



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Optimierung der Folsäureextraktion mittels enzymatischer Methoden und  
Fällungsmethoden aus Humanplasma zur Messung des  
Folsäuremetaboloms

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Lola Basara  
Matrikel-Nummer: 0301326  
Studienrichtung /Studienzweig Ernährungswissenschaften  
(lt. Studienblatt):  
Betreuerin / Betreuer: Univ. Prof. Dr. Jürgen König

Wien, im September 2009



# Danksagung

Vielen Dank meinen Betreuern Univ. Prof. Dr. Jürgen König und Univ.-Ass. Dr. Elisabeth Rudolph für die Ermöglichung der Durchführung dieser interessanten Diplomarbeit und für die engagierte Unterstützung während meiner Arbeit. Danke für die vielen interessanten Aspekte, die ich hier umsetzen und kennenlernen konnte!

Genauso danke ich den Dissertantinnen Mag. Martina Köberl, Mag. Doris Freistetter und Sandra Auernigg-Haselmaier für die praktischen Tipps und Hilfestellungen sowie für die nette Zeit im Labor!

Ich danke auch meinen Eltern Dipl. Ing. Mićo Basara, Dipl. oec. Marina Basara und meiner Schwester Sonja Basara, die mich von klein auf unterstützt haben und mir ermöglicht haben das zu werden, was ich heute bin!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem besten Freund, Partner und Seelenverwandten Peter Hengl, der mir gezeigt hat, dass Träume wahr werden können, wenn man nur fest daran glaubt und arbeitet! Danke, dass du bist wie du bist!

Ich widme diese Arbeit meiner Oma Rosa Rakas, die sich wohl am meisten über sie freut!

