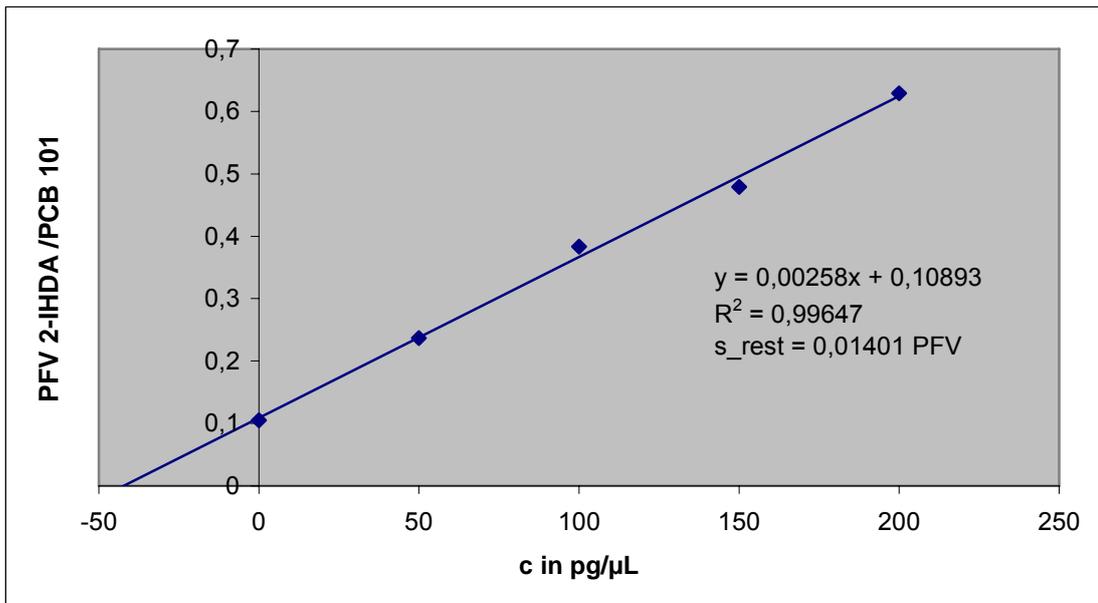


Abb. 67: Standardaddition der Probe SD-IA-8 (Messung 1)

Während die Reststreuung ( $s_{rest}$ ) ein Maß für die Präzision der Messwerte darstellt, gibt die Verfahrensstandardabweichung ( $s_{x0}$ ) Auskunft über die Streuung der berechneten Konzentrationen. Mathematisch werden diese wie folgt, berechnet:

$$s_{rest} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2}} \quad s_{x0} = \frac{s_{rest}}{b}$$

- mit
- $s_{rest}$  Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung
  - $s_{x0}$  Verfahrensstandardabweichung
  - $\hat{y}_i$  geschätzter Funktionswert bei der Kalibrierung
  - $y_i$  Messwert der Kalibrierprobe
  - $b$  Steigung der Kalibriergeraden
  - $n$  Anzahl der Kalibrierproben

In Tab. 39 sind die gemittelten Reststreuungen bzw. Verfahrensstandardabweichungen für die einzelnen Proben aufgeführt.

Tab. 39: Gemittelte Reststreuungen ( $s_{rest}$ ) und Verfahrensstandardabweichungen ( $s_{x0}$ )

Probe	Analyt	$s_{rest}$	$s_{x0}$ [pg/ $\mu$ L]
SD-IL-1	AA- $\delta$ -IL	264,3 PF	2,099
SD-IL-2	AA- $\delta$ -IL	510,4 PF	3,781
SD-IL-3	AA- $\delta$ -IL	947,6 PF	3,700
SD-IL-4	AA- $\delta$ -IL	113,0 PF	9,761
SD-IL-5	AA- $\delta$ -IL	54601,3 PF	34,780
SD-IL-6	AA- $\delta$ -IL	1999,7 PF	6,358
SD-IL-7	AA- $\delta$ -IL	1259,8 PF	4,425
SD-IL-8	AA- $\delta$ -IL	868,0 PF	2,238
SD-IA-1	2-IHDA	0,00741 PFV	6,336
	2-IODA	0,00495 PFV	3,760
SD-IA-2	2-IHDA	0,04825 PFV	24,668
	2-IODA	0,04804 PFV	10,169
SD-IA-3	2-IHDA	0,00502 PFV	11,529
	2-IODA	0,00026 PFV	3,128
SD-IA-4	2-IHDA	0,01010 PFV	8,377
	2-IODA	0,00471 PFV	11,783
SD-IA-5	2-IHDA	0,01549 PFV	13,691
	2-IODA	0,00893 PFV	16,394
SD-IA-6	2-IHDA	0,05637 PFV	22,366
	2-IODA	0,00050 PFV	18,881
SD-IA-7	2-IHDA	0,00223 PFV	13,697
	2-IODA	0,00010 PFV	18,908
SD-IA-8	2-IHDA	0,01482 PFV	7,149
	2-IODA	k.A.	k.A.
SD-IA-9	2-IHDA	0,02885 PFV	10,682
	2-IODA	0,01812 PFV	11,514
SD-IA-10	2-IHDA	0,00900 PFV	6,967
	2-IODA	0,00336 PFV	12,963
SD-IA-11	2-IHDA	0,00907 PFV	10,854
	2-IODA	0,00274 PFV	11,006
SD-IA-12	2-IHDA	0,01312 PFV	8,880
	2-IODA	0,00363 PFV	6,626

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen zwar die Reststreuungen zum Teil erhebliche Schwankungen, jedoch resultieren aus ihnen Verfahrenstandardabweichungen im unteren Pikogramm-Bereich. Die Präzision der ermittelten Konzentrationen ist somit als gut zu bewerten.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Standardaddition ein geeignetes Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Iodlipide darstellt. Die dabei ermittelten Verfahrensstandardabweichungen sind vergleichbar mit denen einer externen Kalibrierung, berücksichtigen jedoch die Individualität der einzelnen Proben.

#### 4.2.7.5 Wiederfindung der Aufarbeitung

Als Maß für die Güte der Aufarbeitung kann die Wiederfindung herangezogen werden. In diesem Verfahren wird verglichen, welche Analytverluste bei der Aufarbeitung entstehen, in dem man die gemessenen Analytsignale sowohl vor als auch nach der Aufarbeitung betrachtet. Mathematisch errechnet sich die Wiederfindung bzw. Wiederfindungsrate (WFR) wie folgt:

$$WFR[\%] = \frac{c_{\text{nach Aufarbeitung}}}{c_{\text{vor Aufarbeitung}}} * 100\%$$

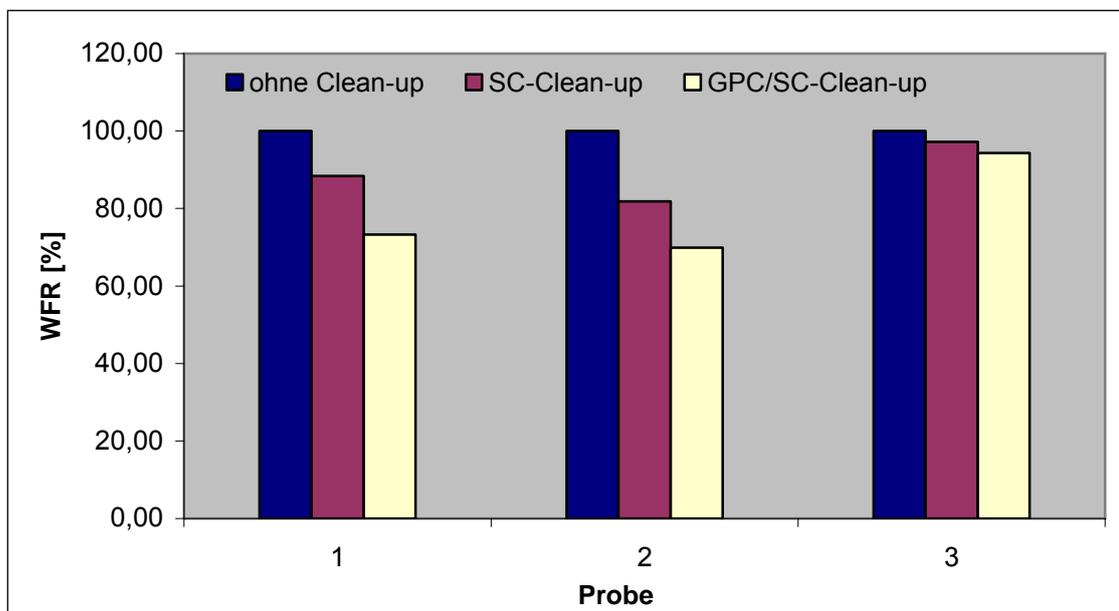
mit	<i>WFR</i>	Wiederfindungsrate in %
	<i>c<sub>nach Aufarbeitung</sub></i>	ermittelte Analytkonzentration nach der Aufarbeitung
	<i>c<sub>vor Aufarbeitung</sub></i>	ermittelte Konzentration bzw. dotierte Konzentration ohne Aufarbeitung

In Anbetracht der zu erwartenden Analytgehalte und der Komplexität der Matrix wurden für diese Arbeit Wiederfindungsraten im Bereich von 80 % bis 120 % für vertretbar befunden. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden anhand von 2-IHDA und AA- $\delta$ -IL durchgeführt, da diese die biologisch wirksamen Komponenten repräsentieren und in den Realproben die anderen Analyte meist nicht nachgewiesen werden konnten.

#### *Wiederfindung der Referenzstandards*

Im Rahmen der Iodaldehydanalytik wurde zunächst der Einfluss der Aufarbeitung anhand von Referenzsubstanzen untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Stammlösung, die beide Analyte (gelöst in Hexan) enthielt, hergestellt. Für die anschließende GC-ECD-Messung wurde 1 mL dieser Lösung mit dem internen Standard PCB 101

(ca. 100 pg/ $\mu$ L) versetzt, während für die HPLC-UV-Messung 500  $\mu$ L der Stammlösung zunächst einrotiert, anschließend mit Acetonitril wieder in 500  $\mu$ L aufgenommen und abschließend mit PCB 180 als internen Standard versetzt wurde. Die dabei ermittelten Gehalte repräsentieren in der Berechnung der Wiederfindungsrate die dotierten Konzentrationen (*c vor Aufarbeitung*). Zur Ermittlung der Analytkonzentrationen nach der entsprechenden Aufarbeitung (*c nach Aufarbeitung*) wurde 1 ml über die Säulenchromatographie (SC) und 1,25 ml über die Gelpermeationschromatographie (GPC) mit folgender Säulenchromatographie (SC) aufgereinigt und für die GC-ECD und HPLC-Messung wie beschrieben vorbereitet. Die erhaltenen Peakflächen für die GPC/SC-Aufarbeitung wurden auf den Gehalt in exakt 1 ml Stammlösung und die Peakflächen der Iodaldehyde auf 1 ng/ $\mu$ l sowie PCB 101 auf 100 pg/ $\mu$ l und PCB 180 auf 1 ng/ $\mu$ l extrapoliert. Die Messdaten zu den Wiederfindungsreihen (GC-ECD und HPLC-UV) befinden sich im Anhang (Tab-A 54/ Tab-A 55). Die Proben 1a bis 3a wurden ohne Clean-up, die Proben 1b bis 3b nach säulenchromatographischen Clean-up und die Proben 1c bis 3c nach GPC/SC-Clean-up vermessen. Die Abb. 68 zeigt die Wiederfindung der GC-ECD-Messung von 2-IHDA. Im Anhang ist das Diagramm der GC-ECD-Messung des 2-IODAs sowie die Diagramme der HPLC-UV-Messungen beider Referenzsubstanzen dargestellt (Abb-A 19 - Abb-A 21).



**Abb. 68:** Vergleichsdiagramm der Wiederfindungsraten von 2-IHDA am GC-ECD

Zusammenfassend zeigt die folgende Tabelle die durchschnittlich erreichten Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen nach den zwei verschiedenen Aufreinigungsschritten (vgl. Tab. 40).

**Tab. 40: Ermittelte Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen der GC-ECD- Messung**

Probe	2-IHDA		2-IODA	
	WFR <sub>SC</sub> [%]	WFR <sub>GPC/SC</sub> [%]	WFR <sub>SC</sub> [%]	WFR <sub>GPC/SC</sub> [%]
1	88,5	73,3	90,0	75,8
2	81,8	69,9	78,7	65,1
3	97,2	94,4	93,7	92,5
Mittelwert	89,2	79,2	87,5	77,8
Standardabweichung	7,72	13,24	7,83	13,80

Sowohl bei 2-IHDA als auch bei 2-IODA konnte gezeigt werden, dass bei der säulenchromatographischen Aufreinigung die geringeren Verluste an den Referenzsubstanzen auftreten. Eine mögliche Erklärung liefert dabei die verlängerte Verweildauer der Substanzen auf der GPC-Säule, die sich nachweislich negativ auf die Stabilität der Analyte auswirken kann. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass geringe Analytmengen auf der GPC-Säule bzw. in den Poren des GPC-Materials verblieben sind und nicht mit eluiert werden konnten.

Zwar konnte mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass vertretbare Wiederfindungen bei den einzelnen Standards erzielt werden konnten, jedoch ist aus der Erfahrung bekannt, dass sich die Wiederfindung unter Einwirken von Matrixkomponenten verschlechtern kann. Aus diesem Grund wurden die Wiederfindungsversuche für die säulenchromatographische Aufreinigung nochmals anhand von Realproben für 2-IHDA durchgeführt.

#### *Wiederfindung in den biologischen Proben*

Für die Untersuchung der Wiederfindungsrate von 2-IHDA in Realproben wurden zunächst zwei Schilddrüsen vereinigt und zerkleinert. Aus diesen gepoolten Geweben wurden anschließend acht Proben von je 1 g abgewogen. Vier dieser Teilproben wurden vor der Aufarbeitung mit 2-IHDA (20 pg/μL) dotiert, während die anderen vier erst nach der säulenchromatographischen Aufreinigung mit 2-IHDA (20 pg/μL) gespikt wurden. Alle Proben wurden abschließend mit PCB 101 (20 pg/μL) versetzt, auf ein Standardvolumen von 1 mL mit Hexan eingestellt und mittels GC-ECD vermessen. Der Vorgang wurde für ein repräsentatives Ergebnis dreimal wiederholt. Für die Berechnung der Wiederfindungsraten wurden die gemittelten Peakflächenverhältnisse dieser

Aufarbeitung miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 41 dargestellt (Messwerte siehe Anhang Tab-A 56).

**Tab. 41: Ermittelte Wiederfindungsraten für 2-IHDA in Realproben**

Probenbezeichnung	mittleres Peakflächenverhältnis (2-IHDA/ PCB 101)	Wiederfindungsrate [%]
1a	1,106	83,2
1b	1,329	
2a	1,792	83,0
2b	2,160	
3a	0,678	91,8
3b	0,739	
Mittelwert		86,0
Standardabweichung		4,99

a ...vor der Aufarbeitung dotiert; b ...nach der Aufarbeitung dotiert

Im Rahmen der Aufarbeitungsoptimierung wurde, wie auch bei den Iodaldehyden, die Wiederfindung der Iodlactonanalytik untersucht. Zu diesem Zweck wurde aus dem zerkleinerten Material einer Schilddrüse mindestens eine native und eine gespikete Probe hergestellt, wobei letztere durch eine gleichmäßige Punktion des Gewebes auf eine Endkonzentration des Probenextraktes von 0,1 ng/μL AA-δ-IL eingestellt wurde. Die anschließende Probenaufarbeitung erfolgte nach dem auf Seite 54 beschriebenen Schema (vgl. Abb. 21). Innerhalb dieser Untersuchungen wurde des Weiteren der Einfluss des Extraktionsvolumens betrachtet, in dem die erste Schilddrüse lediglich mit 5 mL Hexan/Essigester (9 : 1; v/v) extrahiert wurde, während das Extraktionsvolumen bei der zweiten Probe 10 mL betrug. Hierbei zeigte sich bereits, dass die Wiederfindung durch das erhöhte Volumen gesteigert werden konnte. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde die dritte Schilddrüse für die Bestimmung der Wiederfindung gleichermaßen mit 10 mL extrahiert.

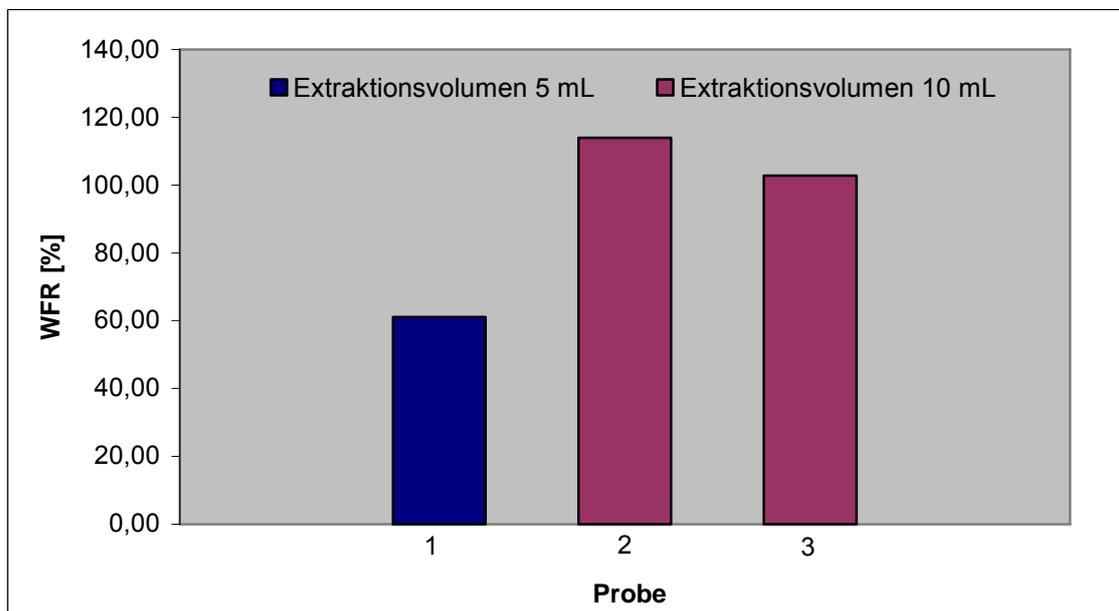
Aufgrund des erheblichen Zeitaufwandes wurde die Gehaltsbestimmung der nativen Proben anhand der Standardaddition durchgeführt, während die AA-δ-IL-Konzentration der dotierten Proben nur anhand von externen Kalibrierungen bestimmt wurde. Die Messwerte der jeweiligen Kalibrierungen befinden sich in den Tab-A 57. Die nachfolgende Tab. 42 gibt einen Überblick über die errechneten AA-δ-IL-Konzentrationen in den nativen und dotierten Schilddrüsen.

**Tab. 42: Errechnete Konzentrationen der aufgearbeiteten Schilddrüsenproben**

Probenbezeichnung	errechnete Konzentration von AA- $\delta$ -IL [ng/ $\mu$ L]	Wiederfindungsrate [%]
1a	0,010	61,1
1b	0,071	
2a	0,001	114,0
2b	0,115	
3a	0,004	102,8
3b	0,107	

a ...nativ; b ... dotiert mit 0,1 ng/ $\mu$ L AA- $\delta$ -IL

Die bereits diskutierten Ergebnisse (vgl. Abschnitt 4.2.3.2) gemäß dem Extraktionsvermögen unterschiedlicher Hexan/Essigester-Volumina (9 : 1, v/v) konnten durch die erhaltenen Wiederfindungsraten des AA- $\delta$ -Iodlactons bestätigt werden. In Abb. 69 ist der Zusammenhang zwischen den ermittelten Wiederfindungsraten und dem Extraktionsvolumen graphisch dargestellt.

**Abb. 69: Zusammenhang zwischen dem Extraktionsvolumen und den ermittelten Wiederfindungsraten von AA- $\delta$ -IL**

Anhand der vergleichenden Darstellung der Wiederfindung in Abhängigkeit des Extraktionsvolumens konnte gezeigt werden, dass durch das geringere Lösemittelvolumen die Wiederfindungsrate um ca. 40 % niedriger war und eine optimale Probenaufarbeitung ein Extraktionsvolumen von 10 mL benötigt. Das Extraktionsvermögen eines 5 ml He-

xan/Essigester-Gemisches (9 : 1, v/v) wurde folglich als nicht befriedigend bewertet und findet keine Anwendung bei zukünftigen Probenaufarbeitungen. Im Gegensatz dazu wurde mit einem Extraktionsvolumen von 10 mL Hexan/Essigester (9 : 1; v/v) über die gesamte Aufarbeitung biologischer Proben ein durchschnittlicher Wert von 108,4 % für die AA- $\delta$ -Iodlacton-Wiederfindung ermittelt. Dieser Wert entspricht damit den auferlegten Analysenspezifikationen (WFR 80 % - 120 %) zur Bestimmung der Iodlactone in den untersuchten Schilddrüsenproben.

### 4.3 Untersuchung der Schilddrüsenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Schilddrüsen bezüglich ihres Gehalte an Iodlipiden untersucht. Diese Proben wurden aus dem nahe gelegenen Schlachthof bzw. von Privatschlachtung bezogen. Nach der Tötung der Tiere wurde die Schilddrüse schnellstmöglich entnommen und tiefgekühlt zur Untersuchungsstätte transportiert. Anschließend wurden die Schilddrüsen vom umliegenden Bindegewebe befreit und einzeln verpackt eingefroren. Die Lagerung bei -18 °C diente dabei zum Einen um einen denkbaren Verwesungsprozess zu verhindern und zum Anderen um die Aktivität der Peroxidasen herabzusetzen. Durch Verringerung der Peroxidase-Aktivität sollte dabei eine mögliche nachträgliche Synthese von iodorganischen Substanzen bzw. ein Abbau der vorhandenen Iodlipide unterdrückt werden. Um diesen Aspekt auch während der Aufarbeitung gewährleisten zu können, wurden die Proben erst am jeweiligen Analysentag aus dem Tiefkühler entnommen. Die Aufarbeitung gestaltete sich nach dem in Abb. 21 (vgl. Seite 54) beschriebenen Schema.

Insgesamt wurden 20 Proben bezüglich ihres Iodlipid-Gehaltes untersucht, wobei zwölf von diesen auf den Gehalt von 2-IHDA und 2-IODA untersucht wurden. Die anderen acht Proben dienten der Bestimmung der Iodlactone. Es wurde jeweils mindestens eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels SDA.

Die nachfolgende Tab. 43 zeigt die ermittelten Iodaldehydgehalte in den untersuchten Schilddrüsenproben. Im Rahmen der Aufarbeitungsoptimierung wurde zunächst jeweils nur 1 g Probe aufgearbeitet. Dabei zeigte sich jedoch, dass die ermittelten Analytkonzentrationen mitunter stark schwankten, so dass die Proben SD-IA-4 bis SD-IA-12 im Gegensatz zum vorherigen Verfahren zunächst als Ganzes extrahiert und filtriert und erst vor der Kieselgel-Aufreinigung in Teilmengen separiert wurden.

Tab. 43: Übersicht der ermittelten Iodaldehydkonzentration in den Schilddrüsenproben

Probenbezeichnung	Messung	Einwaage [g]	Konzentration 2-IHDA [ng/ $\mu$ L]	Konzentration 2-IODA [ng/ $\mu$ L]
SD-IA-1	1	1,0184	0,062	0,011
	2	0,9621	0,092	0,005
	3	1,0876	0,051	0,034
SD-IA-2	1	1,0969	0,047	0,006
	2	1,0946	(0,182)	(0,080)
	3	1,1106	0,035	0,030
SD-IA-3	1	1,1109	0,021	0,082
	2	1,0122	0,018	0,077
	3	1,0456	0,013	0,052
SD-IA-4	1	6,3580	n.n.	0,937
	2		1,201	1,849
	3		0,657	n.n.
SD-IA-5	1	6,2830	0,156	0,164
	2		0,218	0,168
	3		0,164	n.n.
SD-IA-6	1	6,2030	0,898	n.n.
	2		0,380	0,427
	3		0,166	0,517
SD-IA-7	1	6,1070	n.n.	n.n.
	2		0,246	1,587
	3		0,173	n.n.
SD-IA-8	1	6,0550	0,042	n.n.
	2		0,043	n.n.
	3		0,052	n.n.
SD-IA-9	1	6,1070	0,127	0,175
	2		0,171	0,110
	3		0,262	n.n.
SD-IA-10	1	6,1080	0,023	0,004
	2		0,140	n.n.
	3		0,068	0,045

SD-IA-11	1	6,0920	0,056	0,024
	2		0,110	0,093
	3		0,249	n.n.
SD-IA-12	1	6,0780	0,051	0,023
	2		0,326	0,353
	3		0,250	0,104

n.n. ... nicht nachweisbar; (...) ... durch Test nach Nalimov als Ausreißer bestimmt

Die Berechnung der Analytgehalte pro Gramm Schilddrüsengewebe erfolgt für die Proben SD-IA-1 bis SD-IA-3 und SD-IL-1 bis SD-IL-8 gemäß der Formel:

$$\text{Gehalt [ng / g]} = \frac{\text{Gehalt [ng / } \mu\text{L]} * 1000}{\text{Einwaage [g]}}$$

Für die Berechnung der Gehalte pro Gramm Schilddrüsengewebe wurde zunächst berücksichtigt, dass nach der Kieselgel-Aufreinigung ein Volumen von 1 mL vorlag, so dass der ermittelte Gehalt (ng/μL) mit dem Faktor 1000 multipliziert werden musste. Um anschließend eine Vergleichbarkeit der Proben gewährleisten zu können, wurden die Proben auf eine standardisierte Gewebemenge von 1 g berechnet, in dem durch die exakte Einwaage geteilt wurde.

Die Analysenproben SD-IA-4 bis SD-IA-12 wurden nach der Filtration in sechs Teilproben gesplittet. Diese wurden danach auf jeweils 500 μL eingengt und in fünf Fraktionen von je 100 μL für die Standardaddition aufgeteilt. Die ermittelte Konzentration [ng/μL] musste also folglich zunächst auf 100 μL Teilextrakt bezogen werden. Des Weiteren wurden die fünf Fraktionen für die Standardaddition, die Aufspaltung in die sechs Teilproben, sowie die exakte Probeneinwaage berücksichtigt, so dass sich daraus folgende Berechnungsformel für diese Proben ergibt:

$$\text{Gehalt [ng / g]} = \frac{\text{Gehalt [ng / } \mu\text{L]} * 6 * 5 * 100}{\text{Einwaage [g]}}$$

Die erhaltenen Gehalte (ng/g) wurden abschließend mittels Test nach Nalimov auf Ausreißer überprüft (Formel gemäß Abschnitt 4.2.2.1; Seite 74). Die nachfolgende Tab. 44 gibt eine Übersicht über die gemittelten Probengehalte, sowie die errechneten Standardabweichungen in den untersuchten Proben.

**Tab. 44: Mittlere Probengehalte und Standardabweichungen der Iodaldehyde in den Schilddrüsenproben**

Proben- bezeichnung	mittlerer Probengehalt [ng/g]	Standard- abweichung [ng/g]	mittlerer Probengehalt [ng/g]	Standard- abweichung [ng/g]
	2-IHDA	2-IHDA	2-IODA	2-IODA
SD-IA-1	67,7	24,7	15,7	13,8
SD-IA-2	37,3	7,3	16,2	15,4
SD-IA-3	16,6	3,5	66,4	14,7
SD-IA-4	439,6	128,5	872,6	k.A.
SD-IA-5	85,5	16,7	79,2	1,3
SD-IA-6	232,8	182,1	228,3	30,6
SD-IA-7	103,1	25,4	779,5	k.A.
SD-IA-8	22,7	2,7	n.n.	k.A.
SD-IA-9	91,6	33,8	69,8	22,5
SD-IA-10	37,7	28,9	11,8	14,2
SD-IA-11	68,2	49,1	28,6	24,0
SD-IA-12	103,2	70,2	79,0	84,9

n.n. ... nicht nachweisbar; k.A...keine Angabe möglich, da nur ein bzw. kein Wert vorhanden

Die Gehalte von 2-IHDA variierten in den untersuchten Proben von 22,7 ng/g bis 440 ng/g, während von 2-IODA Gehalte im Bereich von 11,8 ng/g bis 873 ng/g ermittelt werden konnten.

Gleichermaßen wurde der Gehalt der Iodlactone in Schilddrüsen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass lediglich AA- $\delta$ -IL quantitativ bestimmbar war. Die anderen beiden Iodlactone (EPA- $\delta$ -IL und DHA- $\gamma$ -IL) konnten in keiner untersuchten Probe nachgewiesen werden.

Die ermittelten AA- $\delta$ -IL-Konzentrationen der untersuchten Proben sind in Tab. 45 zusammengefasst (Kalibriergeraden siehe Anhang Tab-A 58 - Tab-A 88 und Abb-A 22 - Abb-A 41).

**Tab. 45: Übersicht der ermittelten AA- $\delta$ -IL-Konzentrationen in den Schilddrüsenproben**

Probenbezeichnung	Messung	Einwaage [g]	Konzentration [ng/ $\mu$ L]
SD-IL-1	1	1,0298	0,0058
	2	1,0177	0,0101
	3	0,9965	0,0037
	4	1,0070	0,0088
	5	1,0278	0,0120
	6	1,0085	0,0176
	7	1,0189	(0,0380)
SD-IL-2	1	1,0163	0,0097
	2	1,0172	0,0012
	3	0,1020	0,0072
SD-IL-3	1	1,0024	0,0048
	2	0,9979	0,0019
SD-IL-4	1	1,0089	0,0321
	2	1,0203	0,1063
	3	1,0198	0,0810
SD-IL-5	1	1,0164	0,0117
	2	1,0042	0,0095
	3	1,0216	0,0005
SD-IL-6	1	1,0063	0,0032
	2	0,9983	0,0068
	3	0,9962	0,0027
SD-IL-7	1	0,9994	0,0010
	2	1,0104	0,0012
SD-IL-8	1	0,9992	0,0036
	2	1,0194	0,0048
	3	0,9988	0,0020
	4	1,0183	0,0007
	5	0,9960	0,0012
	6	1,0178	0,0030
	7	0,9921	(0,0098)

(...) ... durch Test nach Nalimov als Ausreißer bestimmt

Eine mögliche Erklärung zum Fehlen der anderen Iodlactone liefert die Tatsache, dass EPA- $\delta$ -IL beispielsweise bereits im nanomolaren Bereich wirksam ist und das Nachweisvermögen der verwendeten Analysengeräte nicht ausreicht [15]. Eine andere Ursache kann sein, dass bedingt durch das Ernährungsverhalten, 5,8,11,14,17-Eicosa-pentaensäure und 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure seltener aufgenommen werden, und damit weniger häufig in den Biomembranen eingebaut werden. Vorwiegend sind diese beiden essentiellen Fettsäuren mit einer fischreichen Ernährung vergesellschaftet. In der Schweinezucht können sie durch Zugabe von Fischmehl oder alternativ durch Fischöl supplementiert werden [88]. Genauere Angaben hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung in Mischfutter sind jedoch nicht zu erhalten. Eine Unterversorgung mit Iod scheint hingegen als mögliche Ursache nicht von Relevanz zu sein. Aufgrund eines durchgeführten Monitorings von Mischfutter können Aussagen bezüglich des Iodgehaltes getroffen werden. Bei diesen Untersuchungen wurde im Mittel ein Iodgehalt von 1,51 mg/kg pro Tag ermittelt. Futtermittelrechtlich sind zwar keine Höchstmengen angegeben, jedoch wird die Supplementierung von Iod als Zusatzstoff geregelt. Hierbei wird für Mastschweine und Sauen ein Maximalwert von 10 mg/kg pro Tag angegeben. Die Zufuhrempfehlung von Iod in Schweinefuttermittel liegt für Mastschweine jedoch lediglich bei 0,15 mg/kg pro Tag [89].

Wie auch bei den Iodaldehyden wurden die untersuchten Proben auf Ausreißer mittels Nalimov-Test geprüft und anschließend die Mittelwerte und Standardabweichungen der AA- $\delta$ -IL-Gehalte in den Proben berechnet (vgl. Tab. 46).

**Tab. 46: Mittlere Probengehalte und Standardabweichungen von AA- $\delta$ -IL in den Schilddrüsenproben**

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>mittlerer Probengehalt [ng/g]</b>	<b>Standardabweichung [ng/g]</b>
SD-IL-1	9,54	4,84
SD-IL-2	5,94	4,34
SD-IL-3	3,37	2,01
SD-IL-4	14,37	7,36
SD-IL-5	7,16	5,83
SD-IL-6	4,22	2,29
SD-IL-7	1,09	0,15
SD-IL-8	2,51	1,52

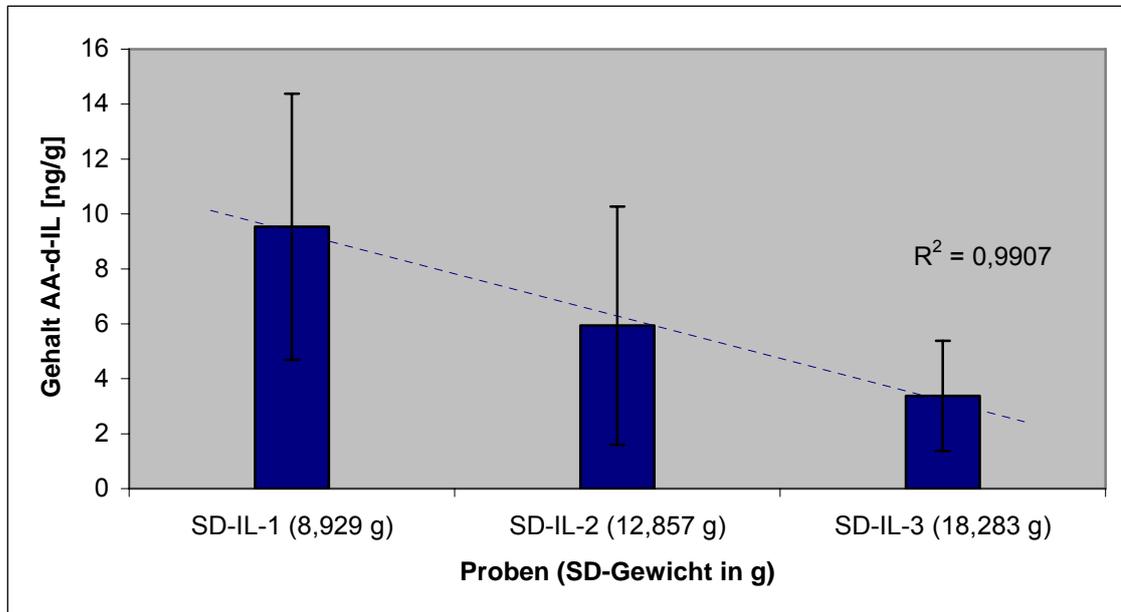
Für die untersuchten Schilddrüsenproben wurden AA- $\delta$ -IL-Gehalte zwischen 1,1 ng/g und 14,4 ng/g Schilddrüsenewebe ermittelt.

Die Probengehalte zeigen auch hierbei zum Teil Standardabweichungen größer 50 % bei den errechneten Gehalten. Diese Probeninhomogenität lässt sich zum Teil auf Schilddrüsenareale zurückführen, die sich in unterschiedlichen Aktivitätsstadien befinden. Zum Einen unterscheidet man in der Schilddrüse zwischen Gewebeabschnitten, die sich in der Synthesephase, in der Speicherphase bzw. in der Resorptionsphase befinden [90]. In Bereichen, die sich in der Synthesephase befinden, ist der Anteil an freiem Iodid höher als in den Teilabschnitten der anderen Aktivitätsstadien, so dass hier Reaktionen von freiem Iodid mit membranständigen Vinylethergruppen der Plasmalogene oder Fettsäuren öfter auftreten können. Zum Anderen können durch Strukturanomalien Areale mit einer stark gesteigerten Umsatzrate (heiße Knoten) bzw. mit einer stark verminderten Syntheserate (kalte Knoten) auftreten. Da in dieser Arbeit keine histologische Untersuchungen erfolgten, können bezüglich solcher Gewebeveränderungen keine Aussagen getroffen werden und deren Einfluss auf die zum Teil stark variierenden Analytgehalte nur vermutet werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Iodlactone die Expression von lokalen Wachstumsfaktoren reguliert und damit Einfluss auf die Strumaentwicklung haben [1, 3 - 7, 9 - 11, 13, 21, 54].

Dieser Aspekt konnte bei den analysierten Schilddrüsen bestätigt werden. Der Schilddrüsenlappen des geringsten Gesamtgewichtes (Probe SD-IL-1) weist den höchsten Ge-

halt an AA- $\delta$ -IL auf. Im Gegensatz dazu besitzt die Schilddrüse des geringsten AA- $\delta$ -Iodlacton-Gehaltes (Probe SD-IL-3) das größte Gesamtgewicht. Die folgende Abb. 70 zeigt die Korrelation zwischen Schilddrüsengewicht und mittlerem AA- $\delta$ -IL-Gehalt auf.



**Abb. 70: Zusammenhang zwischen dem ermittelten AA- $\delta$ -IL-Gehalt und dem Schilddrüsengewicht**

Dieser inverse Zusammenhang zwischen dem Schilddrüsengewicht und dem ermittelten AA- $\delta$ -IL-Gehalt kann durch die Berücksichtigung der Herkunft erklärt werden. Während die Probe SD-IL-1 aus einer Privatschlachtung erhalten wurde, stammen die anderen beiden Proben (SD-IL-2 und SD-IL-3) aus einer Schlachthanlage, die Mastschweine von großlandwirtschaftlichen Betrieben bezieht. Ernährungsphysiologisch unterscheiden sich die beiden Gruppen durch die Tatsache, dass die Mastschwein-Versorgung über industrielle Mischfutterzubereitungen erfolgt, während im privaten Bereich das gemeine Hausschwein mitunter als „Resteverwerter“ genutzt wird. Dabei ist es möglich, dass neben der eigentlichen Iodgabe durch Industriefutter eine zusätzliche Iodsupplementierung erfolgt, wenn Lebensmittel mit iodiertem Speisesalz oder iodreiche Lebensmittel (z.B. Fischreste) verfüttert werden. Die Folge der verbesserten Iodversorgung äußert sich dann in einer erhöhten Synthese von wachstumshemmenden Iodlactonen in der Schilddrüse.

Genaue Aussagen zu diesem Sachverhalt sind im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht möglich. Eine eindeutige Klärung kann in diesem Zusammenhang nur anhand von tierexperimentellen Studien erfolgen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In tierischen und humanen Schilddrüsen werden neben den Schilddrüsenhormonen  $T_3$  und  $T_4$  bei einer ausreichenden, aber auch übermäßigen Versorgung mit Iod lipophile, iodierte Substanzen gebildet. Von biologischer Bedeutung sind vor allem Iodlipide, die sich von Plasmalogenen und von membranständigen, ungesättigten Fettsäuren ableiten. Diesen iodorganischen Substanzen wird eine wichtige Rolle in der Autoregulation der Schilddrüse zugeschrieben. Während die Iodaldehyde sich spezifisch auf verschiedene Funktionen der Schilddrüse auswirken, beeinflussen die Iodlactone die cAMP-unabhängige Zellproliferation, in dem sie die parakrinen und autokrinen Wachstumsfaktoren inhibieren [6, 9, 10, 22]. In der Literatur finden sich bis dato nur wenig Hinweise zu Gehalten dieser Substanzen in Schilddrüsenproben. Diese Publikationen beinhalten lediglich die Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Analyten und verschiedenen zellularen Stoffwechselfvorgängen. So konnten beispielsweise Ohayon et al. belegen, dass eine maximale Inhibierung der NADPH-Oxidase bei 20  $\mu\text{M}$  2-IHDA stattfand [9]. Darüber hinaus gibt es lediglich drei Quellen, die direkte Aussagen zu instrumentell-analytischen Methoden zum quantitativen Nachweis von Iodlipiden in Schilddrüsengewebe treffen [12, 18, 22]. Wie Torremante et al. belegen, werden Iodlactone auch in der weiblichen Brustdrüse gebildet und tragen dort zur Verringerung des Risikos einer Krebserkrankung bei [19].

Als biologisch bedeutsame Vertreter dieser beiden Strukturklassen wurden die Iodaldehyde 2-Iodhexadecanal (2-IHDA) und 2-Iodoctadecanal (2-IODA), sowie aus der Klasse der Iodlactone, die  $\delta$ -Iodlactone der Arachidonsäure (AA- $\delta$ -IL) und Eicosapentaensäure (EPA- $\delta$ -IL) und das  $\gamma$ -Iodlacton der Docosahexaensäure (DHA- $\gamma$ -IL) ausgewählt. Ziel dieser Dissertation war es zunächst die Synthese von Referenzstandards, die Entwicklung einer instrumentell-analytischen Methode zum Nachweis der Iodlipide und anschließend die Optimierung der Probenaufarbeitung und der verschiedenen Geräteparameter. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden abschließend auf die Analyse von Realproben angewendet.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zunächst Referenzstandards synthetisiert und identifiziert. Die Synthese wurde durch Variation der eingesetzten Iod- und Quecksilber-(II)-chlorid-Menge dahingehend optimiert, dass 2-IHDA mit einer Reinheit von über 90,6 % und 2-IODA von über 78,8 % hergestellt werden konnten. Die Iodlactonsynthese lieferte dagegen geringere Ausbeuten, jedoch konnten durch einen zusätzli-

chen Arbeitsschritt mittels säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel Standards mit einer Reinheit von mehr als 90 % gewonnen werden. Die eindeutige Identifizierung der erhaltenen Standards erfolgte anhand von NMR- und Massenspektren.

Aufgrund der Komplexität der Probenmatrix war es notwendig verschiedene Teilschritte der Probenaufarbeitung und –aufreinigung zu optimieren. Zum Einen gestaltete sich die Extrahierbarkeit der Analyte als schwierig, da die Iodlipide im Kolloid der Follikel eingelagert sind und zunächst freigesetzt werden mussten und zum Anderen wurden verschiedene Matrixbestandteile mitextrahiert, die durch eine nachgeschaltete säulenchromatographische Kieselgel-Aufreinigung abgetrennt werden mussten. Nach Optimierung dieser Teilbereiche wurden Wiederfindungsraten über 80 % für die gesamte Aufarbeitung erzielt, die unter Berücksichtigung des analysierten Konzentrationsbereiches und der Probenkomplexität als geeignet bewertet wurden.

Für die Analytik der Iodlipide standen gaschromatographische und flüssigchromatographische Methoden zur Verfügung. Innerhalb der Untersuchungen zeigte sich, dass für die Analytik der Iodaldehyde eine GC-ECD-Methode die besten Ergebnisse lieferte. Die Bestimmung der Iodlactone konnte indessen gaschromatographisch nur mit unzureichenden Ergebnissen durchgeführt werden. Hier erbrachte eine LC-MS/MS-Methode die besten Resultate.

Durch Optimierung von Injektor- und Detektortemperatur konnte anhand von Standards eine Nachweisgrenze für 2-IHDA von 67 pg/ $\mu$ L und für 2-IODA von 94 pg/ $\mu$ L erzielt werden. Durch Verwendung von Methanol/Wasser (90/10, v/v) mit einem Zusatz von 0,2 mM Ammoniumformiat als Laufmittel konnten ferner für die LC-MS/MS-Methode Nachweisgrenzen für AA- $\delta$ -IL von 46 pg/ $\mu$ L, für EPA- $\delta$ -IL von 47 pg/ $\mu$ L und für DHA- $\gamma$ -IL von 12 pg/ $\mu$ L erreicht werden. Die entwickelten Methoden ermöglichen somit den Nachweis von physiologisch wirksamen Konzentrationen der Analyte.

In den untersuchten Proben wurden Gehalte für 2-IHDA im Bereich von 28 ng/g bis 440 ng/g und für 2-IODA von 12 ng/g bis 873 ng/g ermittelt. Des Weiteren konnten die Iodlactone der Eicosapentaensäure und der Docosahexaensäure in keiner der untersuchten Schilddrüsen nachgewiesen werden. Für das Arachidonsäure- $\delta$ -Iodlacton wurden indes Gehalte von 1,1 ng/g bis 14,4 ng/g Gewebe bestimmt. Auch konnte hierbei ein Zusammenhang zwischen dem Iodlacton-Gehalt und dem Schilddrüsengewicht beobachtet werden, der die Bedeutung der Iodlactone für die Aufrechterhaltung der normalen Schilddrüsenarchitektur belegt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine Möglichkeit zur Entwicklung von Screening-Methoden dar, die zur Prävention von Schilddrüsenerkrankungen beitragen können. In Zusammenhang mit Untersuchungen zum intrathyreoidalen Iodgehalt wären dann Aussagen über den Iodversorgungsstatus und ein potentielles Strumarisiko möglich. Mit Hilfe der von uns entwickelten Methode könnte ferner in tierexperimentellen Studien die Effektivität von einer Iodsupplementierung durch Nahrungsergänzungsmittel in Bezug auf die Bildung der Iodlipide untersucht werden. Auch wäre ein therapeutischer Einsatz von Iodlactonen und Iodaldehyden denkbar.

## 6. SUMMARY AND OUTLOOK

In case of a sufficient or exceeding iodine supply in animal and human thyroid glands lipophilic iodinated substances are synthesized besides the thyroid hormones T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>. Above all iodolipids which derived from plasmalogenes and unsaturated fatty acids of the thyroid biomembrane have biological relevance. These iodoorganic substances play an important role in the autoregulation of the thyroid. Iodoaldehydes influence specific functions of thyroid, whereas iodolactones impair the cAMP-independent cell proliferation by inhibition of paracrine and autocrine growth factors [6, 9, 10, 22]. There are only a few references for analyte contents in thyroid gland in current literature. In fact these publications often show the interaction between the analytes and different cellular metabolic processes only. Ohayon et al., for example, observed a complete inhibition of NADPH-oxidase above a 2-IHDA concentration of 20  $\mu$ M [9]. Furthermore, there are only three sources which contain information on instrumental analytical methods for quantitative analysis of iodolipids in thyroid glands [12, 18, 22]. As Torremante et al. showed iodolactones are build in female mammary gland, too. There they can contribute decreasing cancer risk [19].

The iodoaldehydes 2-iodohexadecanale (2-IHDA) and 2-iodooctadecanale (2-IODA) and also the iodolactones of arachidonic acid (AA- $\delta$ -IL), eicosapentaenoic acid (EPA- $\delta$ -IL) and docosahexaenoic acid (DHA- $\gamma$ -IL) were selected as biological important representatives of both classes.

The aims of this study were the synthesis of reference standards, the development of an instrumental analytical method for iodolipids and the optimization of clean-up procedure of biological samples and various instrument parameters. The obtained results were applied on analysis of real samples.

Reference substances had to be synthesized in the first instance since iodolipids were not purchasable. An optimization of synthesis by variation of iodine and mercury-(II)-chloride content leads to standards with a purity of more than 90.6 % for 2-IHDA and over 78.8 % for 2-IODA. Iodolactone synthesis resulted in lower purities. After an additional clean-up-step with silicagel the purity was raised over 90 %. An explicit characterization of standards was occurred by NMR and MS spectra.

It was necessary to improve various aspects of reprocessing and clean-up due to the complexity of the sample matrix. On the one hand the extractability of the analytes was complicated because iodolipids being stored in colloid and therefore need to be released

before. On the other hand different matrix components were extracted, too. These components had to be removed by a downstream clean-up with silicagel. After optimization recovery rates over 80 % were achieved over the whole method. With regard to the sample complexity and the analyzed concentration range these recovery rates were considered to be acceptable.

In this dissertation gaschromatographic as well as liquidchromatographic methods were used to analyze the chosen substances. The GC-ECD method showed the best performance for iodoaldehydes. A LC-MS/MS method provided best results for iodolactones.

Through optimization of injector and detector temperatures of GC-CED a limit of detection of 67 pg/ $\mu$ L for 2-IHDA and 94 pg/ $\mu$ L for 2-IODA was determined. By the use of aqueous methanol with 0.2 mM ammonium formate as eluent in LC-MS/MS a limit of detection of 46 pg/ $\mu$ L for AA- $\delta$ -IL, 47 pg/ $\mu$ L for EPA- $\delta$ -IL, and 12 pg/ $\mu$ L for DHA- $\gamma$ -IL was achieved. Therefore the developed method enables the analysis of physiological active analyte concentrations.

In the analyzed samples concentrations of 2-IHDA ranged between 28 ng/g and 440 ng/g. The concentrations varied from 12 ng/g to 873 ng/g for 2-IODA. Furthermore, the iodolactones of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid could not be found in any analyzed sample. In contrast for AA- $\delta$ -IL contents between 1.1 ng/g and 14.4 ng/g were detected. As well correlation between iodolactone content and thyroid weight could be observed. This aspect demonstrates iodolactones are responsible for maintenance normal thyroid structure.

The results of our study can now be used to develop fast screening methods for thyroid diseases. By means of the new developed methods it is now possible to start feeding experiments, which observe the synthesis of iodolipids in association with iodine content in the thyroid. Possibly an evidence for prospective risk of goiter can be given. Also a therapeutic use would be conceivable.

**7. LITERATURVERZEICHNIS**

- [1] **Biesalski, H. K. und Grimm, P.;** *Taschenatlas der Ernährung*. Thieme Verlag, 2004.
- [2] **de Benoist, B., Andersson, M., Egli, I., Takkouche, B. and Allen, H.;** Iodine status worldwide. *WHO Global Database on Iodine Deficiency*. Geneva: World Health Organization, 2004.
- [3] **Boeynaems, J. M., Van Sande, J. and Dumont, J. E.;** Which iodolipids are involved in thyroid autoregulation: iodolactones or iodoaldehydes? *Eur J Endocrinol*, 1995, 733-4.
- [4] **Dugrillon, A., Uedelhoven, W. M., Pisarev, M. A., Bechtner, G. and Gärtner, R.;** Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res*, 1994, 465-9.
- [5] **Dugrillon, A. and Gärtner, R.;** delta-Iodolactones decrease epidermal growth factor-induced proliferation and inositol-1,4,5-trisphosphate generation in porcine thyroid follicles – a possible mechanism of growth inhibition by iodide. *Eur J Endocrinol*, 1995, 735-43.
- [6] **Dugrillon, A.;** Iodolactones and iodoaldehydes – mediators of iodine in thyroid autoregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996, 41-5.
- [7] **Gärtner, R. und Dugrillon, A.;** Vom Jodmangel zur Struma. *Der Internist: Springer*, 1998, 566-573.
- [8] **Jacoby, C., Braekman, J.-C. and Daloz, D.;** Asymmetric Synthesis of (2R)- and (2S)- 2-Iodohexadecanal, Natural Inhibitors of the Thyroid Gland Metabolism. *Tetrahedron*, 1996, 10473-10484.
- [9] **Ohayon, R., Boeynaems, J. M., Braekman, J. C., den, Van, Bergen, H., Gorin, Y. and Virion, A.;** Inhibition of thyroid NADPH-oxidase by 2-iodohexadecanal in a cell-free system. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 133-41.
- [10] **Panneels, V., Van den Bergen, H., Jacoby, C., Braekman, J. C., Van Sande, J., Dumont, J. E. and Boeynaems, J. M.** Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 167-76.
- [11] **Panneels, V., Van Sande, J., Van den Bergen, H., Jacoby, C., Braekman, J. C., Dumont, J. E. and Boeynaems, J. M.;** Inhibition of human thyroid adenylyl cyclase by 2-iodoaldehydes. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 41-50.
- [12] **Panneels, V., Macours, P., Van den Bergen, H., Braekman, J. C., Van Sande, J. and Boeynaems, J. M.;** Biosynthesis and metabolism of 2-iodohexadecanal in cultured dog thyroid cells. *J Biol Chem*, 1996, 23006-14.
- [13] **Chazenbalk, G. D., Valsecchi, R. M., Krawiec, L., Burton, G., Juvenal, G. J., Montegudo, E., Chester, H. A. and Pisarev, M. A.;** Thyroid autoregulation. Inhibitory effects of iodinated derivatives of arachidonic acid on iodine metabolism. *Prostaglandins*, 1988, 163-72.
- [14] **Gärtner, R., Dugrillon, A. and Bechtner, G.;** Evidence that thyroid growth autoregulation is mediated by an iodolactone. *Acta Med Austriaca*, 1990, 24-6.

- [15] **Gärtner, R., Dugrillon, A. and Bechtner, G.;** Evidence that iodolactones are the mediators of growth inhibition by iodine on the thyroid. *Acta Med Austriaca*, 1996, 47-51.
- [16] **Pisarev, M. A., Bocanera, L. V., Chester, H. A., de, Kleiman, Pisarev, D. L., Juvenal, G. J., Pregliasco, L. B. and Krawiec, L.;** Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth. *Horm Metab Res*, 1992, 558-61.
- [17] **Pisarev, M. A., Krawiec, L., Juvenal, G. J., Bocanera, L. V., Pregliasco, L. B., Sartorio, G. and Chester, H. A.;** Studies on the goiter inhibiting action of iodolactones. *Eur J Pharmacol*, 1994, 33-7.
- [18] **Rosa, F.;** *Nachweis verschiedener Jodlipide der Schilddrüse in vitro und in vivo.* München, 1996.
- [19] **Torremante, P.;** Mastopathie, Mammakarzinom und Jodlactone. *Dtsch Med Wochenschr*, 2004, 641-5.
- [20] **Bidey, S. P., Hill, D. J. and Eggo, M. C.;** Growth factors and goitrogenesis. *Journal of Endocrinology: Soc Endocrinology*, 1999, 321-332.
- [21] **Langer, R., Burzler, C., Bechtner, G. and Gärtner, R.;** Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2003, 325-9.
- [22] **Pereira, A., Braekman, J. C., Dumont, J. E. and Boeynaems, J. M.;** Identification of a major iodolipid from the horse thyroid gland as 2-iodohexadecanal. *J Biol Chem*, 1990, 17018-25.
- [23] **Kuklev, D. V. and Smith, W. L.;** Synthesis of long chain n-3 and n-6 fatty acids having a photoactive conjugated tetraene group. *Chem Phys Lipids*, 2004, 145-58.
- [24] **Hehrmann, R.;** *Schilddrüsenerkrankungen: Ursachen, Erkennung, Verhütung und Behandlung.* Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, 1995.
- [25] **Uniterra Berlin.;** *Rutherford Online-Lexikon der Elemente.*, 2006.
- [26] **Bundesamt für Risikobewertung: Domke, B., Domke, H. A., Großklaus, R., Niemann, B., Przyrembel, H., Richter, K., Schmidt, E., Weißenborn, A., Wörner, B. und Ziegenhagen, R.;** Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln - Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte., 2004.
- [27] **Karl, H. und Münkner, W.;** Iod in Fischen und Fischerzeugnissen. *Inf. Fischwirtsch*, 1998, 115.
- [28] **Füger, BJ, Dudczak, R., Pirich, Ch und Zettinig, G.;** Jodstoffwechsel. *Journal für Ernährungsmedizin (Ausgabe für Schweiz)*, 2002, 6-8.
- [29] **Pfannenstiel, P. und Saller, B.;** *Schilddrüsenerkrankheiten - Diagnose und Therapie.* Berliner Med. Verl.-Anst., 1991.
- [30] **Köhrle, J. und Schmutzler, C.;** Wie kommt Jod in die Schilddrüse? *Der Internist: Springer*, 1998, 560-565.
- [31] **Spinas G.A. und Heitz U.;** *Endokrinologie.*, 2004.
- [32] **DeGroot, L. J. and et al.;** *The Thyroid and Its Diseases.* Wiley New York, 1984.