Wien, am 11.09.2009

Lola Basara



# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	V
TABELLENVERZEICHNIS .....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
<b>1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT .....	1
1.2 ZIEL DER ARBEIT .....	2
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1 EIGENSCHAFTEN, VORKOMMEN, CHEMIE .....	3
2.2 BIOVERFÜGBARKEIT DER NAHRUNGSFOLATE .....	5
2.3 ABSORPTION UND STOFFWECHSEL .....	6
2.4 BIOCHEMISCHE FUNKTIONEN .....	6
2.5 MANGELSYMPTOME .....	9
2.6 ZUFUHREMPFEHLUNGEN .....	10
2.7 FOLATÄQUIVALENTE .....	12
2.8 FOLATANALYTIK IN LEBENSMITTELN .....	12
2.8.1 Trienzymmethode .....	12
2.8.2 Probenaufbereitung und Aufreinigung .....	13
2.8.3 Enzymbehandlung .....	15
2.8.4 Folatinterkonversionen .....	16
2.8.5 Messmethoden .....	17
2.8.5.1 Mikrobiologischer Assay .....	17
2.8.5.2 HPLC .....	17
2.8.5.3 Bindungs Assays .....	19
2.8.6 Aufreinigungsmethoden .....	20
2.8.6.1 Festphasenextraktion (SPE) .....	20
2.8.6.2 Affinitätschromatographie mittels FBP .....	22
2.8.6.3 Ionenaustauscher-Chromatographie .....	22
2.9 FOLATANALYTIK IM PLASMA, SERUM UND VOLLBLUT .....	22
2.9.1 Plasma und Serum .....	23
2.9.2 Vollblut .....	23
2.9.3 Messmethoden .....	24
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.1	CHEMIKALIEN, GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	26
3.2	STUFE 1: ETABLIERUNG EINER OPTIMALEN PROTEINBESTIMMUNGSMETHODE NACH BRADFORD.	30
3.2.1	Ermittlung der Proteinkonzentration nach verschiedenen Proteaseeinwirkzeiten .....	32
3.2.2	Feststellen des Eigenproteingehaltes der Protease .....	33
3.2.3	Bradfordtestdurchführung nach der SPE und nachfolgende Messung des Spikes mittels HPLC/MS .....	34
3.3	STUFE 2: ERMITTLUNG DER OPTIMALEN PH-EINSTELLUNG MITTELS DER HPLC/MS-MESSUNG..	38
3.3.1	Enzymatische Inkubation von Albumin und Plasma mit und ohne saurem Phosphat-Puffer und nachfolgende Messung mittels HPLC/MS .....	39
3.3.2	Inkubation von Plasma mit Protease bei verschiedenen Phosphatpuffern und nachfolgende Messung des 5-MTHF- Spikes mittels HPLC/MS.....	40
3.4	STUFE 3: EINSATZ GELÄUFIGER FÄLLUNGSMETHODEN .....	41
3.4.1	Plasmafällung mit Acetonitril, Trichloressigsäure und Ethanol .....	41
3.4.2	Untersuchung der Plasmafällung mit Acetonitril anhand der Wiederfindungsrate des 5-MTHF-Spikes .....	41
3.5	STUFE 4: ENZYMATISCHE PLASMAPROTEINAUFSPALTUNG MITTELS PANKREATIN .....	42
3.5.1	Bestimmung der Proteaseaktivität im Pankreatin .....	42
3.5.2	Optimierung der Pankreatinkonzentration für den Plasmaproteinabbau.....	45
3.5.3	Versuch zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes nach Plasmainkubation mit Pankreatin	46
3.5.4	Versuche zur Wiederfindung des Spikes mit Hauptaugenmerk auf die SPE.....	47
3.6	STUFE 5: ÜBERGANG AUF DEN BASISCHEN PHOSPHATPUFFER- FERTIGUNG VON 5-MTHF-SPIKE IM BASISCHEN MILIEU .....	48
3.6.1	Wiederfindung des im basischen Phosphatpuffer hergestellten 5- MTHF-Spike mit Hauptaugenmerk auf die SPE .....	48
3.6.2	Optimierung des Acetonitril:H <sub>2</sub> O-Verhältnisses beim Elutionsschritt in der SPE .....	49
3.7	STUFE 6: PLASMAPROTEINFÄLLUNG MITTELS META- PHOSPHORSÄURE NACH NELSON ET AL. 2004.....	49
3.7.1	Einsatz der von Nelson et al. 2004 entwickelten Methode und Versuch zur Aufkonzentrierung des 5-MTHF-Spikes durch die SPE.....	50
3.7.2	Einstellung des Elutionsvolumen bei der SPE mit vorheriger Proteinfällung mit meta-Phosphorsäure.....	51
3.7.3	Überprüfung der Einstellung der Fraktionsgröße anhand verschiedener Plasma- und Spikevolumina .....	52
3.8	STUFE 7: KOMBINATION VON DEN EINGESTELLTEN FRAKTIONSGRÖßEN UND DER FÄLLUNGSMETHODE NACH NELSON ET AL. 2004 MIT DEN ENZYMATISCHEN METHODEN .....	53
3.8.1	Inkubation von Plasma mit Pankreatin/Protease mit dem verkleinerten Elutionsvolumen bei der SPE .....	53
3.8.2	Versuche zur Wiederfindung des Spikes .....	54