- [33] **Yen, P. M.;** Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiological Reviews: Am Physiological Soc*, 2001, 1097-1142.
- [34] **Morrison, M. and Schonbaum, G. R.;** Peroxidase-catalyzed halogenation. *Annu Rev Biochem*, 1976, 861-88.
- [35] **Pfannenstiel, P.;** *Jod und Schilddrüse - Verhandlungsbbericht des 6. Wiesbadener Schilddrüsengesprächs*. Wiesbaden, 1987.
- [36] **Bansi, H. W.;** Jodstoffwechsel, Schilddrüse und Hypophysenvorderlappen. *Klinische Wochenschrift: Springer*, 1951, 33-41.
- [37] **Schilddrüse eV.;** *Presstext Juli 2005- Jodmangel und Rauchen - Doppeltes Risiko für die Schilddrüse.*, Stand 2007.
- [38] **Borger, C.;** *Alternative Methoden in der Schweinemast: Untersuchungen zum leistungssteigernden Potential seltener Erden und zur Jodanreicherung im Gewebe durch die Verfütterung von Meeresalgen*. München, 2003.
- [39] **Arthur, J. R., Beckett, G. J. and Mitchell, J. H.;** The interactions between selenium and iodine deficiencies in man and animals. *Nutrition Research Reviews*, 1999, 55-73.
- [40] **Castillo, V. A., Lalia, J. C., Junco, M., Sartorio, G., Marquez, A., Rodriguez, M. S. and Pisarev, M. A.;** Changes in thyroid function in puppies fed a high iodine commercial diet. *Vet J*, 2001, 80-4.
- [41] **Castillo, V. A., Rodriguez, M. S., Lalia, J. C. and Pisarev, M. A.;** Morphologic Changes in the Thyroid Glands of Puppies Fed a High-Iodine Commercial Diet. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine: Therapeutic Solutions*, 2003, 45-50.
- [42] **Cochaux, P., Van Sande, J., Swillens, S. and Dumont, J. E.;** Iodide-induced inhibition of adenylate cyclase activity in horse and dog thyroid. *European Journal of Biochemistry: Blackwell Synergy*, 1987, 435-442.
- [43] **Corvilain, B., Van Sande, J. and Dumont, J. E.;** Inhibition by iodide of iodide binding to proteins: the 'Wolff-Chaikoff' effect is caused by inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 1287-92.
- [44] **Henzen, C., Buess, M. und Brander, L.;** Die Jodinduzierte Hyperthyreose (Jodbasedow): ein aktuelles Krankheitsbild. *Schweiz Med Wochenschr*, 1999, 658-64.
- [45] **Pochet, R., Van Sande, J., Erneux, C. and Dumont, J. E.;** Inhibition of thyroid adenylate cyclase by iodide. *FEBS Lett*, 1977, 33-6.
- [46] **Rendl, J. und Saller, B.;** Schilddrüse und Röntgenkontrastmittel: Pathophysiologie, Häufigkeit und Prophylaxe der jodinduzierten Hyperthyreose. *Dt Ärztebl*, 2001, A402-A406.
- [47] **Taugog, A., Potter, G. D. and Chaikoff, I. L.;** Conversion of inorganic I131 to organic I131 by cell-free preparations of thyroid tissue. *Journal of Biological Chemistry: ASBMB*, 1955, 119-134.
- [48] **Boeynaems, J. M. and Hubbard, W. C.;** Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid. *J Biol Chem*, 1980, 9001-4.

- [49] **Boeynaems, J. M., Reagan, D. and Hubbard, W. C.;** Lactoperoxidase-catalyzed iodination of arachidonic acid: Formation of macrolides. *Lipids: Springer, 1981, 246-249.*
- [50] **Boeynaems, J. M., Pelster, D., Oates, J. A. and Hubbard, W. C.;** Novel transformations of arachidonic acid by the rat thyroid in vitro. *Biochim Biophys Acta, 1981, 623-7.*
- [51] **Chazenbalk, G. D., Pisarev, M. A., Juvenal, G. J., de, Kleiman, Pisarev, D. L., Mercuri, H. and De Tomas, M.;** Biosynthesis and regulation of iodolipids in calf thyroid. *Acta Endocrinol (Copenh), 1985, 72-8.*
- [52] **Dembitsky, V. M. and Srebnik, M.;** Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Prog Lipid Res, 2002, 315-67.*
- [53] **Boeynaems, J. M., Watson, J. T., Oates, J. A. and Hubbard, W. C.;** Iodination of docosahexaenoic acid by lactoperoxidase and thyroid gland in vitro: Formation of an iodolactone. *Lipids: Springer, 1981, 323-327.*
- [54] **Berg, J. P., Glattre, E., Haldorsen, T., Hstmark, A. T., Bay, I. G., Johansen, A. F. and Jellum, E.;** Longchain serum fatty acids and risk of thyroid cancer: A population-based case-control study in Norway. *Cancer Causes and Control: Springer, 1994, 433-439.*
- [55] **Diekmann, H. und Metz, H.;** *Grundlagen und Praxis der Biotechnologie.* Stuttgart: G. Fischer Verlag, 1991.
- [56] **Magnusson, R. P., Taurog, A. and Dorris, M. L.;** Mechanisms of thyroid peroxidase-and lactoperoxidase-catalyzed reactions involving iodide. *Journal of Biological Chemistry, 1984, 13783-13790.*
- [57] **Taurog, A., Dorris, M. L. and Doerge, D. R.;** Mechanism of Simultaneous Iodination and Coupling Catalyzed by Thyroid Peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics: Academic Press, 1996, 24-32.*
- [58] **Schwedt, G.;** *Chromatographische Trennmethoden.* Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1994.
- [59] **Kolb, B.;** *Gaschromatographie in Bildern - Eine Einführung.* Wiley-VCH, 1999.
- [60] **Rödel, W. und Wölm, G.;** *Grundlagen der Gaschromatographie.* Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1982.
- [61] **Hübschmann, H. J.;** *Handbuch der GC/MS - Grundlagen und Anwendung.* Weinheim, VCH-Verlag, 1996.
- [62] **Naumer, H. und Heller, W.;** *Untersuchungsmethoden in der Chemie.* Stuttgart, Thieme Verlag, 1986.
- [63] **Gottwald, W.;** *GC für Anwender.* VCH, 1995.
- [64] **Schomburg, G.;** *Gas chromatography: a practical course.* VCH, 1990.
- [65] **Schomburg, G.;** *Gaschromatographie. Grundlagen.* VCH, 1987.
- [66] **TU Wien.;** *Gaschromatographie.,* Stand 2006.
- [67] **Eppert, G.;** *Einführung in die schnelle Flüssigchromatographie: (Hochdruck-flüssigchromatographie).* Akademie-Verlag Berlin, 1988.

- [68] **Unger, K. K.;** *Handbuch der HPLC, Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker.* GIT Verlag Darmstadt, 1989.
- [69] **Budzikiewicz, H.;** *Massenspektrometrie: Eine Einführung.* Wiley-VCH, 1998.
- [70] **Lohninger, H., Fröhlich, J., Mizaikoff, B. und Rosenberg, E.;** *Instrumentelle Analytik.*, Stand 2006.
- [71] **Kellner, R., Mermet, J. M., Otto, M. and Widmer, H. M.;** *Analytical Chemistry.* Weinheim, Wiley-VCH, 1998.
- [72] **Schwedt, G.;** *Analytische Chemie.* Thieme, 1995.
- [73] **Gaskell, S. J.;** Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, 677-688.
- [74] **Lottspeich, F.;** *Bioanalytik.* Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verl., 1998.
- [75] **Applied Biosystem.;** *Produkt Bulletin: LC-MS.*, 2002.
- [76] **Reeve, R. N.;** *Introduction to Environmental Analysis.* Wiley, 2002.
- [77] **Dean, J. R.;** *Extraction methods for environmental analysis.* Wiley New York, 1998.
- [78] **Arthur, C. L. and Pawliszyn, J.;** Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry: American Chemical Society*, 1990, 2145-2148.
- [79] **Zhang, Z., Yang, M.J. and Pawliszyn, J.;** SPME, a solvent free alternative for sample preparation. *Anal Chem*, 1994, 844A.
- [80] **Sigma-Aldrich Co.;** *Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions (Bulletin 923).*, 1998.
- [81] **Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B.;** *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 6. überarbeitete Auflage.* Stuttgart, Thieme Verlag, 2002.
- [82] **Van den Bergen, H., Daloze, D. and Braekman, J. D.;** Synthesis of Analogues of 2-Iodoheptadecanal, a Regulator of Iodine Metabolism in the Thyroid Gland. *Braz. Chem. Soc.*, 1999, Vol. 10, No. 1, 1 - 12.
- [83] **Klinke, R. und Silbernagl, S.;** *Lehrbuch der Physiologie.* Stuttgart, Thieme Verlag, 1994.
- [84] **Biesalski, H.;** *Ernährungsmedizin, 2. Auflage.*, Stuttgart, Thieme, 1999.
- [85] **Kromidas, S.;** *Validierung in der Analytik.* Weinheim, Wiley-VCH, 1999.
- [86] **Breitmaier, E. und Jung, G.;** *Organische Chemie.* Stuttgart, Thieme, 2005.
- [87] **Deutsches Institut für Normung e.V.;** *DIN 32645 - Chemische Analytik-Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.* Beuth Verlag, Berlin, 1994.
- [88] **Landwirtschafts-Gesells, D.;** *DLG-Futterwerttabellen-Schweine.* DLG-Verlag, 1991.
- [89] **Futtermittel e.V.;** *Ergebnisse eines Monitorings zu Iod-Gehalten im Mischfutter,* (Stand 10.08.2009).
- [90] **Liebich, H. G.;** *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 3. Aufl., Verlag Schattauer, Stuttgart, 1999, 303-324.*

**8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1:	Abschätzung der Iodversorgung weltweit anhand der mittleren unринаlen Iodausscheidung .....	2
Abb. 2:	Strukturen der untersuchten Iodaldehyde und Iodlactone .....	3
Abb. 3:	Iodidaufnahme durch die basolaterale und Schilddrüsenhormonsynthese an der apikalen Zellmembran der Thyreozyten .....	6
Abb. 4:	Bildung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 .....	7
Abb. 5:	Hypothalamisch-hyophysärer Regelkreis.....	8
Abb. 6:	Iodverbindungen der Schilddrüse in Anlehnung an [7] und [13].....	13
Abb. 7:	Biosynthese von 2-Iodhexadecanal .....	14
Abb. 8:	Biosynthese von AA- $\delta$ -IL.....	15
Abb. 9:	Einfluss von Iodaldehyden und Iodlactonen auf die Funktion und das Wachstum einer Schilddrüsenfollikelzelle .....	17
Abb. 10:	Lactoperoxidase .....	20
Abb. 11:	Reaktion von Lactoperoxidase mit Arachidonsäure unter Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und KI.....	21
Abb. 12:	Möglicher Reaktionsweg für die Umsetzung von Lactoperoxidase mit Arachidonsäure unter Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und KI.....	22
Abb. 13:	Aufbau eines Elektroneneinfang-Detektor .....	24
Abb. 14:	Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers.....	28
Abb. 15:	Tröpfchenbildung im Elektrospray-Interface (positiver Modus).....	31
Abb. 16:	Aufbau eines Quadrupol-Massenspektrometers .....	32
Abb. 17:	Aufbau des Triple-Quadrupols im API 2000.....	33
Abb. 18:	Oxidation des Alkohols (n = 12 für HDA, n = 14 für ODA).....	48
Abb. 19:	Iodierung nach van der Bergen et al. und Iodabfangreaktion.....	48
Abb. 20:	Reaktionsgleichung der Synthese nach Kuklev und Smith .....	51
Abb. 21:	Aufarbeitungsschema der Schilddrüsenproben für die Bestimmung der Iodlipide.....	54
Abb. 22:	Zuordnung der Signale im <sup>1</sup> H-NMR von 2-IODA .....	56
Abb. 23:	Zuordnung der Resonanzlinien der <sup>1</sup> H-Spektren zu den Protonen von ODA und 2-IODA .....	57
Abb. 24:	Zuordnung der Signale im <sup>13</sup> C-NMR von 2-IODA .....	58

Abb. 25.:	Zuordnung der Resonanzlinien der $^{13}\text{C}$ -Spektren zu den Kernen von ODA und 2-IODA .....	59
Abb. 26:	Zuordnung der Signale im $^{13}\text{C}$ -APT-Spektrum von 2-IODA.....	59
Abb. 27:	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des AA- $\delta$ -Iodlactons.....	60
Abb. 28:	Zuordnung der Resonanzlinien der $^1\text{H}$ -Spektren zu den Protonen von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL .....	61
Abb. 29:	Zuordnung der Signale im $^{13}\text{C}$ -APT-Spektrum von AA- $\delta$ -IL .....	62
Abb. 30:	Zuordnung der Resonanzlinien der $^{13}\text{C}$ -Spektren zu den Kernen von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL .....	64
Abb. 31:	Massenspektrum 2-IHDA (EI, 70 eV).....	65
Abb. 32:	Fragmentierungsreaktionen von 2-IHDA .....	66
Abb. 33:	Massenspektrum AA- $\delta$ -IL (EI, 70 eV).....	66
Abb. 34:	Fragmentierungsreaktionen von AA- $\delta$ -IL .....	67
Abb. 35:	Produktscan des Ammoniumadduktes von AA- $\delta$ -IL (ESI-MS).....	68
Abb. 36:	Homolytische Zerfallsreaktion der Iodaldehyde.....	70
Abb. 37:	Peakflächenverhältnis von HDA/PCB 101 in Abhängigkeit von der Synthesezeit .....	72
Abb. 38:	Peakflächenverhältnis 2-IHDA/PCB 101 in Abhängigkeit von der eingesetzten Iodmenge.....	73
Abb. 39:	Peakflächenverhältnis von 2-IHDA/PCB 101 in Abhängigkeit von der $\text{HgCl}_2$ -Menge .....	74
Abb. 40:	Einfluss der Injektortemperatur auf die Intensität der Peakflächen von AA- $\delta$ -IL .....	75
Abb. 41:	Einfluss der Injektortemperatur auf die Intensität der Peakflächen von 2-IHDA .....	76
Abb. 42:	Wiederholbarkeit von 2-IHDA (Injektortemperatur 230 °C).....	77
Abb. 43:	Wiederholbarkeit von 2-IHDA (Injektortemperatur 200 °C).....	78
Abb. 44:	Einfluss der Detektortemperatur auf das Peakflächenverhältnis von 2-IHDA/ PCB 101 und 2-IODA/ PCB 101 .....	80
Abb. 45:	Vergrößerte Chromatogramm-Ausschnitte der aufgearbeiteten Proben ....	82
Abb. 46:	Chromatogramm einer nach Aufarbeitungsversuch 2 gereinigten Schilddrüse.....	83
Abb. 47:	Chromatogramm einer nach Aufarbeitungsversuch 3 gereinigten Schilddrüse.....	84

Abb. 48:	Einfluss des Extraktionsvolumens auf die Peakflächen von AA- $\delta$ -IL .....	85
Abb. 49:	Verteilung von 2-IHDA in den Fraktionen der säulenchromatographischen Aufreinigung mit unterschiedlichen Elutionsgemischen .....	88
Abb. 50:	Verteilung von 2-IHDA in den Fraktionen der GPC .....	92
Abb. 51:	GC-ECD-Chromatogrammausschnitte der verschiedenen Clean-up-Schritte .....	93
Abb. 52:	HPLC-Chromatogramm der verschiedenen Clean-up-Schritte .....	94
Abb. 53:	Stabilitätsuntersuchungen von 2-IHDA unter verschiedenen äußeren Bedingungen .....	95
Abb. 54:	Langzeit-Stabilitätsuntersuchungen von 2-IHDA (Feststoff) .....	97
Abb. 55:	Stabilitätsuntersuchung einer 100 ng/ $\mu$ L-Lösung von 2-IHDA (SIM) .....	98
Abb. 56:	Lösungsstabilität von AA- $\delta$ -IL .....	100
Abb. 57:	Kalibrierung HDA (SIM) .....	102
Abb. 58:	Chromatogramm einer ionenchromatographischen Messung von Iodid ..	104
Abb. 59:	Q1-Scan von AA- $\delta$ -IL .....	105
Abb. 61:	LC-Chromatogramm bei Laufmittel Methanol/H <sub>2</sub> O (90/10, v/v) .....	109
Abb. 62:	Einfluss eines Ammoniumformiat-Zusatzes auf die Signalintensität .....	109
Abb. 63:	Einfluss eines Ameisesäure-Zusatzes auf die Signalintensität .....	110
Abb. 64:	Externe Kalibrierung von 2-IHDA mit internem Standard PCB 101 (GC-ECD) .....	116
Abb. 65:	Externe Kalibrierung von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS) .....	116
Abb. 66:	Chromatogramm einer aufgearbeiteten Backendrüse (nativ und mit Dotierung von 2-IHDA) .....	118
Abb. 67:	Standardaddition der Probe SD-IL-1 (Messung 4) .....	119
Abb. 68:	Standardaddition der Probe SD-IA-8 (Messung 1) .....	120
Abb. 69:	Vergleichsdiagramm der Wiederfindungsraten von 2-IHDA am GC-ECD .....	123
Abb. 71:	Zusammenhang zwischen dem Extraktionsvolumen und den ermittelten Wiederfindungsraten von AA- $\delta$ -IL .....	126
Abb. 72:	Zusammenhang zwischen dem ermittelten AA- $\delta$ -IL-Gehalt und dem Schilddrüsengewicht .....	134
Abb-A 1:	Massenspektrum von 2-IODA (70 eV) .....	VII
Abb-A 2:	Massenspektrum von DHA- $\gamma$ -IL (70 eV) .....	VII

Abb-A 3:	Massenspektrum von EPA- $\delta$ -IL (70 eV) .....	VII
Abb-A 4:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS).....	XXII
Abb-A 5:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von DHA- $\gamma$ -IL (LC-MS/MS).....	XXIII
Abb-A 6:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von EPA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS).....	XXIV
Abb-A 7:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-ECD; Flüssiginjektion) .....	XXV
Abb-A 8:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-ECD; Flüssiginjektion).....	XXVI
Abb-A 9:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-ECD; on-column) .....	XXVII
Abb-A 10:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-ECD; on-column) .....	XXVIII
Abb-A 11:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; Fullscan) .....	XXIX
Abb-A 12:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; Fullscan) .....	XXX
Abb-A 13:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; SIM).....	XXXI
Abb-A 14:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; SIM).....	XXXII
Abb-A 15:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Acetonitril).....	XXXIII
Abb-A 16:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (HPLC-UV; Acetonitril).....	XXXIV
Abb-A 17:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Methanol).....	XXXV
Abb-A 18:	Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (HPLC-UV; Methanol).....	XXXVI
Abb-A 19:	Diagramm der Wiederfindungsraten (GC-ECD, Referenzsubstanzen, 2-IODA).....	XXXVIII

Abb-A 20: Diagramm der Wiederfindungsraten (HPLC-UV, Referenzsubstanzen, 2-IHDA).....	XXXIX
Abb-A 21: Diagramm der Wiederfindungsraten (HPLC-UV, Referenzsubstanzen, 2-IODA).....	XXXIX
Abb-A 22: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-1 .....	XLI
Abb-A 23: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-2 .....	XLII
Abb-A 24: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-3 .....	XLII
Abb-A 25: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-4 .....	XLIII
Abb-A 26: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-5 .....	XLIV
Abb-A 27: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-6 .....	XLIV
Abb-A 28: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-7 .....	XLV
Abb-A 29: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-8 .....	XLVI
Abb-A 30: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-1 (2-IHDA).....	XLVII
Abb-A 31: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-2 (2-IHDA).....	XLVIII
Abb-A 32: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-3 (2-IHDA).....	XLIX
Abb-A 33: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-4 (2-IHDA).....	L
Abb-A 34: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-5 (2-IHDA).....	LI
Abb-A 35: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-6 (2-IHDA).....	LII
Abb-A 36: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-7 (2-IHDA).....	LIII
Abb-A 37: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-8 (2-IHDA).....	LIV
Abb-A 38: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-9 (2-IHDA).....	LIV
Abb-A 39: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-10 (2-IHDA).....	LV
Abb-A 40: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-11 (2-IHDA).....	LVI
Abb-A 41: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-12 (2-IHDA).....	LVII

## 9. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Empfohlene Zufuhr von Iod in den verschiedenen Lebensphasen .....	1
Tab. 2:	Übersicht der untersuchten Iodaldehyde und Iodlactone.....	3
Tab. 3:	Halogenempfindlichkeit $S_i$ im ECD [59].....	25
Tab. 4:	Betriebsarten der Tandem-Massenspektrometrie [71, 75].....	33
Tab. 5:	Faserbeschichtungen und ihre Anwendungsbereiche .....	35
Tab. 6:	Chemikalien und Lösungsmittel .....	39
Tab. 7:	Geräteparameter des GC-MS.....	41
Tab. 8:	Retentionszeiten, Umschaltzeiten, Target- und Qualifierionen mit ihren dazugehörigen relativen Intensitäten der SIM-Methode .....	42
Tab. 9:	Arbeitsbedingung GC-ECD (Firma Perkin Elmer) .....	43
Tab. 10:	Arbeitsbedingungen der GC-ECDs (Hewlett Packard) .....	43
Tab. 11:	Methodenparameter der HPLC-DAD (Firma Beckmann).....	44
Tab. 12:	Arbeitsbedingung der HPLC-UV (Firma Varian) .....	45
Tab. 13:	Arbeitsbedingungen der HPLC (Agilent 1100) .....	45
Tab. 14:	Allgemeine Parameter des MS (API 2000) .....	46
Tab. 15:	Substanzspezifische Messbedingungen des API 2000 (positiver Modus).....	46
Tab. 16:	Substanzspezifische Messbedingungen des API 2000 (negativer Modus).....	47
Tab. 17:	Arbeitsbedingungen der Ionenchromatographie.....	47
Tab. 18:	Messbedingung der NMR.....	48
Tab. 19:	Zuordnung und Vergleich der chemischen Verschiebung von 2-IODA ( $^1\text{H-NMR}$ ).....	57
Tab. 20:	Experimentell ermittelte Signalverschiebung im $^{13}\text{C-NMR}$ von ODA und 2-IODA .....	58
Tab. 21:	Experimentell ermittelte Signalverschiebung im $^1\text{H-NMR}$ von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL .....	61
Tab. 22:	Experimentell ermittelte Signalverschiebung im $^{13}\text{C-NMR}$ von Arachidonsäure und AA- $\delta$ -IL .....	63
Tab. 23:	Ermittelte Schmelzpunkte der synthetisierten Chargen.....	69
Tab. 24:	Ermittelte Q-Werte und Tabellenwerte für Trendtest nach Neumann.....	78

Tab. 25:	Nachweis- und Erfassungsgrenze am GC/ECD mit on-column-Injektion .....	79
Tab. 26:	Messwerte zum Einfluss des Extraktionsvolumens.....	85
Tab. 27:	Verwendete Elutionsmittel bzw. Elutionsmittelgemische und ihre Zusammensetzung .....	87
Tab. 28:	Elutionsmittel bzw. Elutionsmittelgemische zur dünn- schichtchromatographischen Auftrennung.....	90
Tab. 29:	Fraktionen der Kieselgelaufreinigung bei der Probenaufarbeitung.....	91
Tab. 30:	Fraktionen der GPC .....	92
Tab. 31:	Auswaagen der Clean-up-Fraktionen .....	93
Tab. 32:	Ermittelte Halbwertszeiten der Iodaldehydlösungen.....	98
Tab. 33:	Trendtest nach Neumann für die Lagerstabilität von AA- $\delta$ -IL .....	101
Tab. 34:	Reinheiten der synthetisierten Chargen .....	103
Tab. 36:	Parameter zur Optimierung der MS-Einstellung .....	106
Tab. 37:	Auflösung der Analytpeaks in Abhängigkeit der Laufmittelzusammensetzung .....	108
Tab. 38:	Konzentrationsbereiche zur Bestimmung der Nachweisgrenzen .....	113
Tab. 39:	Erzielte Nachweisgrenzen ( $x_{NG}$ ) und abgeschätzte Erfassungsgrenzen ( $x_{EG}$ ) .....	114
Tab. 40:	Gemittelte Reststreuungen ( $s_{rest}$ ) und Verfahrensstandardab- weichungen ( $s_{x0}$ ) .....	121
Tab. 41:	Ermittelte Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen der GC-ECD- Messung.....	124
Tab. 42:	Ermittelte Wiederfindungsraten für 2-IHDA in Realproben .....	125
Tab. 43:	Errechnete Konzentrationen der aufgearbeiteten Schilddrüsenproben.....	126
Tab. 44:	Übersicht der ermittelten Iodaldehydkonzentration in den Schilddrüsenproben .....	128
Tab. 45:	Mittlere Probengehalte und Standardabweichungen der Iodaldehyde in den Schilddrüsenproben.....	130
Tab. 46:	Übersicht der ermittelten AA- $\delta$ -IL-Konzentrationen in den Schilddrüsenproben .....	131
Tab. 47:	Mittlere Probengehalte und Standardabweichungen von AA- $\delta$ -IL in den Schilddrüsenproben.....	133

Tab-A 1:	Ermittelte Signalverschiebung im $^1\text{H-NMR}$ von 2-IHDA.....	IV
Tab-A 2:	Ermittelte Signalverschiebung im $^{13}\text{C-NMR}$ von 2-IHDA.....	IV
Tab-A 3:	Chemische Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ von DHA- $\gamma$ -IL.....	V
Tab-A 4:	Chemische Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ von EPA- $\delta$ -IL.....	V
Tab-A 5:	Chemische Verschiebung im $^{13}\text{C-NMR}$ von DHA- $\gamma$ -IL und EPA- $\delta$ -IL....	VI
Tab-A 6:	Abhängigkeit der Umsatzrate von der Synthesezeit.....	VIII
Tab-A 7:	Abhängigkeit der Syntheserate von der Iodmenge.....	VIII
Tab-A 8:	Abhängigkeit der Syntheserate von der $\text{HgCl}_2$ -Menge.....	IX
Tab-A 9:	Einfluss der Injektortemperatur auf die Peakflächen von AA- $\delta$ -IL und 2-IHDA .....	IX
Tab-A 10:	Wiederholbarkeit für 2-IHDA bei Injektortemperatur 230 °C und 200 °C .....	X
Tab-A 11:	Einfluss der Detektortemperatur auf das PFV von 2-IHDA/PCB 101 und 2-IODA/PCB 101 .....	X
Tab-A 12:	Prozentuale Verteilung von 2-IHDA in den Fraktionen der säulenchroma-tographischen Aufreinigung mit unterschiedlichen Elutionsgemischen.....	XI
Tab-A 13:	Prozentuale Verteilung von 2-IHDA und 2-IODA in den Fraktionen der Gelpermeationschromatographie.....	XI
Tab-A 14:	Messwerte zum Vergleich der Effizienz des Clean-ups .....	XII
Tab-A 15:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_1 = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; dunkel, RT) .....	XII
Tab-A 16:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_1 = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; hell, RT).....	XIII
Tab-A 17:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_1 = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; -18 °C).....	XIII
Tab-A 18:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_2 = 0,95 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; dunkel, RT)...	XIV
Tab-A 19:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_2 = 0,95 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; hell, RT) .....	XIV
Tab-A 20:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_2 = 0,95 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; -18 °C) .....	XV
Tab-A 21:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung (Feststoff, Luft) .....	XV
Tab-A 22:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung (Feststoff, Argon).....	XVI
Tab-A 23:	Messwerte für Langzeitstabilitätsuntersuchung von 2-IHDA (Feststoff).....	XVI
Tab-A 24:	Messwerte für Lösungsstabilität von 2-IHDA ( $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) .....	XVII
Tab-A 25:	Messwerte für Stabilitätsuntersuchung von HDA in Abhängigkeit der Konzentration .....	XVII

Tab-A 26: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung von ODA in Abhängigkeit der Konzentration .....	XVII
Tab-A 27: Messwerte für Lösungsstabilität von AA- $\delta$ -IL .....	XVIII
Tab-A 28: Messwerte für Kalibrierung von HDA (SIM).....	XVIII
Tab-A 29: Messwerte für die Bestimmung der Reinheit von 2-IHDA (GC-MS).....	XIX
Tab-A 30: Messwerte für die Bestimmung der Reinheit von 2-IODA (GC-MS).....	XIX
Tab-A 31: Messwerte für Bestimmung der Reinheit von 2-IHDA (IC) .....	XX
Tab-A 32: Messwerte für Bestimmung der Reinheit von 2-IODA (IC) .....	XX
Tab-A 33: Vergleich der Retentionszeiten der Iodlactone bei unterschiedlichen Laufmitteln (LC-MS/MS).....	XXI
Tab-A 34: Messwerte zum Einfluss eines Ammoniumformiatzusatzes auf die Peakflächen der Iodlactone (LC-MS/MS) .....	XXI
Tab-A 35: Messwerte zum Einfluss eines Ameisensäurezusatzes auf die Peakflächen der Iodlactone (LC-MS/MS) .....	XXI
Tab-A 36: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS).....	XXII
Tab-A 37: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für DHA- $\gamma$ -IL (LC-MS/MS).....	XXIII
Tab-A 38: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für EPA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS).....	XXIV
Tab-A 39: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenzen von 2-IHDA und 2-IODA (GC-ECD, Flüssiginjektion).....	XXV
Tab-A 40 : Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-ECD; on-column; Messung 1).....	XXVI
Tab-A 41: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-ECD; on-column; Messung 1).....	XXVII
Tab-A 42: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; Fullscan; Messung 1).....	XXVIII
Tab-A 43: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; Fullscan, Messung 1) .....	XXIX
Tab-A 44: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; SIM; Messung 1) .....	XXX
Tab-A 45: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; SIM; Messung 1) .....	XXXI

Tab-A 46: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Acetonitril; Messung 1) .....	XXXII
Tab-A 47: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (HPLC-UV; Acetonitril; Messung 1) .....	XXXIII
Tab-A 48: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Methanol; Messung 1) .....	XXXIV
Tab-A 49: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für 2-IODA (HPLC-UV; Methanol; Messung 1) .....	XXXV
Tab-A 50: Messwerte für externe Kalibrierung von 2-IHDA (GC-ECD) .....	XXXVI
Tab-A 51: Messwerte für externe Kalibrierung von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS) .....	XXXVI
Tab-A 52: Messwerte für Standardaddition von AA- $\delta$ -IL (SD-IL-1; Messung 4).....	XXXVII
Tab-A 53: Messwerte für Standardaddition von 2-IHDA (SD-IA-8; Messung 1) .....	XXXVII
Tab-A 54: Messwerte für Wiederfindungsraten von 2-IHDA und 2-IODA (GC-ECD; Referenzsubstanzen).....	XXXVII
Tab-A 55: Messwerte für Wiederfindungsraten von 2-IHDA und 2-IODA (HPLC-UV; Referenzsubstanzen) .....	XXXVIII
Tab-A 56: Messwerte für Wiederfindung von 2-IHDA (GC-ECD; Realproben) .....	XL
Tab-A 57: Messwerte für Wiederfindung von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS; Realproben) .....	XL
Tab-A 58: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-1 .....	XLI
Tab-A 59: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-2 .....	XLII
Tab-A 60: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-3 .....	XLIII
Tab-A 61: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-4 .....	XLIII
Tab-A 62: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-5 .....	XLIV
Tab-A 63: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-6 .....	XLV
Tab-A 64: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-7 .....	XLV
Tab-A 65: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-8 .....	XLVI
Tab-A 66: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-1 (2-IHDA) .....	XLVII
Tab-A 67: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-1 (2-IODA) .....	XLVII
Tab-A 68: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-2 (2-IHDA) .....	XLVIII
Tab-A 69: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-2 (2-IODA) .....	XLVIII

Tab-A 70: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-3 (2-IHDA) .....	XLIX
Tab-A 71: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-3 (2-IODA) .....	XLIX
Tab-A 72: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-4 (2-IHDA) .....	L
Tab-A 73: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-4 (2-IODA) .....	L
Tab-A 74: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-5 (2-IHDA) .....	LI
Tab-A 75: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-5 (2-IODA) .....	LI
Tab-A 76: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-6 (2-IHDA) .....	LII
Tab-A 77: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-6 (2-IODA) .....	LII
Tab-A 78: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-7 (2-IHDA) .....	LIII
Tab-A 79: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-7 (2-IODA) .....	LIII
Tab-A 80: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-8 (2-IHDA) .....	LIV
Tab-A 81: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-9 (2-IHDA) .....	LV
Tab-A 82: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-9 (2-IODA) .....	LV
Tab-A 83: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-10 (2-IHDA) .....	LV
Tab-A 84: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-10 (2-IODA) .....	LVI
Tab-A 85: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-11 (2-IHDA) .....	LVI
Tab-A 86: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-11 (2-IODA) .....	LVI
Tab-A 87: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-12 (2-IHDA) .....	LVII
Tab-A 88: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-12 (2-IODA) .....	LVII

**10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

2-IHDA	2-Iodhexadecanal
2-IODA	2-Iodoctadecanal
AA	Arachidonsäure
AA- $\delta$ -IL	Arachidonsäure- $\delta$ -Iodlacton
CAD	<i>Collision Gas</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CEP	<i>Collision Cell Entrance Potential</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CW	Carbowax
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
DHA	Docosahexaensäure
DHA- $\gamma$ -IL	Docosahexaensäure- $\gamma$ -Iodlacton
DP	<i>Declustering Potential</i>
DVB	Divinylbenzene
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
EPA	Eicosapentaensäure
EPA- $\delta$ -IL	Eicosapentaensäure- $\delta$ -Iodlacton
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FIA	Flussinjektionsanalyse
FP	<i>Focusing Potential</i>
fT <sub>3</sub>	freies Triiodthyronin
fT <sub>4</sub>	freies Thyroxin
GC	Gaschromatograph
GPC	Gelpermeationschromatographie
GS1	<i>Ion Source Gas 1</i>
GS2	<i>Ion Source Gas 2</i>

HDA	n-Hexadecanal
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IGF-I	<i>Insulin like growth factor I</i>
ISTD	Interner Standard
LC	Flüssigkeitschromatographie
m	Multipllett
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ODA	n-Octadecanal
PA	Polyacrylat
PCB 101	2,2',4,5,5'-Pentachlorbiphenyl
PCB 209	Decachlorbiphenyl
PCC	Pyridium-chlorochromat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFV	Peakflächenverhältnis
RT	Raumtemperatur
rT <sub>3</sub>	<i>reverse triiodthyronine</i>
SC	Säulenchromatographie
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SPE	Festphasenextraktion
SPME	Festphasenmikroextraktion
t	Tripllett
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TEM	Temperatur
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TMS	Tetramethylsilan
TPO	Schilddrüsenspezifische Peroxidase
TRH	<i>thyreotropin releasing hormone</i>
TSH	Schilddrüsen-stimulierendes Hormon
UV	Ultraviolett

## II. ANHANG

Tab-A 1: Ermittelte Signalverschiebung im  $^1\text{H}$ -NMR von 2-IHDA

chemische Verschiebung [ppm]	Signaltyp (Kopplungskonstante)	Protonenzahl
9,25	d (3,2 Hz)	1
4,45	dt ( 7,3 Hz; 3,2 Hz)	1
1,94	m	2
1,25	m	24
0,87	t (7,0 Hz)	3

Tab-A 2: Ermittelte Signalverschiebung im  $^{13}\text{C}$ -NMR von 2-IHDA

chemische Verschiebung [ppm]	Signaltyp
191,742	-C=O
36,738	-CH <sub>2</sub> -C=O
32,161	-CH <sub>2</sub> -
31,881	
29,636	
29,617	
29,604	
29,586	
29,530	
29,422	
29,366	
29,311	
29,241	
28,801	
22,647	
14,070	-CH <sub>3</sub>

**Tab-A 3: Chemische Verschiebung im  $^1\text{H}$ -NMR von DHA- $\gamma$ -IL**

chemische Verschiebung [ppm]	Signaltyp (Kopplungskonstante)	Protonenzahl
0,97	t (7,5 Hz)	3
2,08	m	3
2,40	m	1
2,56	m	1
2,69	m	1
2,80-2,88	m	10
4,13	m	1
4,25	m	1
5,28-5,44	m	9
5,55	m	1

**Tab-A 4: Chemische Verschiebung im  $^1\text{H}$ -NMR von EPA- $\delta$ -IL**

chemische Verschiebung [ppm]	Signaltyp (Kopplungskonstante)	Protonenzahl
0,92	t (7,5 Hz)	3
1,67-2,12	m	6
2,21-2,68	m	2
2,69-2,90	m	8
3,82-3,97	m	1
3,99-4,14	m	1
5,16-5,60	m	8

Tab-A 5: Chemische Verschiebung im  $^{13}\text{C}$ -NMR von DHA- $\gamma$ -IL und EPA- $\delta$ -IL

chemische Verschiebung [ppm]		Signaltyp
DHA- $\gamma$ -IL	EPA- $\delta$ -IL	
14,60	14,20	-CH <sub>3</sub>
20,80	18,10	-CH <sub>2</sub> -
25,80	20,40	
25,90	25,40	
26,00	25,50	
26,10	25,80	
27,60	27,90	
28,80	29,40	
34,90	34,30	
38,00	36,90	-CH-I
81,00	80,70	-CH- (in Lactonring)
127,00	126,80	-CH-
127,30	126,90	
127,60	127,30	
128,10	127,60	
128,20	128,50	
128,70	128,60	
128,90	131,20	
129,00	131,90	
131,80		
132,30		
176,40	170,30	-C=O

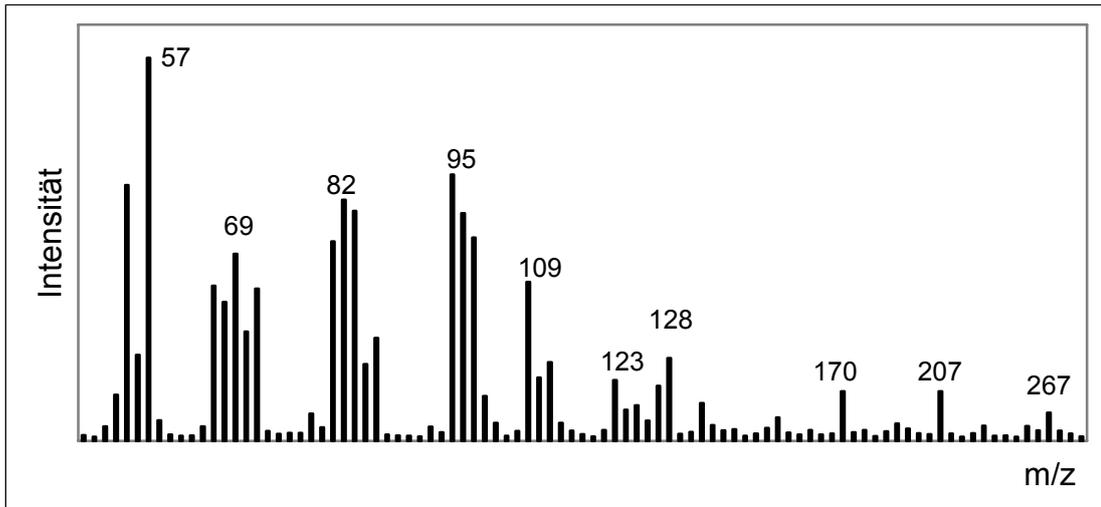


Abb-A 1: Massenspektrum von 2-IODA (70 eV)

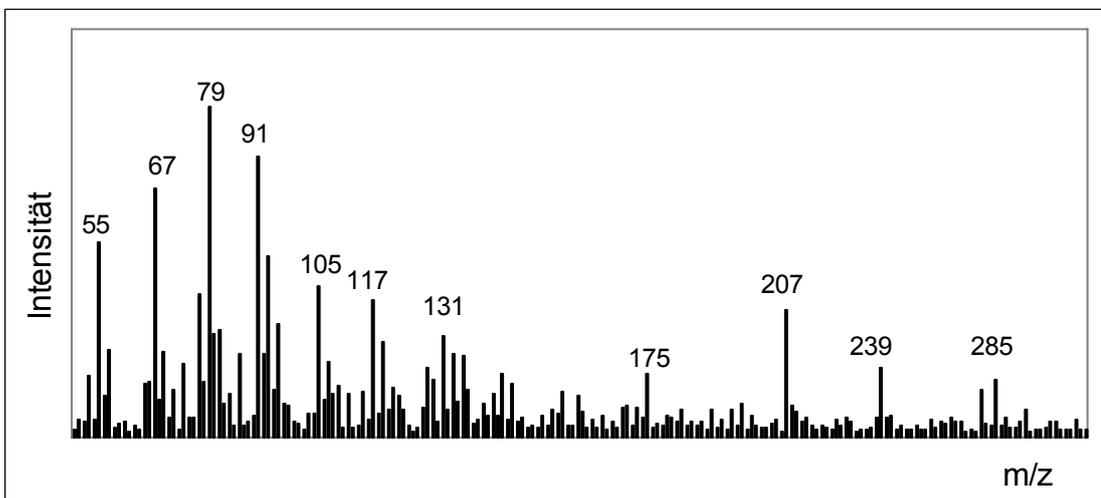


Abb-A 2: Massenspektrum von DHA- $\gamma$ -IL (70 eV)

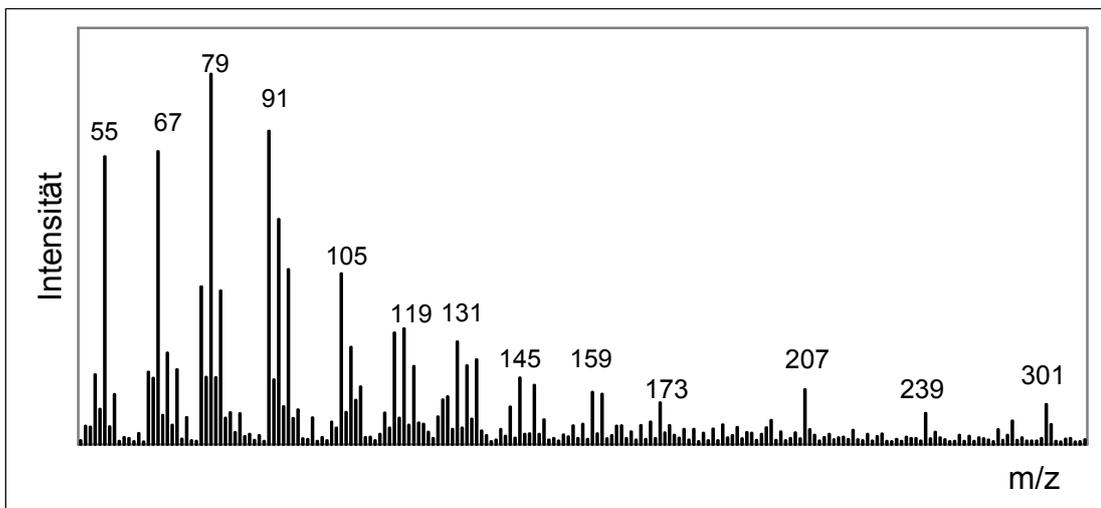


Abb-A 3: Massenspektrum von EPA- $\delta$ -IL (70 eV)

**Tab-A 6: Abhängigkeit der Umsatzrate von der Synthesezeit**

Synthesezeit [h]	Konzentration HDA [ng/μL]	Peakfläche		Mittelwert PFV
		PCB 101	HDA <sub>kor.</sub>	
2,0	1,04	16782	27695	1,63
		17763	28650	
4,0	1,03	17551	11902	0,68
		17243	11629	
6,0	1,00	16415	6297	0,39
		16221	6277	
8,0	1,04	15725	5870	0,37
		16298	6035	
10,0	1,08	16246	5414	0,34
		16394	5533	
16,5	1,02	15939	5558	0,35
		15912	5853	
20,0	1,01	16395	5659	0,35
		16920	5882	
25,0	0,98	15839	5126	0,33
		15811	5301	

**Tab-A 7: Abhängigkeit der Syntheserate von der Iodmenge**

Einwaage I <sub>2</sub> [mg]	Konzentration HDA [ng/μL]	Peakfläche		Mittelwert PFV
		PCB 101	HDA <sub>kor.</sub>	
137	2,278	447806	318893	0,90
		510306	458757	
		615103	672007	
152	2,206	622857	569447	0,98
		469120	493060	
169	1,998	504190	564349	1,12
		487150	547998	
192	2,150	509655	567273	1,12
		412932	467927	

**Tab-A 8: Abhängigkeit der Syntheserate von der HgCl<sub>2</sub>-Menge**

Einwaage HgCl <sub>2</sub> [mg]	Konzentration HDA [ng/μL]	Peakfläche		Mittelwert PFV
		PCB 101	HDA kor.	
73	2,008	494917	560177	1,21
		610914	798058	
80	2,026	478509	597410	1,27
		646793	854435	
95	2,026	658164	837443	1,27
		567089	740351	
109	2,044	522435	656954	1,26
		508932	666113	

**Tab-A 9: Einfluss der Injektortemperatur auf die Peakflächen von AA-δ-IL und 2-IHDA**

Injektortemperatur [°C]	Peakfläche AA-δ-IL	Peakfläche 2-IHDA
300	72762	29228
290	71541	45552
280	75564	57856
270	85268	64427
260	78609	87534
250	68367	107936
240	64609	120638
230	59685	152610
220	46552	145816
210	43998	118410
200	30056	67151
190	-	29712
180	-	17791

**Tab-A 10: Wiederholbarkeit für 2-IHDA bei Injektortemperatur 230 °C und 200 °C**

Messung	Peakfläche 2-IHDA	
	Injektortemperatur 230 °C	Injektortemperatur 200 °C
1	(196670)	16935
2	142805	21502
3	160839	23392
4	146110	30574
5	149102	47100
6	155346	61846
7	162476	66115
8	170647	74631
9	180318	101809
10	177858	93668
11	177554	96225
12	173841	99637
13	167597	116244
14	154089	105375
15	169998	123449

(...) ...Ausreißer nach Nalimov

**Tab-A 11: Einfluss der Detektortemperatur auf das PFV von 2-IHDA/PCB 101 und 2-IODA/PCB 101**

Detektortemperatur [°C]	Peakflächenverhältnis	
	2-IHDA/ PCB 101	2-IODA/ PCB 101
250	1,3678	0,4668
260	1,4118	0,4947
270	1,3983	0,5025
280	1,3478	0,4940
290	1,2809	0,4655
300	1,2367	0,4510

**Tab-A 12: Prozentuale Verteilung von 2-IHDA in den Fraktionen der säulenchromatographischen Aufreinigung mit unterschiedlichen Elutionsgemischen**

Fraktion	prozentualer Anteil von 2-IHDA an Gesamtfläche [%]			
	Hexan/ EE (9:1)	Hexan/ EE (8:2)	Hexan/ EE (7:3)	Hexan/ EE (6:4)
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	1,19	29,67	42,52
4	35,40	37,95	52,49	36,78
5	43,27	45,36	2,20	15,05
6	15,07	13,19	3,93	4,07
7	4,45	1,78	1,31	1,13
8	1,81	0,54	0,40	0,44
9	0,71	0,00	0,00	0,30
10	0,00	0,00	0,00	0,27
gesamt	100,00	100,00	100,00	100,00

**Tab-A 13: Prozentuale Verteilung von 2-IHDA und 2-IODA in den Fraktionen der Gel-permeationschromatographie**

Fraktion	prozentualer Anteil an Gesamtfläche [%]			
	Referenzsubstanz		Schilddrüsenprobe	
	2-IHDA	2-IODA	2-IHDA	2-IODA
1	0,00	0,00	1,93	5,09
2	0,00	0,00	1,62	4,89
3	0,00	0,00	1,86	5,67
4	0,06	0,07	1,42	4,58
5	75,41	90,73	48,72	51,76
6	24,44	9,15	39,36	17,11
7	0,05	0,02	2,16	6,02
8	0,00	0,00	1,53	4,88
9	0,04	0,03	1,40	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
gesamt	100,00	100,00	100,00	100,00

**Tab-A 14: Messwerte zum Vergleich der Effizienz des Clean-ups**

Clean-up-Verfahren	PFV	
	2-IHDA	2-IODA
SC	0,1265	17,22
GPC	0,2302	24,07
GPC/SC	0,1571	15,54

**Tab-A 15: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_1 = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; dunkel, RT)**

Zeit [h]	Peakfläche		Mittelwert PFV
	PCB 101	2-IHDA	
0,4	441859	488386	1,10
	471931	516014	
20,4	355771	387105	1,13
	443349	523570	
68,0	445253	562140	1,20
	488504	551110	
169,0	512437	587846	1,19
	535304	662213	
218,2	702079	853444	1,14
	732454	786345	
381,0	660068	782592	1,14
	577007	635821	
525,1	513603	635123	1,20
	527253	608482	

**Tab-A 16: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_1 = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; hell, RT)**

Zeit [h]	Peakfläche		Mittelwert PFV
	PCB 101	2-IHDA	
0,4	441859	488386	1,10
	471931	516014	
23,4	408401	360802	0,87
	659979	563277	
47,6	505385	374841	0,73
	405899	289307	
70,3	469350	298531	0,62
	464950	276232	
144,4	427077	53096	0,14
	494532	81203	
167,5	317991	32003	0,11
	488592	55646	
383,2	500131	26844	0,04
	625789	16223	

**Tab-A 17: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_1 = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; -18 °C)**

Zeit [h]	Peakfläche		Mittelwert PFV
	PCB 101	2-IHDA	
0,4	441859	488386	1,10
	471931	516014	
73,1	458800	527196	1,16
	474458	556696	
189,4	345224	350539	1,13
	499399	622935	
337,3	574171	684010	1,19
	577470	682320	
500,5	444264	494545	1,11
	486240	539765	

**Tab-A 18: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_2 = 0,95 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; dunkel, RT)**

Zeit [h]	Peakfläche		Mittelwert PFV
	PCB 101	2-IHDA	
0,4	434195	484348	1,11
	352868	389180	
68,9	564802	729314	1,28
	555954	702442	
142,9	482573	633669	1,29
	537020	683434	
219,8	576681	623689	1,10
	457319	514126	
335,5	729715	847850	1,16
507,2	608889	751899	1,26
	691915	885407	

**Tab-A 19: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung ( $c_2 = 0,95 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; hell, RT)**

Zeit [h]	Peakfläche		Mittelwert PFV
	PCB 101	2-IHDA	
0,4	434195	484348	1,11
	352868	389180	
24,8	612834	558932	0,91
	546797	494046	
49,0	440371	41298	0,08
	494944	36089	
71,7	498022	19212	0,04
	577927	22886	
146,8	695674	7597	0,01
	646653	8992	
192,7	577391	7015	0,01

**Tab-A 20: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung (c2 = 0,95 µg/µL; -18 °C)**

Zeit [h]	Peakfläche		Mittelwert PFV
	PCB 101	2-IHDA	
0,4	434195	484348	1,11
	352868	389180	
51,8	447825	447825	1,00
	439904	439904	
74,5	464968	464968	1,00
	617445	617445	
193,8	413586	498269	1,23
	427397	534061	
340,3	521001	601093	1,25
	590274	791717	
505,2	386352	479567	1,18
	484464	543678	

**Tab-A 21: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung (Feststoff, Luft)**

Zeit [h]	Konzentration [ng/µL]	Peakfläche		Mittelwert PFV
		PCB 101	2-IHDA <sub>kor.</sub>	
0,5	1,90	441859	488497	1,10
		471931	516131	
92,8	1,99	419378	414531	1,08
		504905	587879	
116,5	2,03	433093	466316	1,10
		452192	508814	
306,3	2,03	576765	578124	1,06
		605678	681311	
452,4	1,97	469750	551197	1,17

**Tab-A 22: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung (Feststoff, Argon)**

Zeit [h]	Konzentration [ng/μL]	Peakfläche		Mittelwert PFV
		PCB 101	2-IHDA <sub>kor.</sub>	
0,5	1,90	441859	488497	1,10
		471931	516131	
94,5	2,06	355771	356644	1,05
		443349	482370	
187,2	1,80	469287	454434	1,09
		456393	485151	
		577800	639764	
308,6	1,95	544775	543491	1,08
		732764	814095	
		654940	749580	
454,3	1,86	363845	379535	1,08
		422168	471637	

**Tab-A 23: Messwerte für Langzeitstabilitätsuntersuchung von 2-IHDA (Feststoff)**

Woche	Peakfläche		PFV
	2-IHDA	PCB 101	
1	2631420	8981390	0,2930
2	2935680	7727030	0,3799
3	3152580	9124310	0,3455
4	2733650	9622290	0,2841
5	2786730	9730450	0,2864
6	3138690	9009140	0,3484
7	3612230	11792900	0,3063
8	4416260	12416100	0,3557
9	4366440	12877200	0,3391
10	3925860	12449000	0,3154
11	3693930	10787700	0,3424
12	3634260	10395900	0,3496

**Tab-A 24: Messwerte für Lösungsstabilität von 2-IHDA (c = 100 ng/μL)**

Tag	Peakfläche				PFV	PFV Stamm
	PCB 101	PCB Stamm	2-IHDA	2-IHDA Stamm		
1	10584600	10584600	4391330	4391330	0,4149	0,4149
7	11010200	12672700	4320090	4598630	0,3924	0,3629
10	10992100	9996670	3943730	3687940	0,3588	0,3689
13	11663200	10905500	3892460	3752770	0,3337	0,3441
20	12973100	11895300	3702450	3841580	0,2854	0,3230
23	14839900	9512850	3802140	2568410	0,2562	0,2700
27	10704500	9550300	2479650	2434250	0,2317	0,2549

**Tab-A 25: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung von HDA in Abhängigkeit der Konzentration**

Tag	Mittelwert Peakflächenverhältnis HDA/ PCB 101		
	200 pg/μL	1 ng/μL	10 ng/μL
1	10,64	0,25	2,58
2	8,45	0,20	2,61
3	6,49	0,17	-
4	-	-	2,56

**Tab-A 26: Messwerte für Stabilitätsuntersuchung von ODA in Abhängigkeit der Konzentration**

Tag	Mittelwert Peakflächenverhältnis ODA/ PCB 101	
	11 ng/μL	55 ng/μL
1	0,26	1,32
2	0,21	1,33
3	-	1,37
5	0,18	-

**Tab-A 27: Messwerte für Lösungsstabilität von AA- $\delta$ -IL**

Tag	Peakfläche AA- $\delta$ -IL	
	aus Urlösung	aus Verdünnungslösung c2
1	12233	12233
2	12133	10263
3	12300	7106
4	11800	5190
5	12067	4000

**Tab-A 28: Messwerte für Kalibrierung von HDA (SIM)**

Konzentration HDA [ng/ $\mu$ L]	Peakfläche		PFV 2-IHDA /PCB 101
	PCB 101	2-IHDA	
10	10149210	7887280	0,778
20	13496350	16515050	1,224
30	12168550	24179100	1,987
40	14255833	33927333	2,380
50	12865667	40421966	3,142
60	13091900	47810433	3,652
70	13698933	54324200	3,970
80	12951733	59446633	4,594
90	14173533	65878000	4,651
100	13034533	66155200	5,076