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.8.3	Wiederfindungsversuche von 5-MTHF-Spike und Methotrexat- Spike .....	55
4	ERGEBNISSE .....	57
4.1	STUFE 1: ERGEBNISSE ZU DEN BRADFORDVERSUCHEN.....	57
4.1.1	Ergebnisse zur Ermittlung der Proteinkonzentration nach verschiedenen Proteaseeinwirkungszeiten .....	57
4.1.2	Eigenproteingehalt der Protease .....	58
4.1.3	Ergebnisse der Proteinkonzentrationen nach der SPE.....	59
4.2	STUFE 2: ERMITTLUNGEN DER OPTIMALEN PH-EINSTELLUNG.....	60
4.2.1	HPLC-MS-Ergebnisse zur enzymatischen Inkubation von Albumin und Plasma mit und ohne saurem Phosphat-Puffer.....	60
4.2.2	HPLC/MS-Ergebnisse zur Inkubation von Plasma mit Protease bei verschiedenen Phosphatpuffern.....	62
4.3	STUFE 3: ERGEBNISSE ZU DEN FÄLLUNGSMETHODEN.....	63
4.3.1	Total-Ionen-Chromatogramme zu den Fällungen mittels ACN, TCA und EtOH.....	63
4.3.2	Ergebnisse zur Plasmafällung mit Acetonitril anhand der Wiederfindungsrate des 5- MTHF-Spikes.....	64
4.4	STUFE 4: ERGEBNISSE ZUR ENZYMATISCHEN PLASMAPROTEINAUFSPALTUNG MIT PANKREATIN ..	65
4.4.1	Ergebnisse zur Bestimmung der Proteaseaktivität im Pankreatin .....	65
4.4.2	Ergebnisse zur Optimierung der Pankreatinkonzentration für den Plasmaproteinabbau ..	67
4.4.3	MS-Ergebnisse zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes nach Plasmainkubation mit Pankreatin.....	70
4.4.4	Ergebnisse zur Wiederfindung des Spikes nach der SPE .....	72
4.5	STUFE 5: ÜBERGANG AUF DEN BASISCHEN PHOSPHATPUFFER.....	73
4.5.1	Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes beim basischen Phosphatpuffer .....	73
4.5.2	Ergebnisse zur Optimierung des Acetonitril:H <sub>2</sub> O-Verhältnisses beim Elutionsschritt in der SPE.....	76
4.6	STUFE 6: ERGEBNISSE ZUR PLASMAPROTEINFÄLLUNG MITTELS META-PHOSPHORSÄURE .....	78
4.6.1	Ergebnisse zur von Nelson et al. 2004 entwickelten Methode und Aufkonzentrierung des 5-MTHF-Spikes durch die SPE.....	78
4.6.2	Ergebnisse zur Einstellung des Elutionsvolumens .....	80
4.6.3	Ergebnisse zur Überprüfung der Einstellung der Fraktionsgröße anhand verschiedener Plasma- und Spikevolumina .....	82
4.7	STUFE 7: ERGEBNISSE ZUR KOMBINATION VON EINGESTELLTER FRAKTIONSGRÖÙE, FÄLLUNGSMETHODE MIT META-PHOSPHORSÄURE UND DEN ENZYMATISCHEN METHODEN .....	84
4.7.1	Ergebnisse zur Inkubation von Plasma mit Pankreatin/Protease mit dem verkleinerten SPE-Elutionsvolumen .....	84
4.7.2	Ergebnisse zu den Versuchen zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes .....	84

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.7.3 Ergebnisse zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes und des Methotrexat-Spikes .....	85
5 DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG .....	89
5.1 PROBLEMATIK DER PROTEINKONZENTRATIONSERMITTLUNG NACH DER INKUBATION MIT PROTEASE/PANKREATIN .....	89
5.2 PROBLEMATIK DES EINSATZES VON VERSCHIEDENEN PUFFERN .....	91
5.3 PROBLEMATIK DER AUFREINIGUNG MITTELS SPE .....	92
5.4 PROBLEMATIK DER FÄLLUNGSMETHODEN .....	94
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	96
7 SUMMARY .....	97
8 LITERATUR .....	98
LEBENS LAUF .....	109

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Chemische Struktur der Tetrahydrofolsäure .....	3
<b>Abbildung 2:</b> Oxidationsformen der Folate .....	4
<b>Abbildung 3:</b> Überblick über die biochemischen Funktionen der verschiedenen Folatverbindungen .....	7
<b>Abbildung 4:</b> Homocysteinkreislauf .....	8
<b>Abbildung 5:</b> 4 Schritte der SPE .....	21
<b>Abbildung 6:</b> Standardgerade zur Demonstration der Protein-Konzentrationsberechnung .....	31
<b>Abbildung 7:</b> Standardgerade des Versuches 3.2.1 .....	57
<b>Abbildung 8:</b> LC- und Massenspektrum des Versuches 3.3.1 (Albumin+Puffer) .....	60
<b>Abbildung 9:</b> 5-MTHF-Vergleich zwischen Albumininkubationen mit und ohne Puffer .....	61
<b>Abbildung 10:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.3.1 (Plasma+Puffer) .....	61
<b>Abbildung 11:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.3.2 .....	62
<b>Abbildung 12:</b> Fällung mit ACN .....	63
<b>Abbildung 13:</b> Fällung mit Ethanol .....	63
<b>Abbildung 14:</b> Fällung mit TCA .....	64
<b>Abbildung 15:</b> LC-MS-Spektrum der Fällung mit 500µl ACN .....	65
<b>Abbildung 16:</b> Standardgerade mit "kleinen" Proteinstandards .....	67
<b>Abbildung 17:</b> Standardgerade mit "großen" Proteinstandards .....	67
<b>Abbildung 18:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (Spike Blank) .....	70
<b>Abbildung 19:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (1. Fraktion) .....	70
<b>Abbildung 20:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (2. Fraktion) .....	71
<b>Abbildung 21:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (3. Fraktion) .....	71
<b>Abbildung 22:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.6.1 (Spike-Blank) .....	74
<b>Abbildung 23:</b> LC-MS-Spektrum des Versuches 3.6.1 (2. Fraktion) .....	74
<b>Abbildung 24:</b> LC-Spektrum des Versuches 3.6.1 (Waschpuffer) .....	75
<b>Abbildung 25:</b> 5-MTHF-Wiederfindung im Versuch 3.6.1 .....	75
<b>Abbildung 26:</b> Prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate bei unterschiedlichen Elutionsverhältnissen I .....	76
<b>Abbildung 27:</b> Prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate bei unterschiedlichen Elutionsverhältnissen II .....	77
<b>Abbildung 28:</b> Prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindung bei der Elution mit reinem Wasser .....	77
<b>Abbildung 29:</b> LC- und MS-Spektren der Elutionen mit 10:90 und 75:25 ACN:H <sub>2</sub> O .....	79

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

<b>Abbildung 30:</b> prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate in 3ml Plasma beim Eluieren mit 10:90 ACN:H <sub>2</sub> O.....	79
<b>Abbildung 31:</b> prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate in 6ml Plasma beim Eluieren mit 75:25 ACN:H <sub>2</sub> O.....	80
<b>Abbildung 32:</b> LC-MS-Spektren zur Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens .....	80
<b>Abbildung 33:</b> 5-MTHF-Wiederfindungsrate in 1ml Plasma .....	82
<b>Abbildung 34:</b> 5-MTHF (40µl)-Wiederfindung in 3ml Plasma.....	83
<b>Abbildung 35:</b> 5-MTHF (90µl)-Wiederfindung in 3ml Plasma.....	83
<b>Abbildung 36:</b> Vergleich der Spike- Spikewiederfindung nach Inkubation mit und ohne Pankreatin .....	84
<b>Abbildung 37:</b> prozentueller Vergleich der Spike- Spikewiederfindung nach Inkubation mit und ohne Pankreatin .....	85
<b>Abbildung 38:</b> LC-MS-Spektren von den 5-MTHF und Methotrexat-Spikes .....	86
<b>Abbildung 39:</b> 5-MTHF- und Methotrexat- Wiederfindung mit und ohne SPE nach der Proteaseeinwirkung im Puffer .....	87
<b>Abbildung 40:</b> 5-MTHF- und Methotrexat- Wiederfindung mit und ohne SPE nach der Pankreatineinwirkung im Puffer.....	88

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Coenzymformen der Folate (modifiziert nach LUCOCK 2000).....	5
<b>Tabelle 2:</b> Empfohlene Folatzufuhr (D-A-CH 2001) .....	11
<b>Tabelle 3:</b> Errechnung der Albuminkonzentration x anhand der Standardgerade .....	31
<b>Tabelle 4:</b> Pipettierschema im Versuch 3.2.1.....	33
<b>Tabelle 5:</b> Ansätze der Protease- und Albuminkonzentrationen im Versuch 3.2.2.....	34
<b>Tabelle 6:</b> Pipettierschema aller 24 Ansätze im Versuch 3.2.3 .....	35
<b>Tabelle 7:</b> Ablauf der SPE im Versuch 3.2.3 .....	37
<b>Tabelle 8:</b> Durchführung der SPE im Versuch 3.3.1 .....	39
<b>Tabelle 9:</b> Pipettierschema und pH-Messungen im Versuch 3.3.2 .....	40
<b>Tabelle 10:</b> Pipettierschema für die Reagentien zur Proteaseaktivitätsbestimmung .....	44
<b>Tabelle 11:</b> Pipettierschema für die Tyrosinstandards .....	45
<b>Tabelle 12:</b> Pipettierschema der Probe- und Spike Blank-Lösungen im Versuch 3.7.3 .....	52
<b>Tabelle 13:</b> Pipettierschema im Versuch 3.8.2.....	55
<b>Tabelle 14:</b> Pipettierschema im Versuch 3.8.3.....	56
<b>Tabelle 15:</b> Ergebnisse des Versuches 3.2.1 .....	58
<b>Tabelle 16:</b> Ergebnisse des Versuches 3.2.2 .....	58
<b>Tabelle 17:</b> Tyrosinstandards .....	66
<b>Tabelle 18:</b> Tyrosinkonzentrationen nach enzymatischer Einwirkung.....	66
<b>Tabelle 19:</b> "kleine" und "große" Proteinstandards .....	67
<b>Tabelle 20:</b> Berechnung der Proteinkonzentrationen direkt nach der enzymatischen Inkubation mit der "großen" Geradengleichung .....	68
<b>Tabelle 21:</b> Abzüge der Enzymleerwerte von den Proteinansätzen .....	69
<b>Tabelle 22:</b> Berechnung der Proteinkonzentrationen ohne Eigenproteingehalt der Enzyme mit der "kleinen" Geradengleichung.....	69
<b>Tabelle 23:</b> Spikewiederfindung (qualitativ) im Versuch 3.5.4.....	72