**Tab-A 29: Messwerte für die Bestimmung der Reinheit von 2-IHDA (GC-MS)**

<b>c Gemisch [ng/μL]</b>	<b>PFV HDA/PCB 101</b>	<b>berechnete c<sub>HDA</sub> [ng/μL]</b>	<b>Reinheit [%]</b>
245,1	0,28	11,1	95,5
212,0	0,30	11,8	94,4
225,2	0,31	12,1	94,6
214,1	0,29	11,3	94,7
220,2	0,30	11,8	94,6
211,5	0,28	11,1	94,8
224,6	0,27	10,5	95,3
227,4	0,31	11,9	94,8
225,7	0,37	14,2	93,7
218,3	0,35	13,7	93,7

**Tab-A 30: Messwerte für die Bestimmung der Reinheit von 2-IODA (GC-MS)**

<b>c Gemisch [ng/μL]</b>	<b>PFV ODA/PCB 101</b>	<b>berechnete c<sub>ODA</sub> [ng/μL]</b>	<b>Reinheit [%]</b>
2200	0,70	219,7	90,0
1620	0,63	196,0	87,9
1450	0,56	173,7	88,0
1180	0,36	112,8	90,4
1550	0,50	154,4	90,0
1710	0,61	188,9	89,0
2000	0,92	285,7	85,7
1520	0,61	189,0	87,6
1250	0,46	144,3	88,5

Tab-A 31: Messwerte für Bestimmung der Reinheit von 2-IHDA (IC)

Einwaage I <sub>2</sub> [mg]	Einwaage HDA [mg]	Fläche	errechn. Konz. $\Gamma$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	nicht umge- setztes I <sub>2</sub> [mg]	Reinheit 2-IHDA [%]
164	130	481631	15,05	-0,06	111,1
165	130	612832	18,59	-0,03	106,1
166	130	625183	18,93	-0,04	106,9
163	130	651200	19,63	-0,05	101,3
163	130	763114	22,66	0,03	95,8
165	130	612813	18,59	-0,04	106,1
163	130	597696	18,18	-0,03	103,9
166	130	642402	19,39	-0,04	106,1
163	130	657233	19,79	-0,01	101,0
166	130	818033	24,14	0,02	97,5
165	130	860456	25,29	0,03	93,9

Tab-A 32: Messwerte für Bestimmung der Reinheit von 2-IODA (IC)

Einwaage I <sub>2</sub> [mg]	Einwaage ODA [mg]	Fläche	errechn. Konz. $\Gamma$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	nicht umge- setztes I <sub>2</sub> [mg]	Reinheit 2-IODA [%]
168	149	834921	24,60	0,03	94,4
170	150	522119	16,14	-0,06	110,8
170	150	708149	21,17	-0,01	101,9
170	150	441208	13,95	-0,08	114,6
173	150	730707	21,78	-0,03	105,1
170	151	744302	22,15	0,01	98,9
168	149	553663	16,99	-0,04	107,8
169	152	664769	20,00	0,00	99,9

**Tab-A 33: Vergleich der Retentionszeiten der Iodlactone bei unterschiedlichen Laufmitteln (LC-MS/MS)**

Elutionsmittel	Retentionszeit [min]		
	EPA- $\delta$ -IL	AA- $\delta$ -IL	DHA- $\gamma$ -IL
100 % Methanol	2,14	2,32	2,28
95 % Methanol, 5 % H <sub>2</sub> O	2,88	3,32	3,37
90 % Methanol, 10 % H <sub>2</sub> O	4,63	5,81	6,17

**Tab-A 34: Messwerte zum Einfluss eines Ammoniumformiatzusatzes auf die Peakflächen der Iodlactone (LC-MS/MS)**

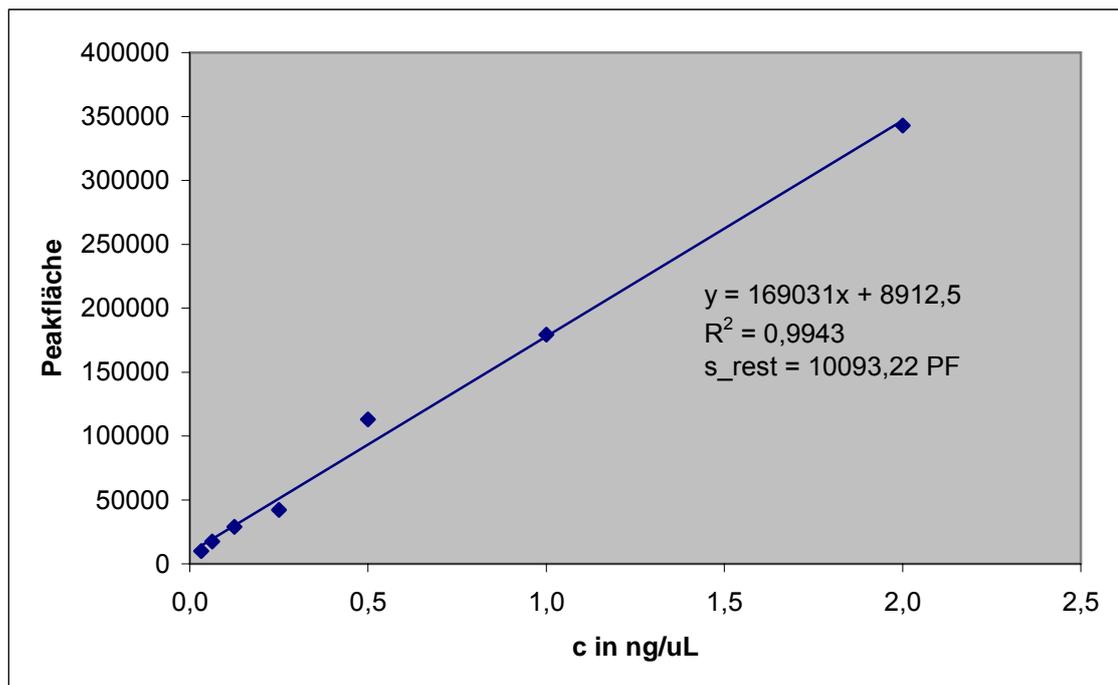
Gehalt in Laufmittel	mittlere Peakfläche			
	0,0 mM	0,2 mM	0,5 mM	1,0 mM
<b>Substanz</b>				
AADIL_QF	346000	489600	458800	305250
AADIL	609500	876000	814600	548250
DHAGIL_QF	78800	139980	143200	143250
DHAGIL	149500	258200	267600	261250
EPADIL	764000	1199800	1114600	742250
EPADIL_QF	243000	379400	344000	243750

**Tab-A 35: Messwerte zum Einfluss eines Ameisensäurezusatzes auf die Peakflächen der Iodlactone (LC-MS/MS)**

Gehalt in Laufmittel	mittlere Peakfläche			
	0,00 %	0,09 %	0,18 %	0,45 %
<b>Substanz</b>				
AADIL_QF	482500	296900	219100	135500
AADIL	844639	383800	283900	158480
DHAGIL_QF	150111	55690	54940	47610
DHAGIL	284639	135710	133600	130600
EPADIL	1190528	524500	391300	220000
EPADIL_QF	378611	218900	159400	103710

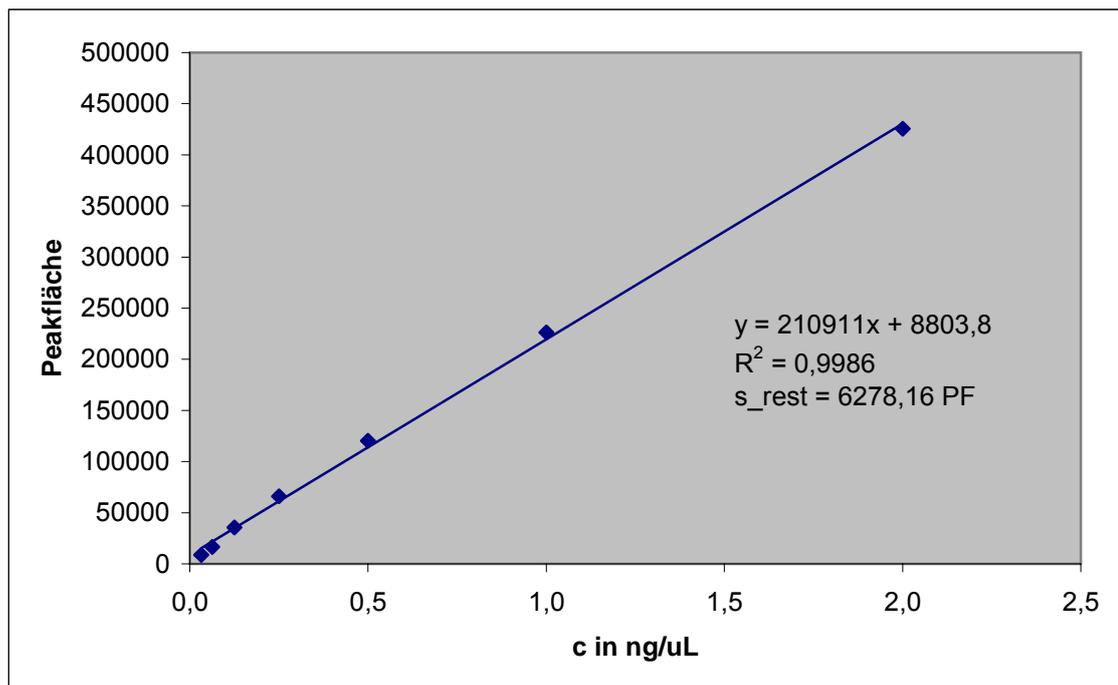
Tab-A 36: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS)

Konz. [ng/ $\mu$ L]	Peakfläche					Mittelwert Peakfläche
	1	2	3	4	5	
0,03125	11200	9940	9300	8900	10200	9908
0,06250	18000	17600	17500	17000	17200	17460
0,12500	34000	28500	28600	27000	26000	28820
0,25000	45100	43700	41800	40600	39000	42040
0,50000	114000	125000	109000	111000	106000	113000
1,00000	185000	178000	173000	170000	190000	179200
2,00000	346000	347000	348000	343000	330000	342800
3,00000	213000	186000	181000	168000	166000	182800
4,00000	395000	384000	390000	372000	360000	380200
5,00000	433000	423000	412000	404000	394000	413200

Abb-A 4: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS)

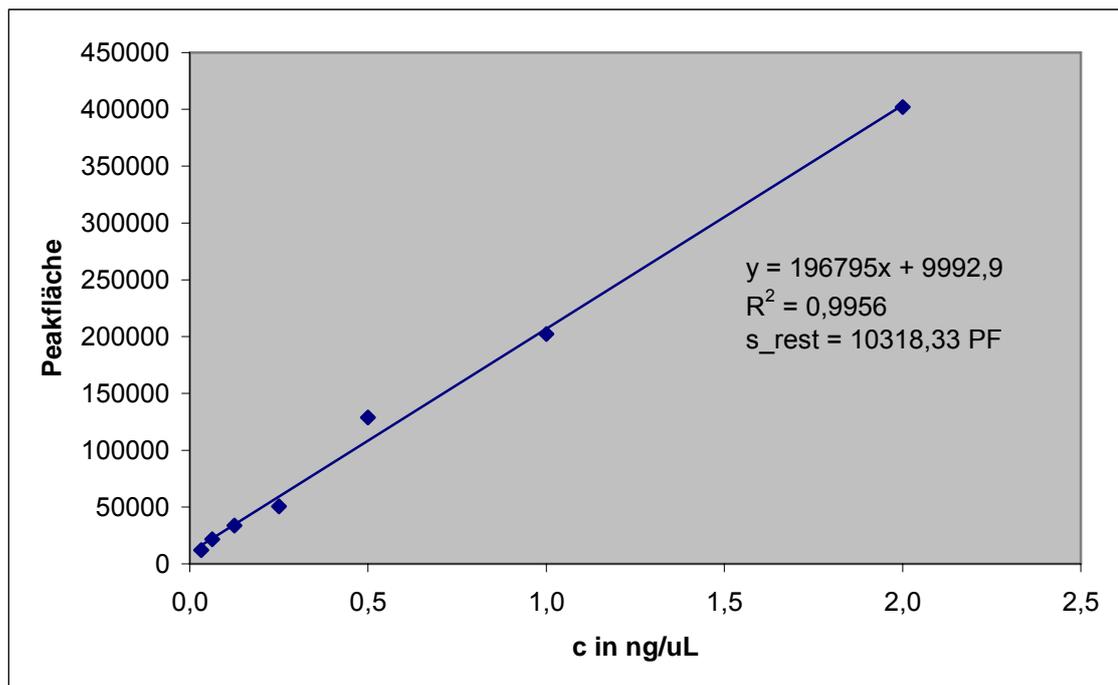
Tab-A 37: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für DHA- $\gamma$ -IL (LC-MS/MS)

Konz. [ng/ $\mu$ L]	Peakfläche					Mittelwert Peakfläche
	1	2	3	4	5	
0,03125	8390	8500	7980	9280	9750	8780
0,06250	17100	17000	16100	15900	16000	16420
0,12500	38600	36900	33800	34200	34100	35520
0,25000	63800	66100	70500	64100	65300	65960
0,50000	121000	122000	119000	120000	119000	120200
1,00000	230000	222000	225000	229000	225000	226200
2,00000	416000	424000	425000	431000	432000	425600
3,00000	605000	606000	613000	599000	610000	606600
4,00000	790000	798000	812000	809000	808000	803400
5,00000	965000	956000	964000	979000	957000	964200

Abb-A 5: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von DHA- $\gamma$ -IL (LC-MS/MS)

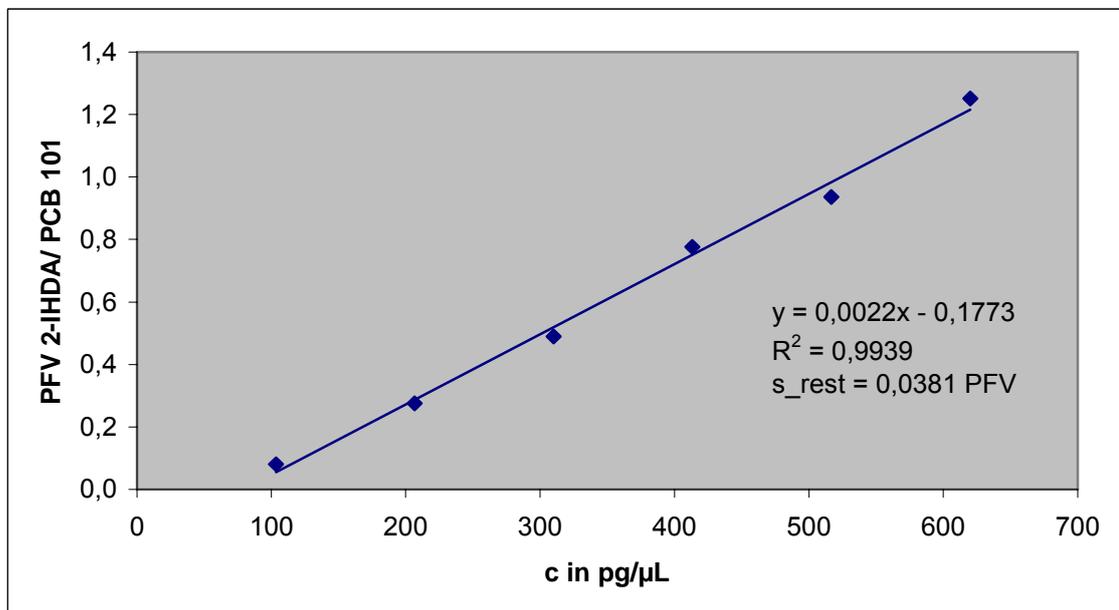
Tab-A 38: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für EPA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS)

Konz. [ng/ $\mu$ L]	Peakfläche					Mittelwert Peakfläche
	1	2	3	4	5	
0,03125	12800	12600	11800	11800	11900	12180
0,06250	22400	22400	21500	21500	20400	21640
0,12500	34800	36900	32200	32100	32200	33640
0,25000	53400	52200	54800	46900	45300	50520
0,50000	147000	128000	124000	123000	122000	128800
1,00000	203000	205000	200000	217000	186000	202200
2,00000	403000	403000	394000	391000	419000	402000
3,00000	240000	238000	224000	218000	208000	225600
4,00000	450000	431000	457000	432000	425000	439000
5,00000	497000	495000	480000	459000	427000	471600

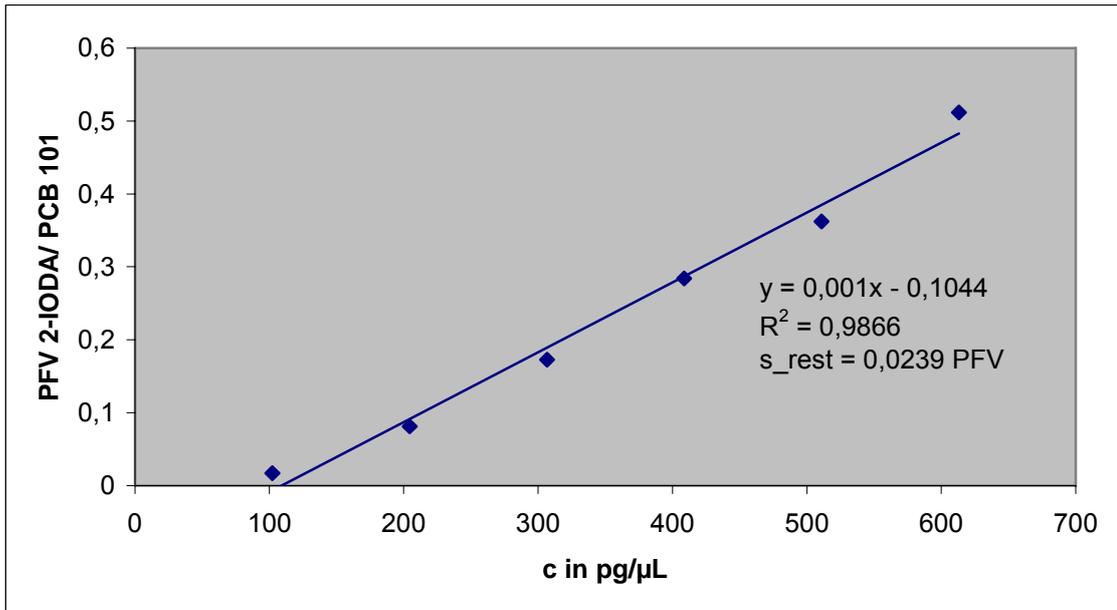
Abb-A 6: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von EPA- $\delta$ -IL LC-MS/MS)

**Tab-A 39: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenzen von 2-IHDA und 2-IODA (GC-ECD, Flüssiginjektion)**

Konz. [pg/ $\mu$ L]	Peakfläche			PFV	
	PCB 101	2-IHDA	2-IODA	2-IHDA	2-IODA
100	132127	10670	2277	0,0808	0,0172
200	135151	37243	11004	0,2756	0,0814
300	134201	65703	23155	0,4896	0,1725
400	134245	104218	38109	0,7763	0,2839
500	135147	126573	48978	0,9366	0,3624
600	132829	166238	67947	1,2515	0,5115



**Abb-A 7: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-ECD; Flüssiginjektion)**



**Abb-A 8: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-ECD; Flüssiginjektion)**

**Tab-A 40 : Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-ECD; on-column; Messung 1)**

Konz. [ $\text{pg}/\mu\text{L}$ ]	Peakfläche		PFV
	PCB 101	2-IHDA	
18,9	14946	387	0,0259
40,5	14417	4024	0,2791
59,4	12095	5800	(0,4796)
81,0	13930	6076	0,4362
99,9	12987	6109	(0,4704)
118,8	15490	11196	0,7228
140,4	10454	11309	(1,0817)
159,3	11841	13084	1,1050
180,9	12880	15644	1,2145
199,8	14092	19315	1,3706

(...) ...Ausreißer

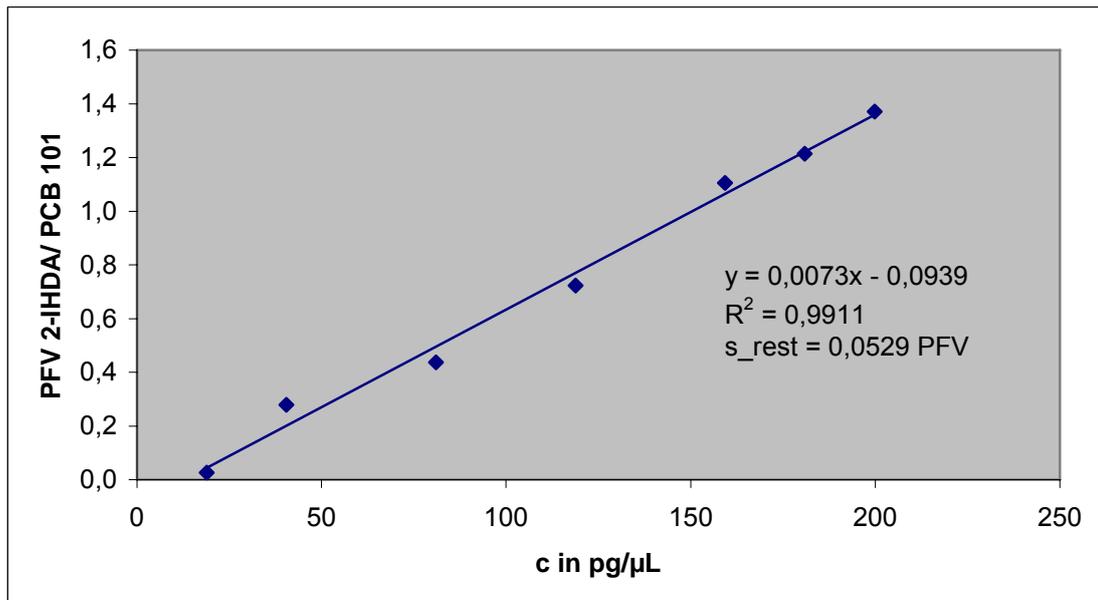
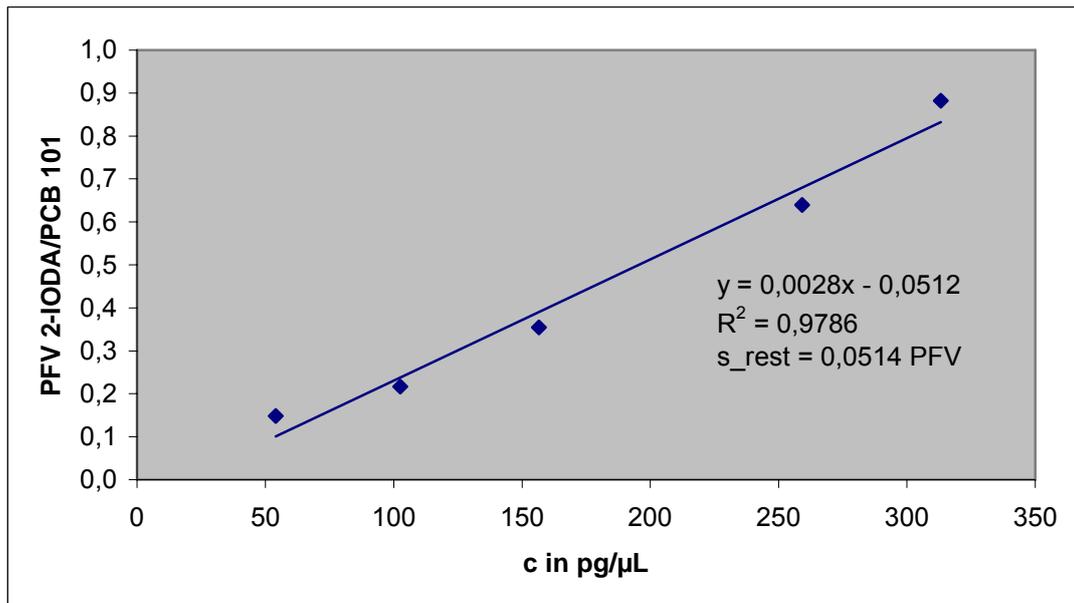


Abb-A 9: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-ECD; on-column)

Tab-A 41: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-ECD; on-column; Messung 1)

Konz. [pg/μL]	Peakfläche		PFV
	PCB 101	2-IODA	
54,0	2043	303	0,1483
102,6	2562	555	0,2168
156,6	2234	793	0,3548
205,2	2199	701	(0,3188)
259,2	2413	1543	0,6394
313,2	2419	2134	0,8821

(...) ...Ausreißer

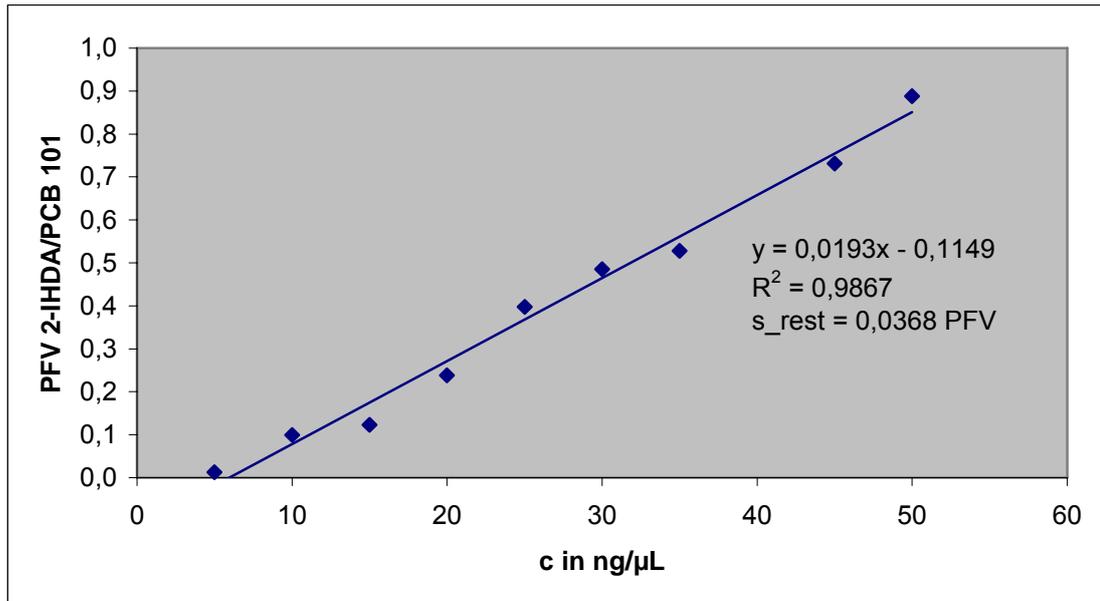


**Abb-A 10: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-ECD; on-column)**

**Tab-A 42: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; Fullscan; Messung 1)**

Konz. [ng/µL]	Peakfläche		PFV
	PCB 101	2-IHDA	
5,0	1454720	18666	0,0128
10,0	816565	81310	0,0996
15,0	1131690	139529	0,1233
20,0	1113560	264930	0,2379
25,0	1003730	398812	0,3973
30,0	1082480	525392	0,4854
35,0	1142710	603591	0,5282
40,0	1310430	1108840	(0,8462)
45,0	1444490	1056620	0,7315
50,0	1396970	1240840	0,8882