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
AO	Antioxidans (-tien)
°C	Grad Celsius
D-A-CH	Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung
DHF	Dihydrofolsäure (-folat)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
FÄ	Folatäquivalent
FBP	Folatbindendes Protein
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC/ESI-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Elektrospray-Massenspektrometrie
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat dibasisch (di-Kaliumhydrogenphosphat)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie
5-MTHF	5-Methyl-Tetrahydrofolsäure (-folat)
M	Molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

nm	Nanometer
nmol	Nanomol
pH	$-\log[\text{H}^+]$
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Retentionszeit
SPE	Festphasenextraktion (solid-phase extraction)
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofolsäure (-folat)
TIC	Totalionenchromatogramm
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen



# 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

## 1.1 Problemstellung der Arbeit

Das wasserlösliche Vitamin Folsäure hat eine wichtige biochemische Funktion als Coenzym für die Übertragung von 1-Kohlenstoffresten in verschiedenen Reaktionen im Bereich der DNA- und der Aminosäuresynthese.

Eine mangelhafte Zufuhr hat oft schwerwiegende Veränderungen des Blutbildes, Homocysteinstoffwechsels, embryonaler Entwicklung, des DNA-Reparatursystems und dadurch Entwicklung verschiedener Krebsarten zur Folge.

Folsäure kommt in der Natur in Lebensmitteln aller Art als Nahrungsfolat vor, das zum Unterschied zur reinen synthetischen Folsäure nicht vollständig absorbiert wird. Hinzu kommt, dass die Konzentrationen an Nahrungsfolaten in den meisten Lebensmitteln nur gering sind, und dass eine Folsäureunterversorgung nicht allzu selten vorkommt.

Betrachtet werden muss zusätzlich der unterschiedliche Genotyp der Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), einem Enzym, das für die Erhaltung der Folatinterkonversionen im Körper verantwortlich ist. Eine autosomal rezessive Mutation des Gens für dieses Enzym ist nicht selten. Es wird zwischen einer homozygoten und heterozygoten Mutation unterschieden, die sich unterschiedlich auf Folatkonzentrationen und Aufteilung der Folatmetaboliten im Körper auswirken und vor allem auch in der Schwangerschaft entscheidend für eine Folatunterversorgung sein könnten.

Um die Risikogruppe der Schwangeren ausreichend mit Folsäure zu versorgen, haben einige Länder die Mehlanreicherung mit der synthetischen Folsäure in Kraft gesetzt, andere Länder führen weiterhin Diskussionen über Vor- und Nachteile einer solchen Handlung. Die Diskussion ist im Fall eines Vitamin B12-Mangels berechtigt, denn eine Folatüberzufuhr könnte einen Vitamin B12-Mangel maskieren. Durch die zu hohe Folsäurezufuhr verschwinden die hämatogenen Symptome des Vitamin B12 Mangels,

die sonst leicht durch eine Blutbildkontrolle erkannt werden würden und der Mangel würde erst in einem zu hohem Stadium als neurologische Symptome zum Ausdruck kommen.

Aus diesen verschiedenen Problemstellungen besteht Interesse die körperliche Folatversorgung des Menschen diagnostizieren zu können.

Es wurden verschiedene Methoden beschrieben wie bestimmte Folatmetaboliten gemessen werden können. Zurzeit gibt es unterschiedliche Methoden in der Lebensmittelfolatbestimmung und bei der Messung des Folatgehaltes in humanem Serum oder Plasma, sowie Vollblut. Diese unterscheiden sich zum Teil in der Probenaufbereitung und in den Messmethoden. Die Detektionsverfahren bei den HPLC-Methoden reichen von UV-Detektoren, Fluoreszenz-Detektoren bis zu verschiedenen Möglichkeiten der Massenspektrometrie. Da die Konzentrationen der Folate sehr niedrig sind und die Gefahr der Interkonversionen der Metaboliten ineinander aufgrund des pHs besteht, haben sich die sensibelsten Detektionsmethoden durchgesetzt, nämlich die massenspektrometrischen.

### **1.2 Ziel der Arbeit**

Es sollen enzymatische Methoden, wie sie schon seit Jahrzehnten bei Lebensmitteln angewendet wurden, zur Folatmessung auf die Folatanalytik im Humanplasma erprobt werden. Das Ziel wäre eine optimale Methode für die enzymatische Aufarbeitung von Plasma zu finden. Als Vergleich für die Güte der Ergebnisse, die mit enzymatischen Methoden erzielt werden, sollen die für das Humanplasma typischen Fällungsmethoden eingesetzt werden. Der Aufreinigungsschritt nach der enzymatischen Inkubation soll mittels einer für die Folatanalytik optimisierten Festphasenextraktion (SPE) erzielt werden. Die Messung des Hauptmetaboliten 5-Methyl-THF, erfolgt mittels HPLC/ESI-MS.

Das Ziel wäre eine neue Erkenntnis im Bereich der Folatanalytik im Humanplasma zu liefern und diese, falls sie funktionsfähig ist, als Standardmethode abzugleichen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Eigenschaften, Vorkommen, Chemie

Das Vitamin Folsäure gehört zu der Gruppe der wasserlöslichen Vitamine. Im festen Aggregatzustand handelt es sich um ein gelb-oranges kristallines Pulver, welches unlöslich in Wasser, Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln ist. Eine Löslichkeit ist gegeben bei Essigsäure, Phenol, Pyridin, Alkalihydroxid-, Alkalicarbonat-Lösungen und in Salz- sowie Schwefelsäure. Folsäurelösungen sind sehr empfindlich gegenüber Licht, Hitze und Sauerstoff. (BÄSSLER et al. 2002)

Natürliche Quellen der Folsäure sind bestimmte Gemüsearten wie Tomaten, verschiedene Kohlarten, Spinat, Gurken, weiters Sojabohnen, Weizenkleie, Orangen, Weintrauben, Brot und Backwaren aus Vollkornmehl, Kartoffel, Fleisch, Leber, Milch und Milchprodukte sowie Eier. (D\_A\_CH 2001)

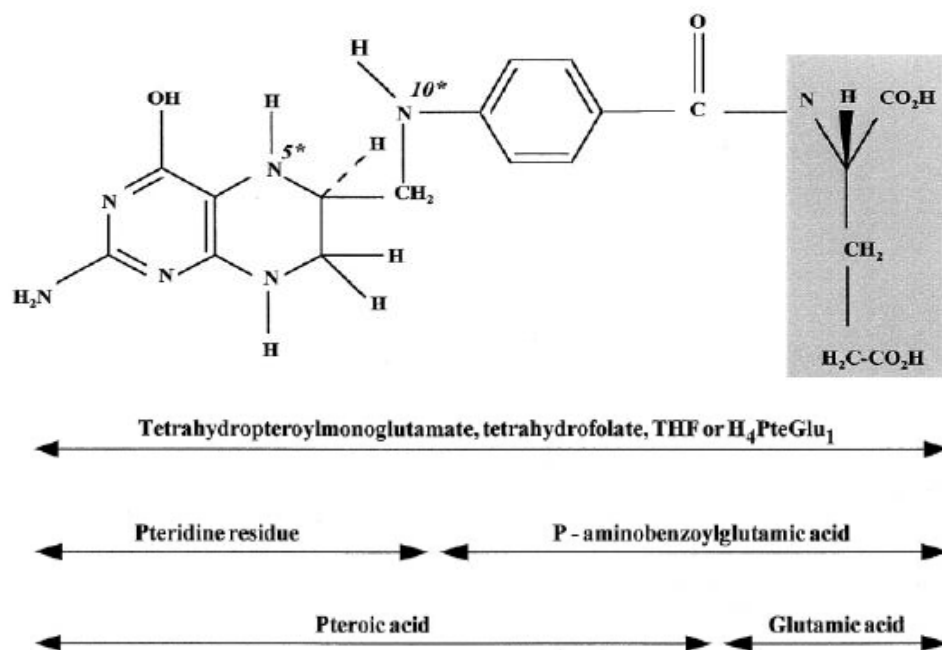


Abbildung 1: Chemische Struktur der Tetrahydrofolsäure

(LUCOCK 2000)

## LITERATURÜBERSICHT

Die biologisch aktiven Folsäure-Verbindungen und deren Derivate werden unter dem Begriff Folate zusammengefasst.