(...) ...Ausreißer

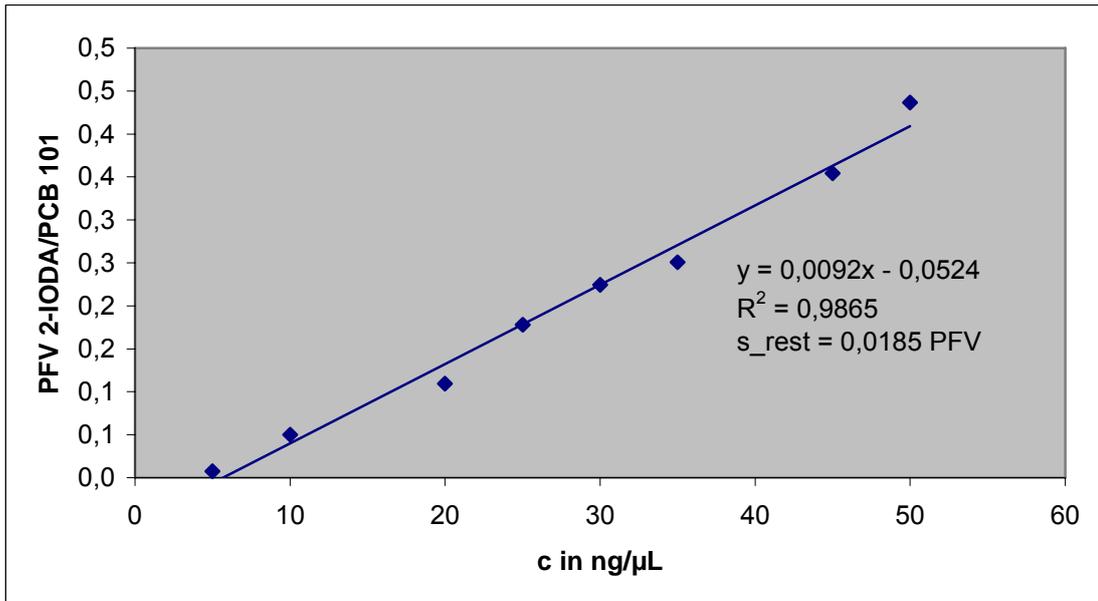


**Abb-A 11: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; Fullscan)**

**Tab-A 43: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; Fullscan, Messung 1)**

Konz. [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	Peakfläche		PFV
	PCB 101	2-IODA	
5,0	1454720	10831	0,0074
10,0	816565	40987	0,0502
15,0	1131690	53268	(0,0471)
20,0	1113560	121883	0,1095
25,0	1003730	178872	0,1782
30,0	1082480	242976	0,2245
35,0	1142710	286422	0,2507
40,0	1310430	537096	(0,4099)
45,0	1444490	511761	0,3543
50,0	1396970	609910	0,4366

(...) ...Ausreißer

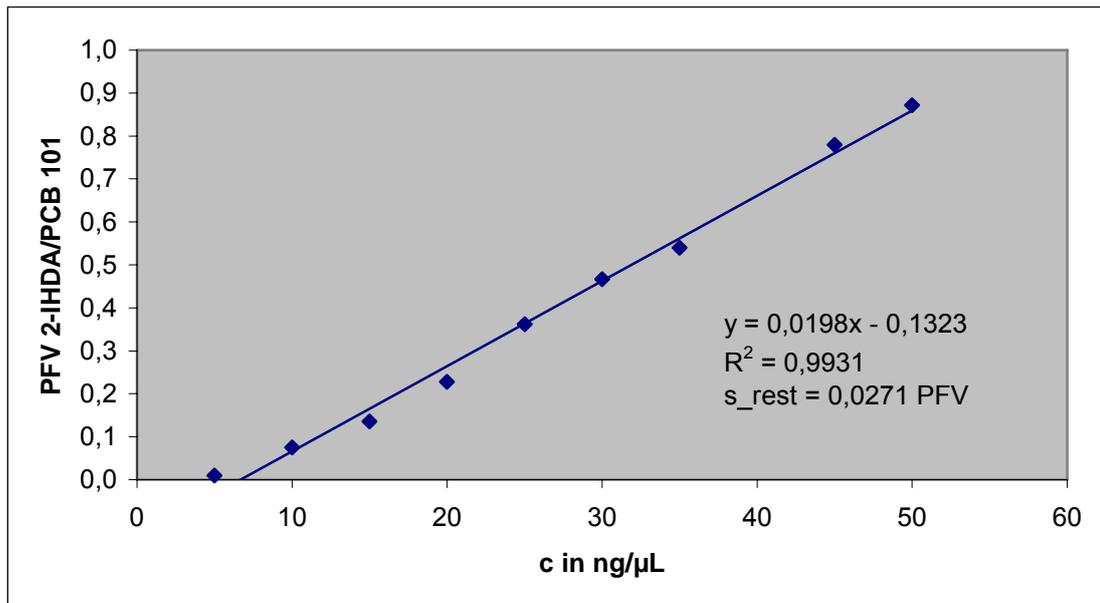


**Abb-A 12: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; Fullscan)**

**Tab-A 44: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; SIM; Messung 1)**

Konz. [ng/µL]	Peakfläche		PFV
	PCB 101	2-IHDA	
5,0	2206340	21144	0,0096
10,0	1423820	106971	0,0751
15,0	1781350	241255	0,1354
20,0	1773370	404254	0,2280
25,0	1640520	593776	0,3619
30,0	1709730	797503	0,4664
35,0	1857240	1003030	0,5401
40,0	2086100	1738550	(0,8334)
45,0	2997630	2336610	0,7795
50,0	2141290	1865830	0,8714

(...) ...Ausreißer



**Abb-A 13: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (GC-MS; SIM)**

**Tab-A 45: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; SIM; Messung 1)**

Konz. [ng/µL]	Peakfläche		PFV
	PCB 101	2-IODA	
5,0	2206340	7298	0,0033
10,0	1423820	40763	0,0286
15,0	1781350	85047	0,0477
20,0	1773370	158354	0,0893
25,0	1640520	248066	0,1512
30,0	1709730	341130	0,1995
35,0	1857240	420473	0,2264
40,0	2086100	823110	(0,3946)
45,0	2997630	1103980	0,3683
50,0	2141290	859406	0,4013

(...) ...Ausreißer

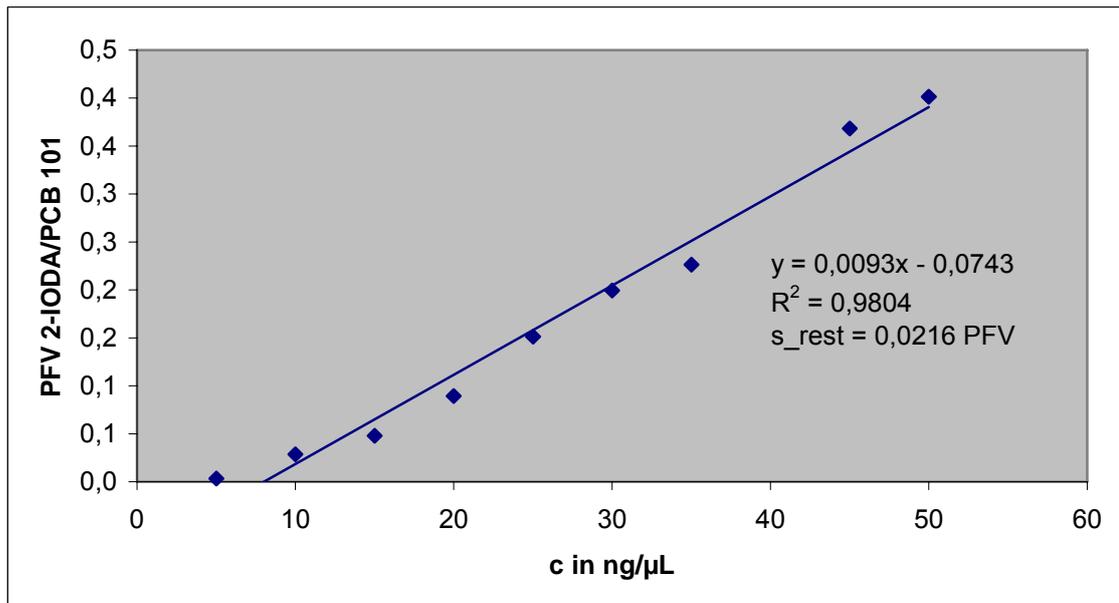
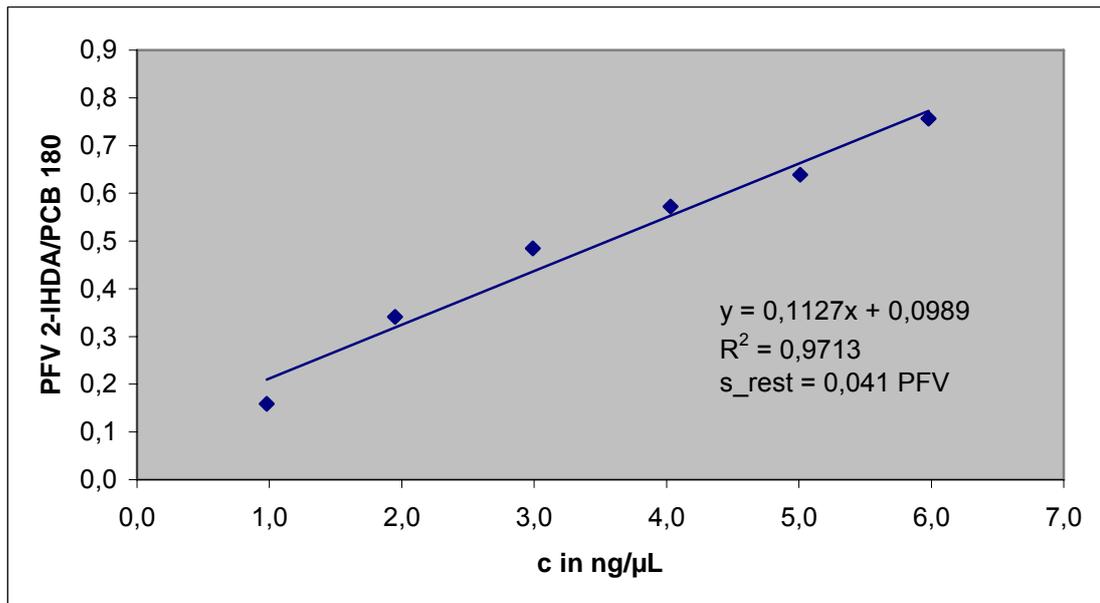


Abb-A 14: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (GC-MS; SIM)

Tab-A 46: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Acetonitril; Messung 1)

Konz. [ng/μL]	Peakfläche		PFV
	PCB 180	2-IHDA	
0,98	52538	8354	0,1590
1,95	55158	18822	0,3412
2,99	37156	18007	0,4846
4,03	58407	33427	0,5723
5,01	59542	38064	0,6393
5,98	60032	45398	0,7562



**Abb-A 15: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Acetonitril)**

**Tab-A 47: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (HPLC-UV; Acetonitril; Messung 1)**

Konz. [ng/µL]	Peakfläche		PFV
	PCB 180	2-IODA	
0,98	60001	11458	0,1910
1,95	56889	20287	0,3566
2,99	58266	25031	0,4296
4,03	58055	30601	0,5271
5,01	59971	42216	0,7039
5,98	58918	45965	0,7802

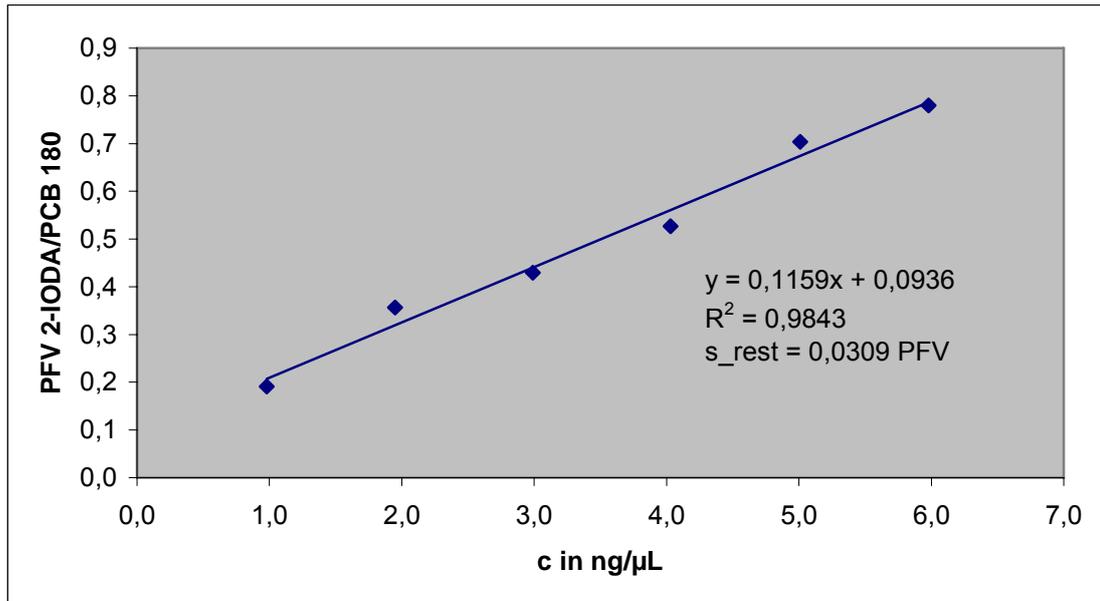


Abb-A 16: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (HPLC-UV; Acetonitril)

Tab-A 48: Messwerte für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Methanol; Messung 1)

Konz. [ng/µL]	Peakfläche		PFV
	PCB 180	2-IHDA	
0,50	35779	12644	0,3534
1,00	35242	19871	0,5638
1,50	5525	6367	(1,1524)
2,00	35697	31892	0,8934
2,50	15728	17811	1,1324
3,00	34255	43432	1,2679
3,50	34712	51265	1,4769
4,00	33991	56585	1,6647
4,50	10392	16337	(1,5721)
5,00	33539	68029	2,0284

(...) ... Ausreißer

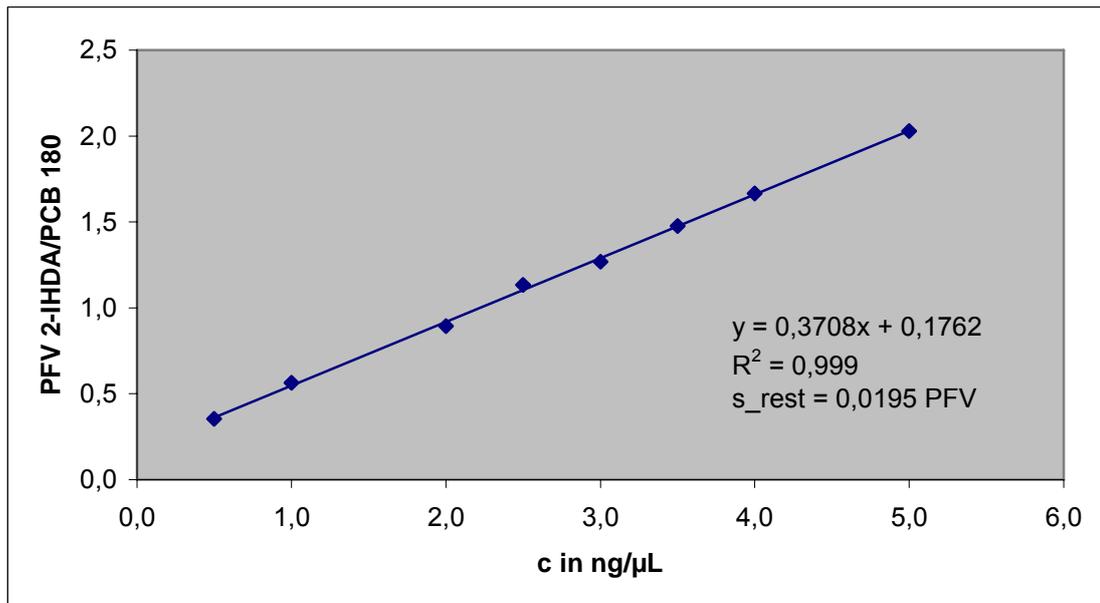
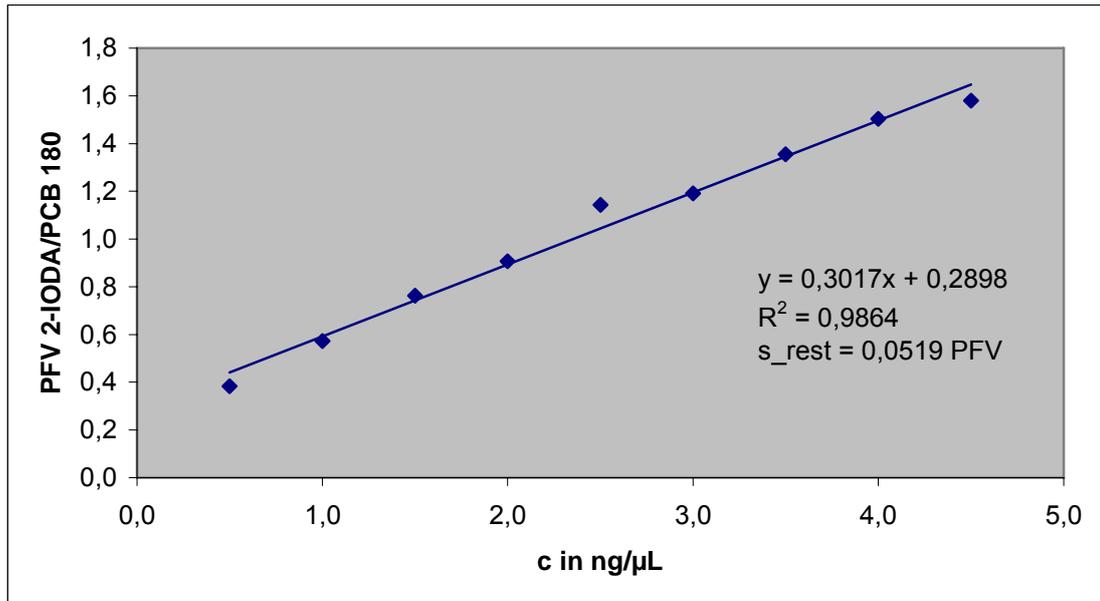


Abb-A 17: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IHDA (HPLC-UV; Methanol)

Tab-A 49: Messwerte zur Ermittlung der Nachweisgrenze für 2-IODA (HPLC-UV; Methanol; Messung 1)

Konz. [ng/µL]	Peakfläche		PFV
	PCB 180	2-IODA	
0,50	39370	15069	0,3828
1,00	38670	22127	0,5722
1,50	39368	30006	0,7622
2,00	38794	35179	0,9068
2,50	13117	14991	1,1429
3,00	38970	46417	1,1911
3,50	40060	54311	1,3557
4,00	39333	59114	1,5029
4,50	40344	63730	1,5797
5,00	41418	64553	(1,5586)

(...) ...Ausreißer



**Abb-A 18: Kalibriergerade für Ermittlung der Nachweisgrenze von 2-IODA (HPLC-UV; Methanol)**

**Tab-A 50 : Messwerte für externe Kalibrierung von 2-IHDA (GC-ECD)**

Konzentration [ $\text{pg}/\mu\text{L}$ ]	Peakflächenverhältnis 2-IHDA/PCB 101
103,33	0,0808
206,66	0,2756
309,99	0,4896
413,32	0,7763
516,65	0,9366
619,98	1,2515

**Tab-A 51: Messwerte für externe Kalibrierung von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS)**

Konzentration [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	Peakfläche AA- $\delta$ -IL
0,0310	2990
0,0625	7180
0,1250	15100
0,2500	39900
0,5000	82920
1,0000	172000

**Tab-A 52: Messwerte für Standardaddition von AA- $\delta$ -IL (SD-IL-1; Messung 4)**

Konzentration [ng/ $\mu$ L]	Peakfläche AA- $\delta$ -IL
0,0000	1070
0,0310	6470
0,0486	9000
0,0729	12000
0,1000	16700

**Tab-A 53: Messwerte für Standardaddition von 2-IHDA (SD-IA-8; Messung 1)**

Konzentration [pg/ $\mu$ L]	Peakflächenverhältnis 2-IHDA/PCB 101
0,0	0,1053
50,0	0,2371
100,0	0,3835
150,0	0,4791
200,0	0,6290

**Tab-A 54: Messwerte für Wiederfindungsraten von 2-IHDA und 2-IODA (GC-ECD; Referenzsubstanzen)**

Probe	Peakflächenverhältnis		Wiederfindung [%]	
	2-IHDA/PCB 101	2-IODA/PCB 101	2-IHDA	2-IODA
1a	1,9582	1,0024	100,00	100,00
1b	1,7321	0,9017	88,45	89,95
1c	1,4357	0,7600	73,32	75,81
2a	3,2109	2,3504	100,00	100,00
2b	2,6273	1,8492	81,83	78,68
2c	2,2446	1,5297	69,91	65,08
3a	1,7797	1,9075	100,00	100,00
3b	1,7303	1,7881	97,22	93,74
3c	1,6792	1,7637	94,35	92,46

a... ohne Clean-up; b...SC-Clean-up; c...GPC/SC-Clean-up

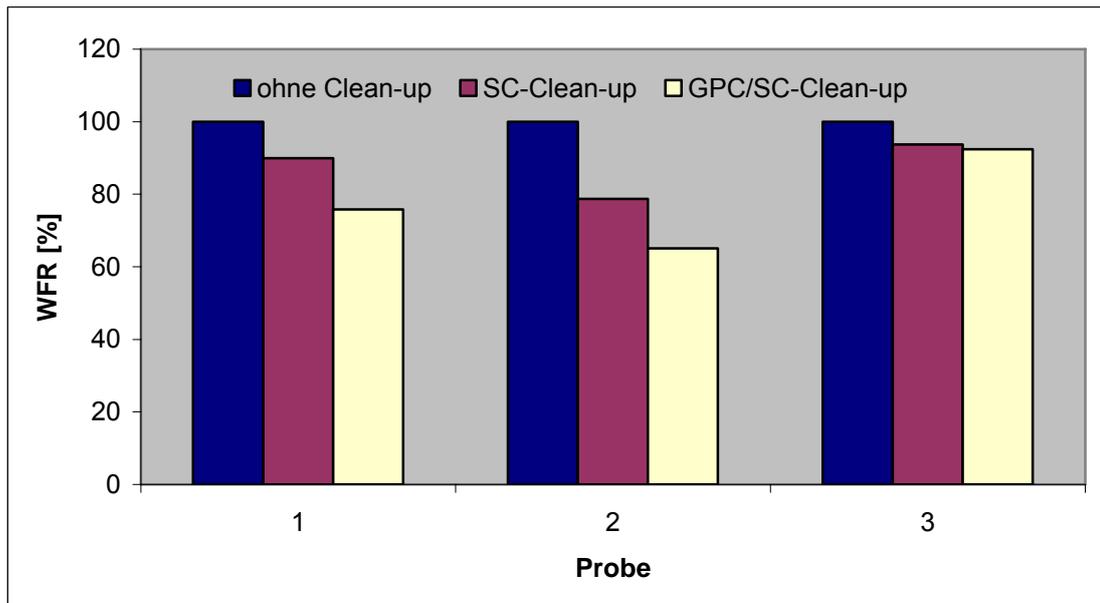


Abb-A 19: Diagramm der Wiederfindungsraten (GC-ECD, Referenzsubstanzen, 2-IODA)

Tab-A 55: Messwerte für Wiederfindungsraten von 2-IHDA und 2-IODA (HPLC-UV; Referenzsubstanzen)

Probe	Peakflächenverhältnis		Wiederfindung [%]	
	2-IHDA/PCB 180	2-IODA/PCB 180	2-IHDA	2-IODA
1a	0,1934	0,1409	100,00	100,00
1b	0,0880	0,1007	45,50	71,46
1c	0,0884	0,1125	45,71	79,84
2a	0,0962	0,1705	100,00	100,00
2b	0,0931	0,1532	96,81	89,90
2c	0,0961	0,1037	99,88	60,84
3a	0,0971	0,0710	100,00	100,00
3b	0,0971	0,0565	76,55	79,62
3c	0,0768	0,0632	79,13	88,94

a... ohne Clean-up; b...SC-Clean-up; c...GPC/SC-Clean-up

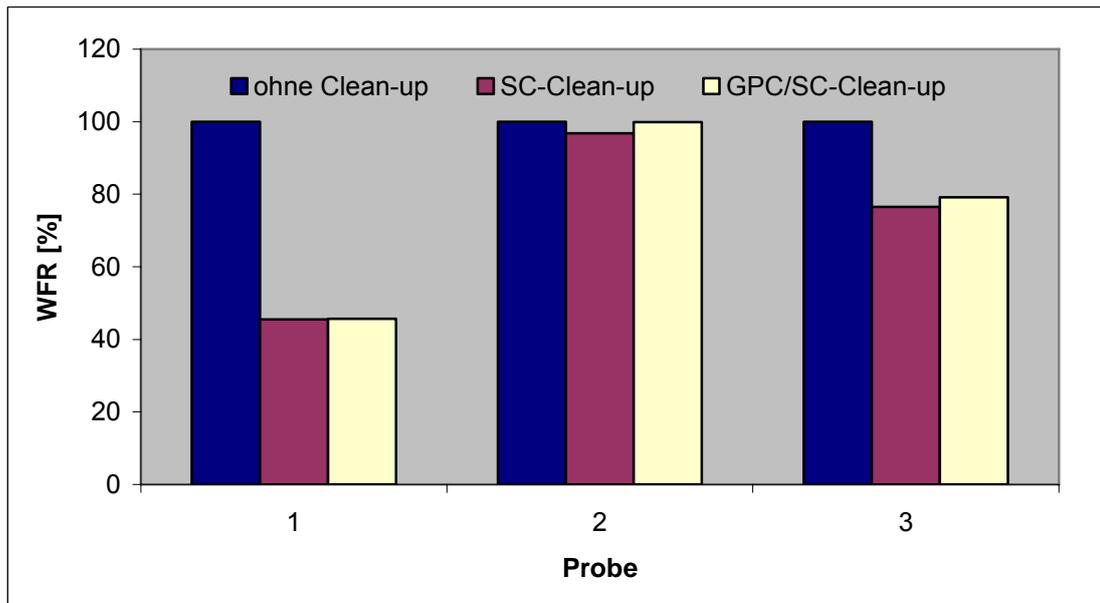


Abb-A 20: Diagramm der Wiederfindungsraten (HPLC-UV, Referenzsubstanzen, 2-IHDA)

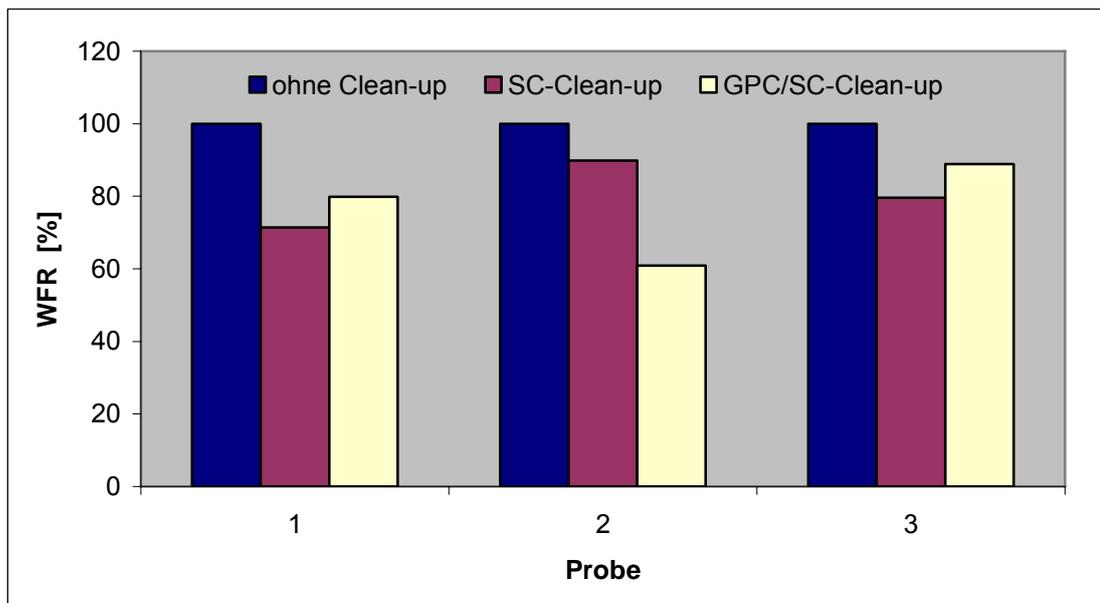


Abb-A 21: Diagramm der Wiederfindungsraten (HPLC-UV, Referenzsubstanzen, 2-IODA)

**Tab-A 56: Messwerte für Wiederfindung von 2-IHDA (GC-ECD; Realproben)**

Probe	Peakflächenverhältnis 2-IHDA/ PCB 101				Mittelwert PFV
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	
1a	0,7972	1,1180	1,3615	1,1478	1,1061
1b	1,0412	1,5659	1,2495	1,4591	1,3289
2a	1,5890	2,4924	1,2817	1,8061	1,7923
2b	2,8708	1,8533	2,0867	1,8303	2,1603
3a	0,8023	0,6441	0,6757	0,5911	0,6783
3b	0,5524	0,8513	0,8438	0,7098	0,7393

a... ohne Clean-up; b...SC-Clean-up; c...GPC/SC-Clean-up

**Tab-A 57: Messwerte für Wiederfindung von AA- $\delta$ -IL (LC-MS/MS; Realproben)**

Probe	Gehalt <sub>nativ</sub> [ng/ $\mu$ L]	Gehalt <sub>dotiert</sub> [ng/ $\mu$ L]	Differenz [ng/ $\mu$ L]	WFR [%] bei 0,1 ng/ $\mu$ L dotiert
1	0,0102	0,0712	0,0610	61,05
2	0,0014	0,1154	0,1140	113,99
3	0,0040	0,1068	0,1028	102,81

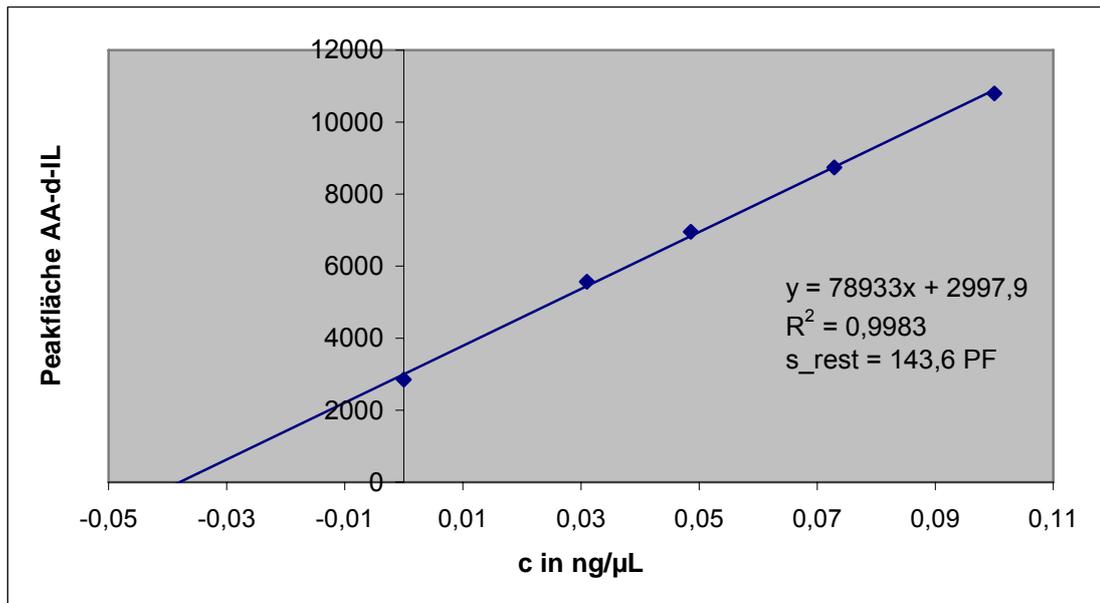


Abb-A 22: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-1

Tab-A 58: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-1

Messung	Geradengleichung $y = a \cdot x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PF]
1	$y = 163583 \cdot x + 945,08$	0,9991	219,1
2	$y = 112701 \cdot x + 1141,80$	0,9955	333,8
3	$y = 160483 \cdot x + 599,00$	0,9983	289,2
4	$y = 152588 \cdot x + 1342,30$	0,9962	415,4
5	$y = 135410 \cdot x + 1627,80$	0,9961	373,0
6	$y = 53822 \cdot x + 947,99$	0,9992	66,7
7	$y = 78933 \cdot x + 2997,90$	0,9983	143,6

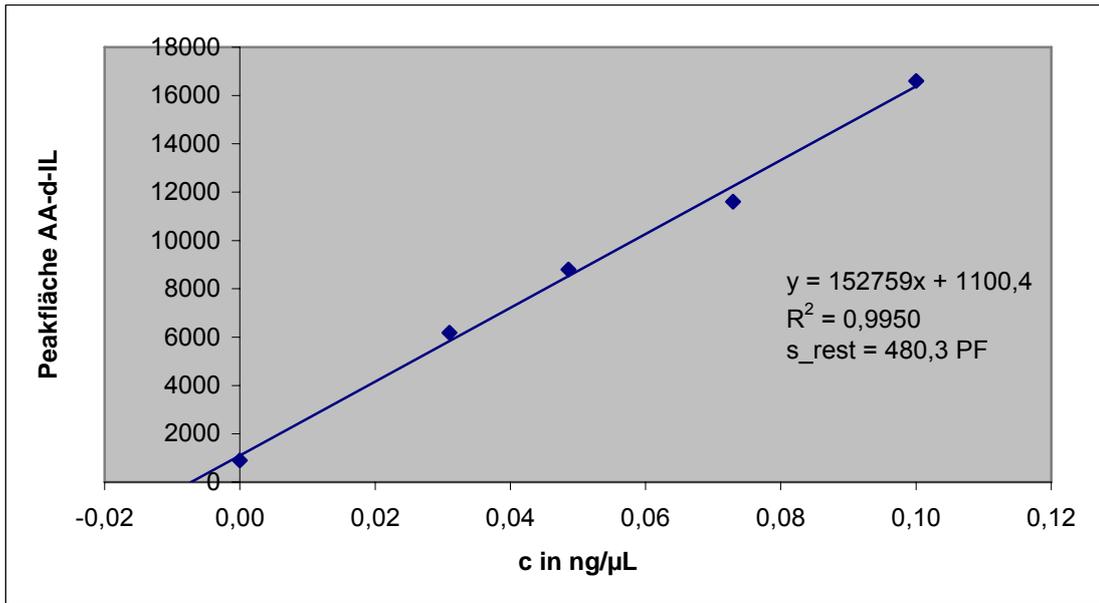


Abb-A 23: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-2

Tab-A 59: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-2

Messung	Geradengleichung $y = a \cdot x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PF]
1	$y = 115507 \cdot x + 1122,30$	0,9840	643,9
2	$y = 155068 \cdot x + 179,03$	0,9951	407,0
3	$y = 152759 \cdot x + 1100,40$	0,9950	480,3

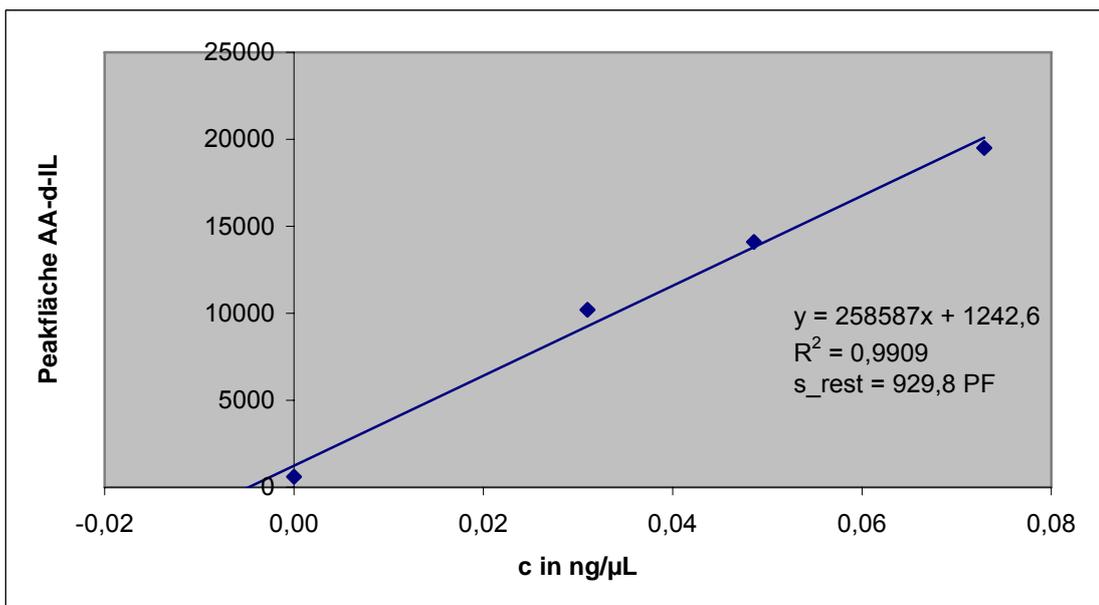


Abb-A 24: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-3

Tab-A 60: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-3

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PF]
1	$y = 258587 * x + 1242,60$	0,9909	929,8
2	$y = 253767 * x + 494,65$	0,9899	965,4

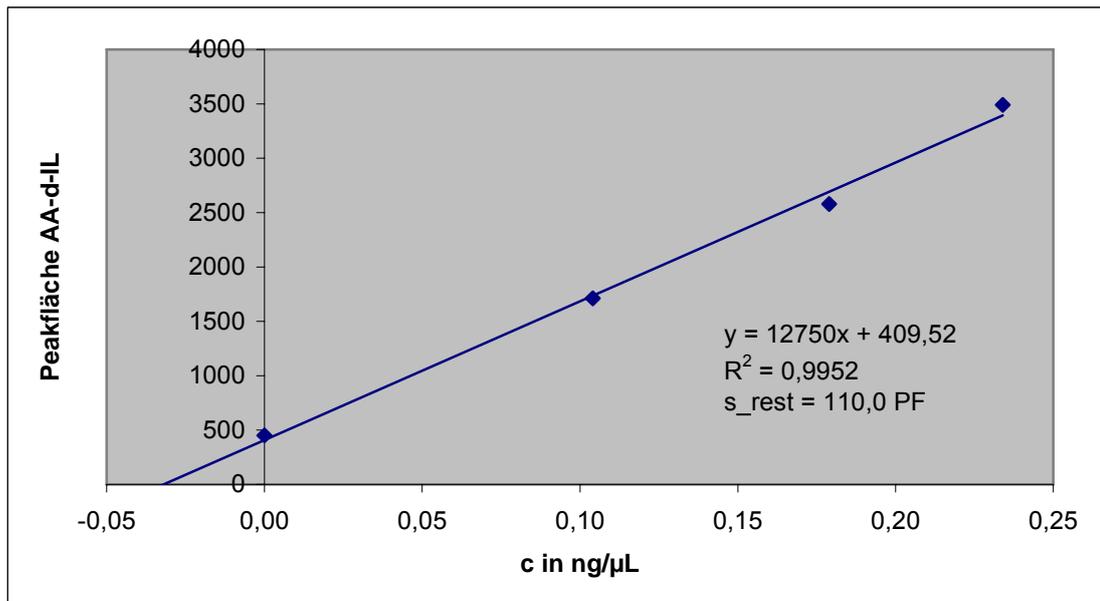


Abb-A 25: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-4

Tab-A 61: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-4

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PF]
1	$y = 12750 * x + 409,52$	0,9952	110,0
2	$y = 13132 * x + 1396,00$	0,9877	186,0
3	$y = 6638,8 * x + 538,03$	0,9974	43,1

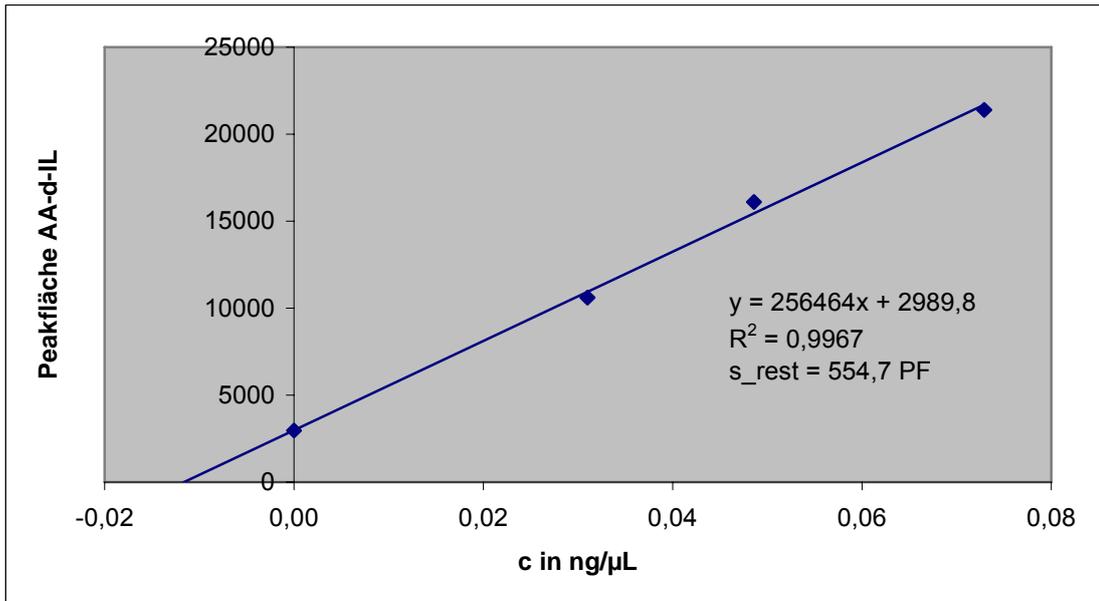


Abb-A 26: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-5

Tab-A 62: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-5

Messung	Geradengleichung $y = a \cdot x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PF]
1	$y = 256464 \cdot x + 2989,80$	0,9967	554,7
2	$y = 465274 \cdot x + 4436,40$	0,9187	5198,9
3	$y = 1736750 \cdot x + 941,60$	0,9356	158050,3

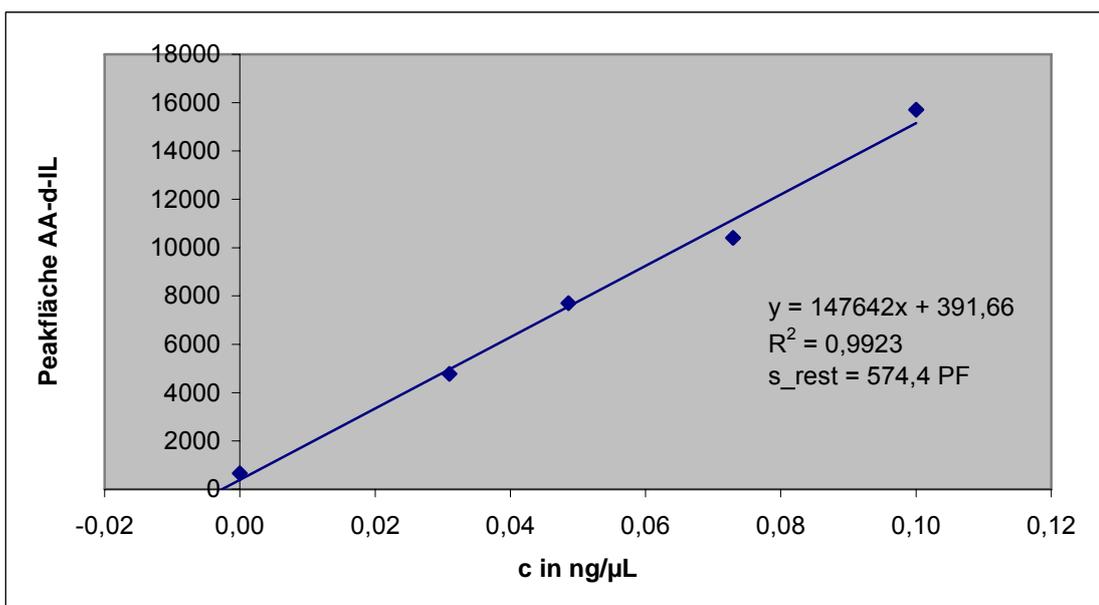


Abb-A 27: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-6

Tab-A 63: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-6

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PF]
1	$y = 680693 * x + 2155,60$	0,9906	3441,3
2	$y = 195815 * x + 1339,30$	0,9503	1983,3
3	$y = 147642 * x + 391,66$	0,9923	574,4

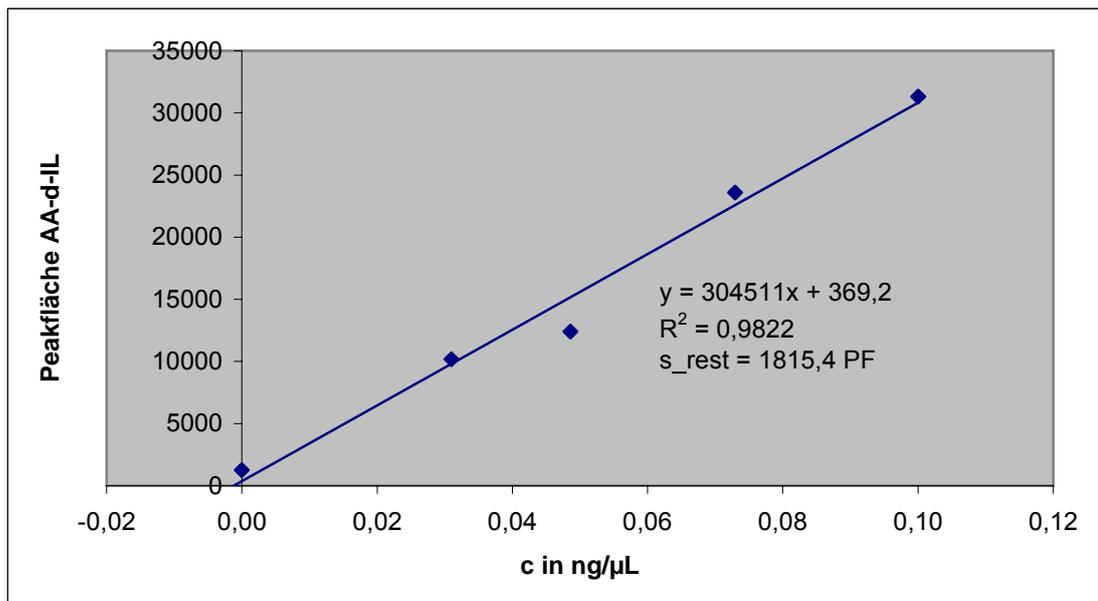


Abb-A 28: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-7

Tab-A 64: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-7

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PF]
1	$y = 243806 * x + 239,01$	0,9972	704,1
2	$y = 304511 * x + 369,20$	0,9822	1815,4

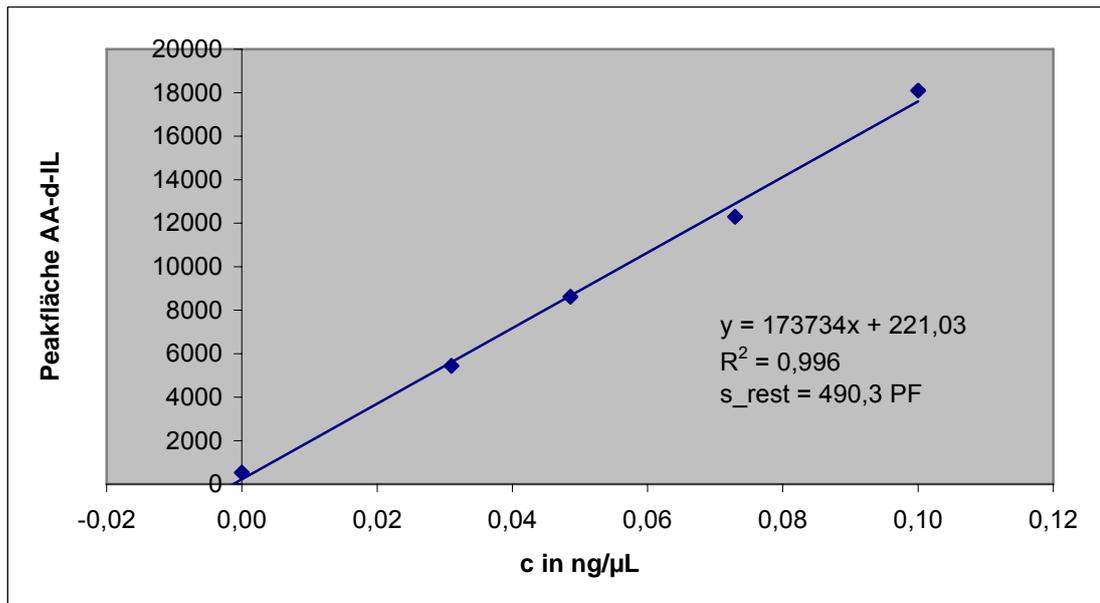


Abb-A 29: Beispiel einer SDA-Kalibriergerade für Probe SD-IL-8

Tab-A 65: SDA-Kalibriergeraden für SD-IL-8

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PF]
1	$y = 271052 * x + 982,26$	0,9964	335,1
2	$y = 489124 * x + 2323,90$	0,9859	2196,4
3	$y = 160396 * x + 316,80$	0,9999	75,7
4	$y = 145006 * x + 99,15$	0,9972	288,6
5	$y = 173734 * x + 221,03$	0,9960	490,3
6	$y = 683171 * x + 2054,40$	0,9907	2484,3
7	$y = 202347 * x + 1983,7$	0,9998	205,6

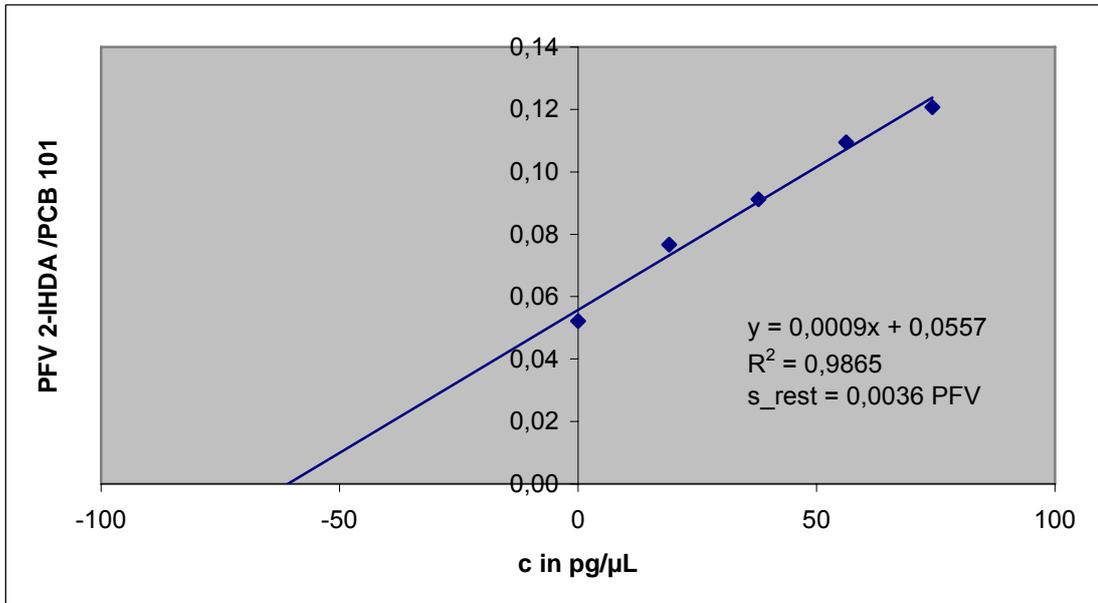


Abb-A 30: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-1 (2-IHDA)

Tab-A 66: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-1 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PFV]
1	$y = 0,0009 * x + 0,0557$	0,9865	0,0036
2	$y = 0,0006 * x + 0,0549$	0,9934	0,0018
3	$y = 0,0014 * x + 0,0718$	0,9671	0,0168

Tab-A 67: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-1 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PFV]
1	$y = 0,0004 * x + 0,0042$	0,9970	0,0004
2	$y = 0,0005 * x + 0,0026$	0,9767	0,0013
3	$y = 0,0017 * x + 0,0580$	0,9423	0,0131

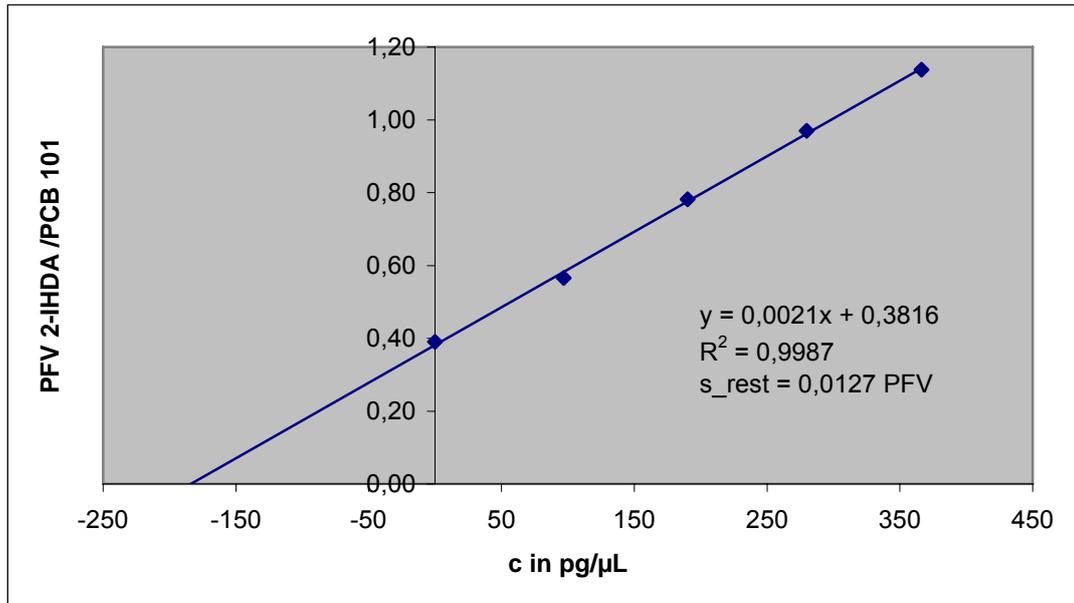


Abb-A 31: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-2 (2-IHDA)

Tab-A 68: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-2 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,0028 * x + 0,1305$	0,9420	0,1162
2	$y = 0,0021 * x + 0,3816$	0,9987	0,0127
3	$y = 0,0006 * x + 0,0210$	0,9806	0,0159

Tab-A 69: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-2 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,0055 * x + 0,0323$	0,9506	0,0906
2	$y = 0,0069 * x + 0,5485$	0,9891	0,0523
3	$y = 0,0002 * x + 0,0056$	0,9921	0,0012

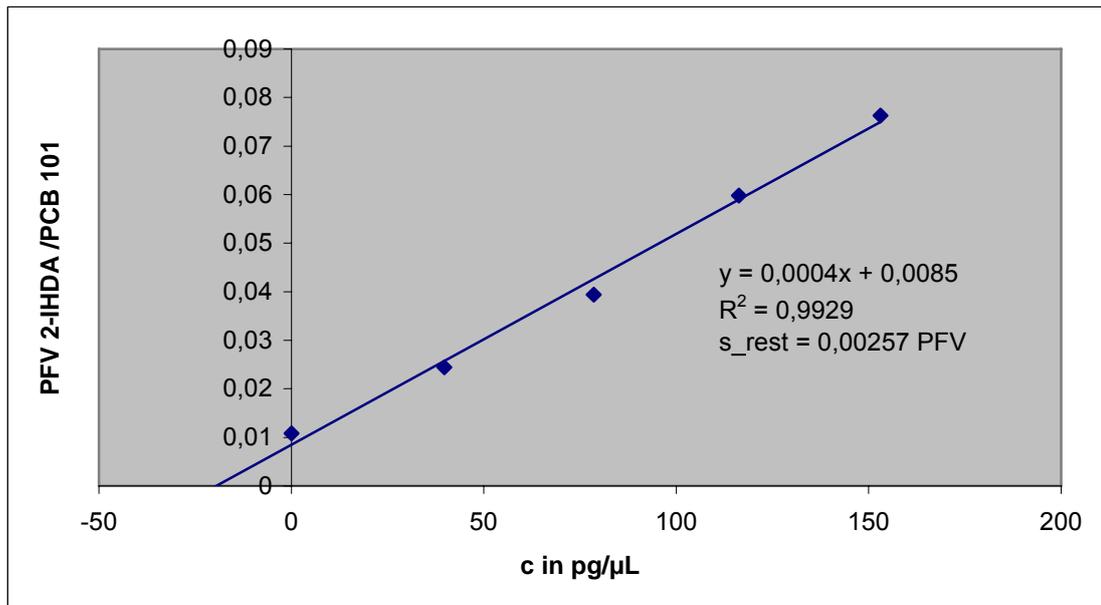


Abb-A 32: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-3 (2-IHDA)

Tab-A 70: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-3 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,0004 * x + 0,0085$	0,9929	0,0026
2	$y = 0,0004 * x + 0,0073$	0,9591	0,0063
3	$y = 0,0005 * x + 0,0066$	0,9691	0,0062

Tab-A 71: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-3 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,00007 * x + 0,00574$	0,9943	0,0002
2	$y = 0,00009 * x + 0,00692$	0,9981	0,0001
3	$y = 0,00009 * x + 0,00465$	0,9748	0,0005

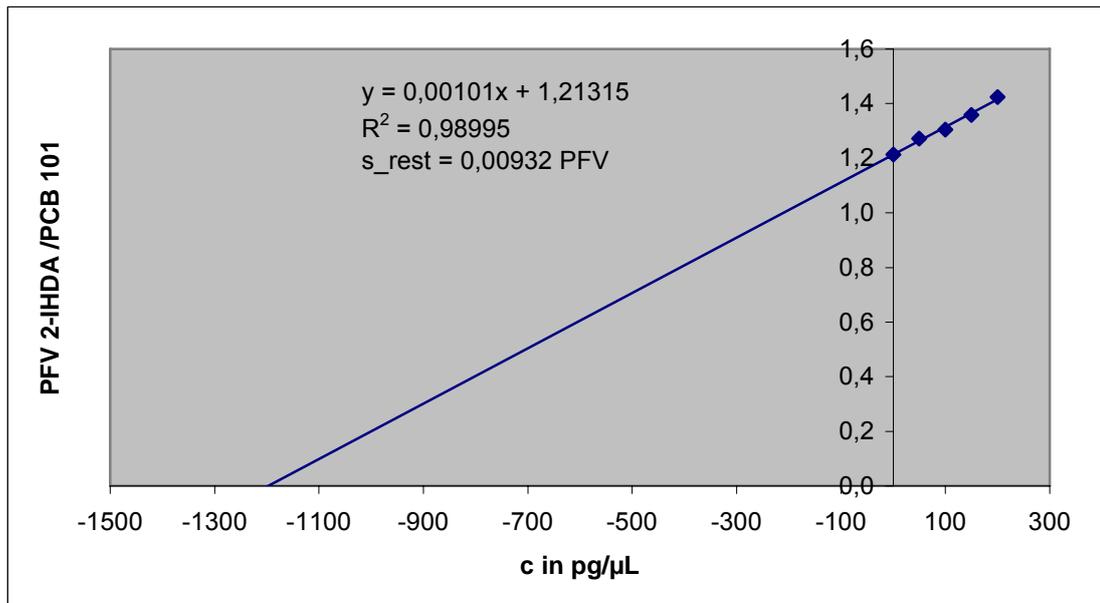


Abb-A 33: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-4 (2-IHDA)

Tab-A 72: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-4 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{\text{rest}}$ [PFV]
1	$y = 0,00162 * x + 1,51830$	0,9999	0,0015
2	$y = 0,00101 * x + 1,21315$	0,9899	0,0093
3	$y = 0,00130 * x + 0,85360$	0,9639	0,0195

Tab-A 73: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-4 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{\text{rest}}$ [PFV]
2	$y = 0,0004 * x + 0,7397$	0,9873	0,0047

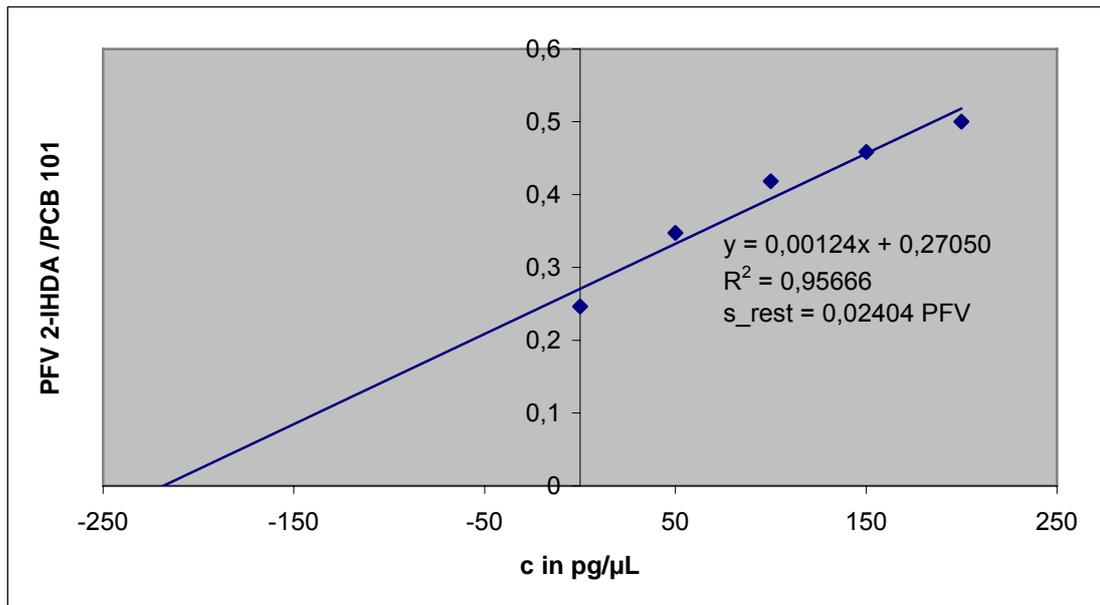


Abb-A 34: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-5 (2-IHDA)

Tab-A 74: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-5 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,00160 * x + 0,2490$	0,9989	0,0054
2	$y = 0,00124 * x + 0,2705$	0,9567	0,0240
3	$y = 0,00093 * x + 0,15194$	0,9611	0,0170

Tab-A 75: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-5 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,00051 * x + 0,08364$	0,9753	0,0085
2	$y = 0,00058 * x + 0,09729$	0,9762	0,0094

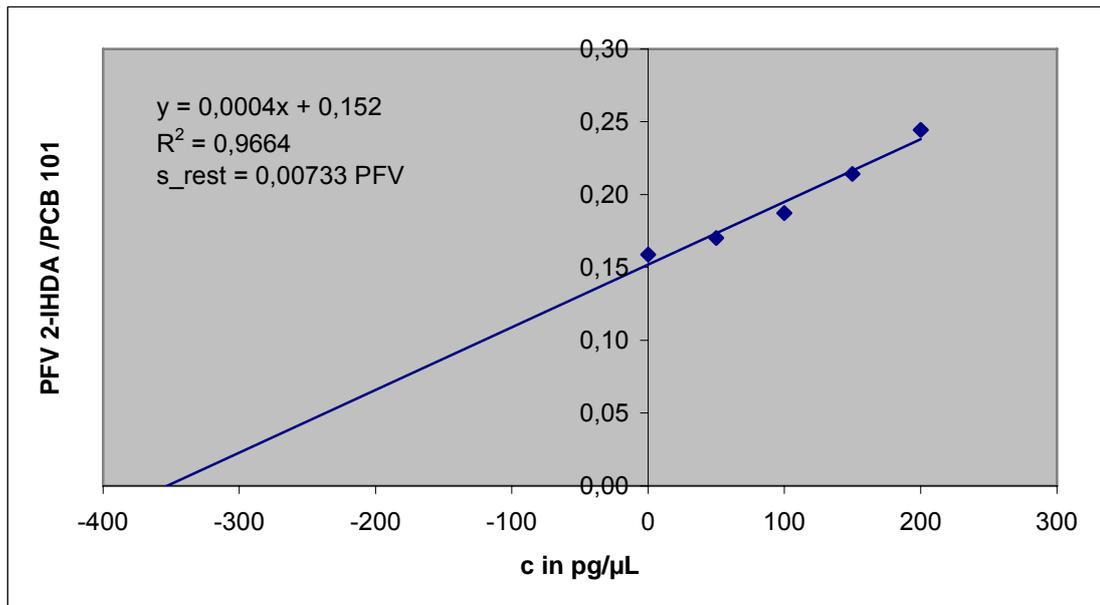


Abb-A 35: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-6 (2-IHDA)

Tab-A 76: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-6 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,0028 * x + 3,4135$	0,9237	0,1598
2	$y = 0,0004 * x + 0,1520$	0,9664	0,0073
3	$y = 0,0003 * x + 0,0498$	0,9959	0,0020

Tab-A 77: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-6 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
2	$y = 0,000074 * x + 0,031618$	0,9942	0,0006
3	$y = 0,000014 * x + 0,007235$	0,9973	0,0004

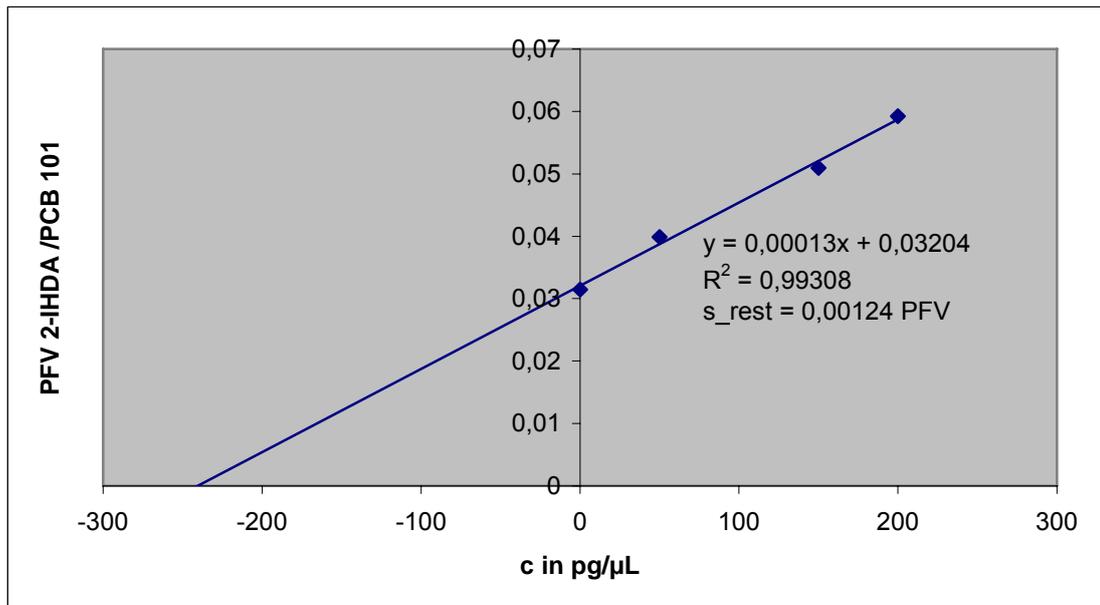


Abb-A 36: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-7 (2-IHDA)

Tab-A 78: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-7 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a \cdot x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
2	$y = 0,00013 \cdot x + 0,03204$	0,9931	0,0012
3	$y = 0,00018 \cdot x + 0,03118$	0,9624	0,0032

Tab-A 79: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-7 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a \cdot x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
2	$y = 0,0000055 \cdot x + 0,0087270$	0,9466	0,0001

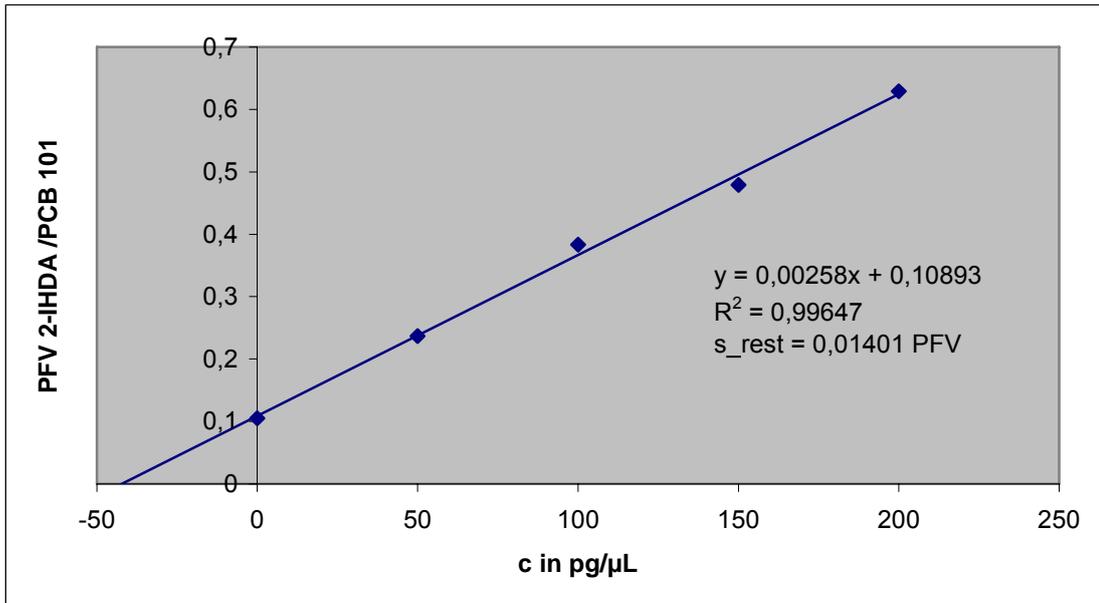


Abb-A 37: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-8 (2-IHDA)

Tab-A 80: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-8 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	R <sup>2</sup>	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00258 * x + 0,10893$	0,9965	0,0140
2	$y = 0,00199 * x + 0,08592$	0,9905	0,0178
3	$y = 0,00179 * x + 0,09345$	0,9940	0,0127

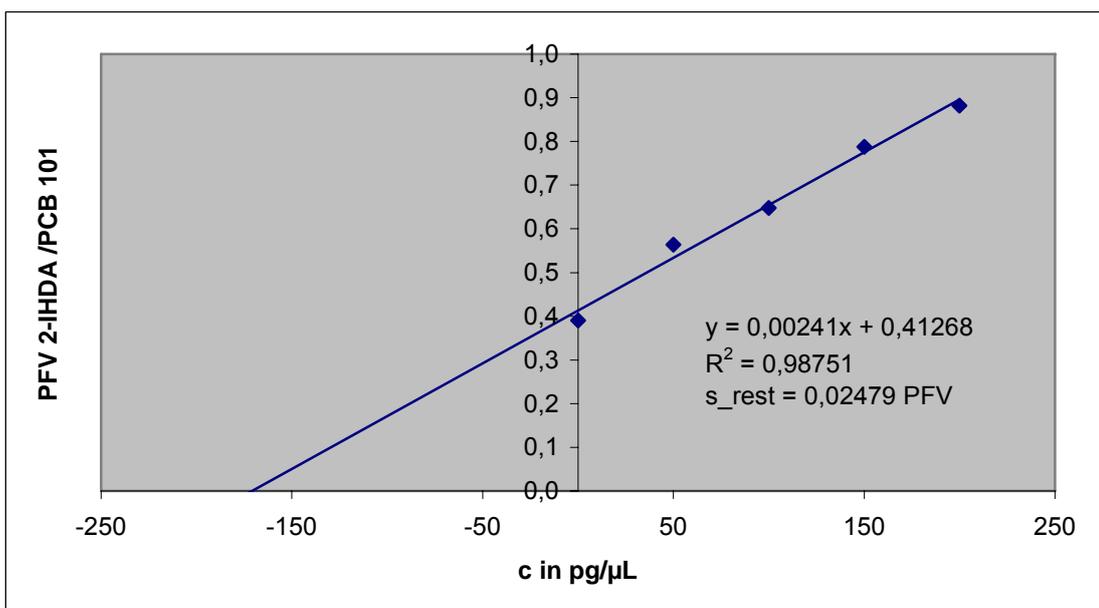


Abb-A 38: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-9 (2-IHDA)

Tab-A 81: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-9 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	R <sup>2</sup>	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00327 * x + 0,41392$	0,9826	0,0398
2	$y = 0,00241 * x + 0,41268$	0,9875	0,0248
3	$y = 0,00229 * x + 0,59945$	0,9891	0,0220

Tab-A 82: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-9 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	R <sup>2</sup>	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00210 * x + 0,36654$	0,9928	0,0262
2	$y = 0,00095 * x + 0,10420$	0,9870	0,0100

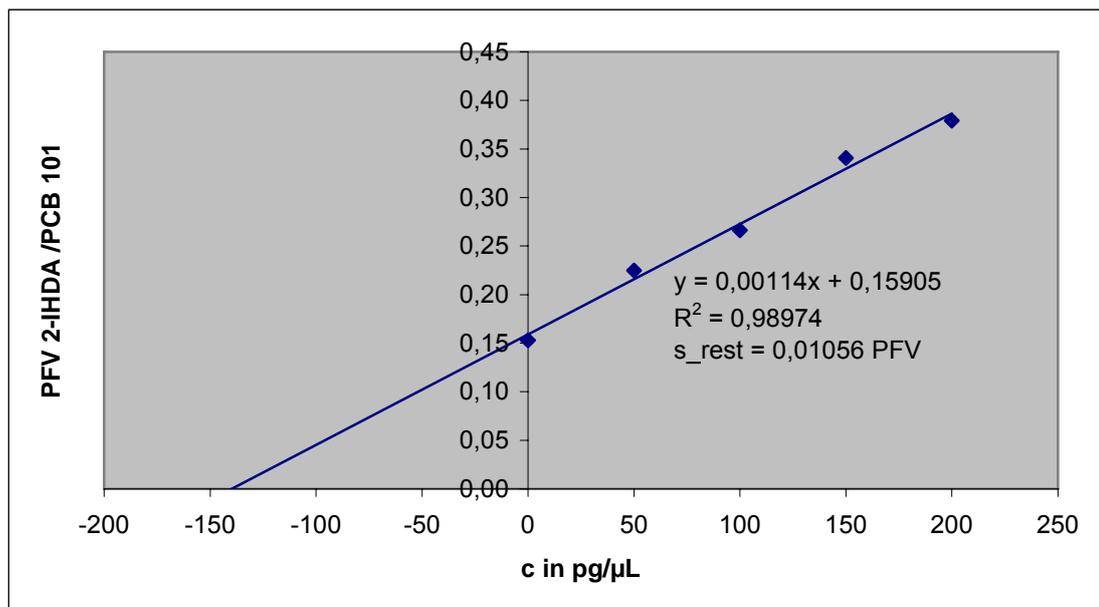


Abb-A 39: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-10 (2-IHDA)

Tab-A 83: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-10 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	R <sup>2</sup>	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00156 * x + 0,03588$	0,9903	0,0141
2	$y = 0,00114 * x + 0,15905$	0,9897	0,0106
3	$y = 0,00099 * x + 0,06085$	0,9991	0,0023

Tab-A 84: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-10 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00037 * x + 0,00131$	0,9781	0,0050
3	$y = 0,00014 * x + 0,00624$	0,9864	0,0017

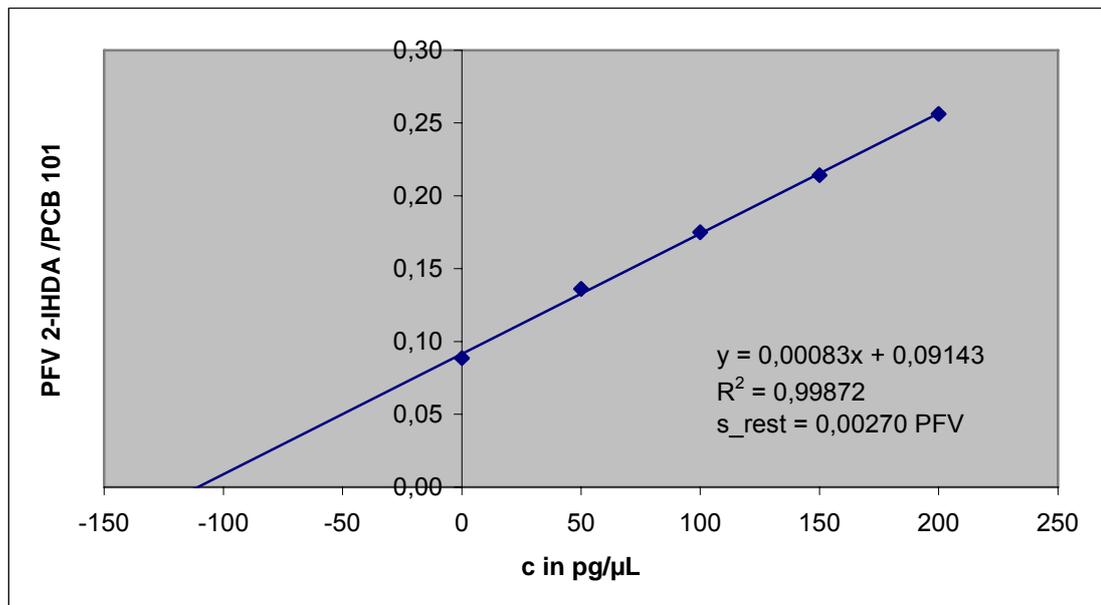


Abb-A 40: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-11 (2-IHDA)

Tab-A 85: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-11 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00153 * x + 0,08572$	0,9832	0,0182
2	$y = 0,00083 * x + 0,09143$	0,9987	0,0027
3	$y = 0,00036 * x + 0,08978$	0,9646	0,0062

Tab-A 86: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-11 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	s_rest [PFV]
1	$y = 0,00039 * x + 0,00920$	0,9843	0,0045
2	$y = 0,000096 * x + 0,008886$	0,9866	0,0010

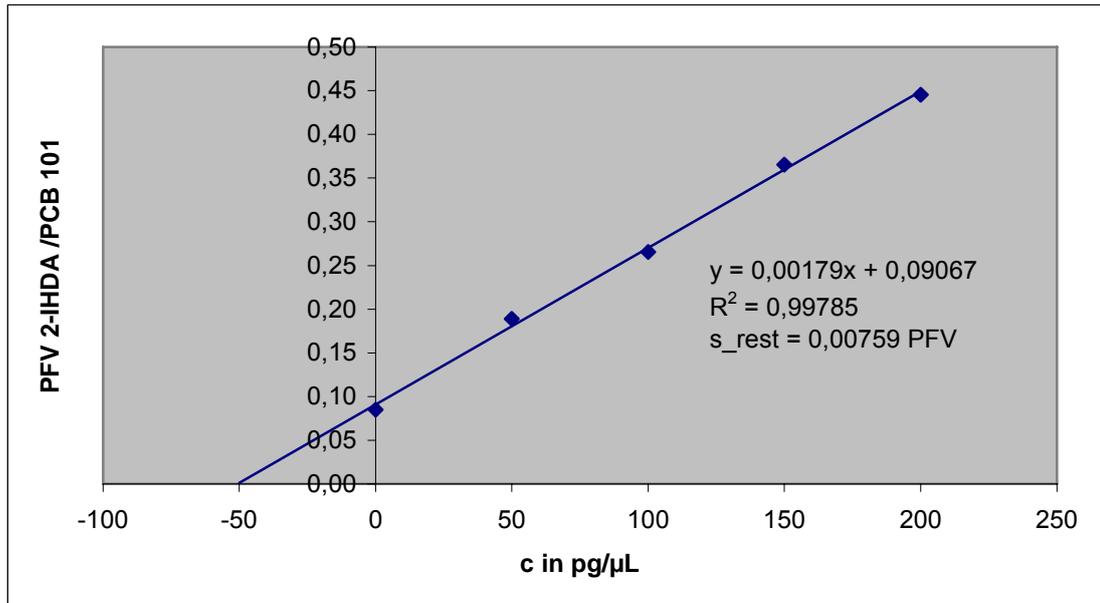


Abb-A 41: Beispiel einer SDA-Kalibrierung für Probe SD-IA-12 (2-IHDA)

Tab-A 87: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-12 (2-IHDA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,00179 * x + 0,09067$	0,9979	0,0076
2	$y = 0,00167 * x + 0,54458$	0,9899	0,0155
3	$y = 0,00124 * x + 0,31041$	0,9796	0,0163

Tab-A 88: SDA-Kalibriergeraden für SD-IA-12 (2-IODA)

Messung	Geradengleichung $y = a * x + b$	$R^2$	$s_{rest}$ [PFV]
1	$y = 0,00063 * x + 0,01471$	0,9951	0,0040
2	$y = 0,00062 * x + 0,21899$	0,9989	0,0021
3	$y = 0,00047 * x + 0,04880$	0,9841	0,0047

**III. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

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

Mandy Koch

## IV. PUBLIKATIONEN/ POSTER

### Fachzeitschriften

**S. Ziebell, M. Koch und W. Lorenz:** Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Jodaldehyden. *Lebensmittelchemie*, 61, 129 (2007)

**A. Rockstroh, M. Koch und W. Lorenz:** Bestimmung von Jodaldehyden in der Schilddrüse. *Lebensmittelchemie*, 62, 36-37 (2008)

**A. Wandt, F. Kolbe, M. Koch und W. Lorenz:** Entwicklung von Nachweismethoden für Jodlipide in der Schilddrüse. *Lebensmittelchemie*, 63, 103 (2009)

### Tagungsbeiträge/Poster

**M. Koch, A. Kraus und W. Lorenz:** Determination of persistent organic pollutants in salmon with GC-MS. 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag 19.-21.9.2005, Hamburg, Tagungsband PA 030 S 130

**S. Ziebel, M. Koch und W. Lorenz:** Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Jodaldehyden. 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag 17.-20.09.2006 Dresden (Poster LT53) Tagungsband S 174 (2006)

**A. Rockstroh, M. Koch und W. Lorenz:** Bestimmung von Iodaldehyden in der Schilddrüse. 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag 10.-12.09.07 Nürnberg (Poster HC 01) Tagungsband S 101 (2007)

**A. Wandt, F. Kolbe, M. Koch und W. Lorenz:** Entwicklung von Nachweismethoden für Jodlipide in der Schilddrüse. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag 8.-10.09.08 Kaiserslautern (Poster AT 27) Tagungsband S 173 (2008)

**S. Futh, M. Koch und W. Lorenz:** Entwicklung von Nachweismethoden zur Bestimmung von Jodlactonen in der Schilddrüse. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag 14.-16.09.09 Berlin (Poster AT 033) Tagungsband S 189 (2009)

**V. LEBENS LAUF****Mandy Koch**

Geburtsdatum: 27. Mai 1982 in Ilmenau

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulbildung:**

1988 - 1992 Grundsule Suhl

1992 - 2000 2. Staatliche Gymnasium Suhl

**Akademischer Werdegang**

10/2000 - 04/2005 Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Diplom und dem 1. Staatsexamen als Abschluss

10/2004 - 04/2005 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Nachweis von ausgewählten persistenten Verbindungen in Lachs“

05/2005 - 05/2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis Lebensmittelchemie und Umweltchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit abschließender Dissertation zum Thema: „Methodenentwicklung zum Nachweis ausgewählter Iodlipide in der Schilddrüse“

05/2010 - dato wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Arbeitsbereich Lebensmittelchemie und Umweltchemie