Die chemisch richtige Bezeichnung ist Pteroylmonoglutaminsäure (bzw. Pteroylmonoglutamat), da Folsäure aus einem stickstoffhaltigen Pteridinring besteht, an dessen C6 eine Methylengruppe angrenzt, über die die para-Aminobenzoesäure an ihrer Aminogruppe gebunden ist. Die so beschriebene Verbindung entspricht der Bezeichnung Pteroinsäure; je nachdem wie viele Glutaminsäure-Reste über die Peptidbindung an der Carboxylgruppe der Pteroinsäure dranhängen, unterscheidet man zwischen Pteroylmono-, Pteroyldi-, Pteroyltri-, Pteroylhepta- und Pteroylpolyglutamaten. Wenn mehr als ein Glutamatmolekül an der Pteroinsäure dranhängt, handelt es sich bei der Verbindung um ein Folat. Folate kommen als folatwirksame Vitamine in der Nahrung vor und fungieren im Körper als Folat-Coenzyme. Die Folsäure an sich besitzt nur ein Glutamatmolekül. (BÄSSLER et al. 2002)

Die Pteroylmonoglutaminsäure kommt in der Natur nicht vor, sie kann synthetisch hergestellt werden und stellt die stabilste Form mit der höchsten Oxidationsstufe dar. Diese Form des Vitamins findet Verwendung in Supplementen und Medikamenten. Außer in der oxidierten Form wie bei der Pteroylmonoglutaminsäure kann der Pteridinring auch in der dihydrierten und in der tetrahydrierten Form vorliegen.

Die natürlich vorkommenden Folatverbindungen unterscheiden sich somit durch ihren Hydrierungsgrad des Pteridingerüsts, weiters durch die verschiedenen C1 Substituenten am N5 und N10, wie zum Beispiel Methyl- und Formylgruppen, und durch die Länge der Glutamylkette. (PIETRZIK et al. 2008)

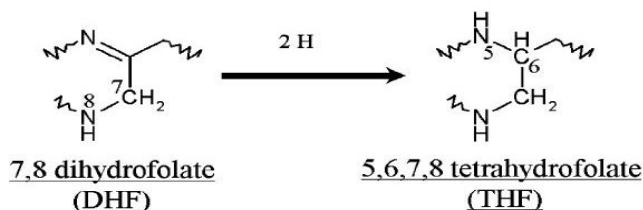


Abbildung 2: Oxidationsformen der Folate  
(QUINLIVAN et al. 2006)

<u>Coenzym</u>	<u>Substituent an</u>	
	<b>N-5</b>	<b>N-10</b>
5-Formyl-THF	-HCO	-H
5,10-Methenyl-THF		=CH <sup>+</sup> -
5,10-Methylen-THF		-CH <sub>2</sub> -
5-Methyl-THF	-CH <sub>3</sub>	
10-Formyl-THF	-H	-HCO
THF	-H	-H

**Tabelle 1: Coenzymformen der Folate (modifiziert nach LUCOCK 2000)**

## 2.2 Bioverfügbarkeit der Nahrungsfolate

Bei einer normalen Mischkost findet nur eine teilweise Folatabsorption von bis zu 50% statt, wo hingegen aber bei bestimmten Lebensmitteln, vorwiegend ausgesuchten Obst- und Gemüseprodukten, die Bioverfügbarkeit teilweise auch bei 60-90% liegt, die Absorptionsrate sinkt aber in Kombination mit anderen Lebensmitteln.

Die wichtigsten verantwortlichen Faktoren für eine verminderte Bioverfügbarkeit sind die Anwesenheit von natürlichen Inhibitoren in der Nahrung, chemische Instabilität von reduzierten Folaten im Verdauungssystem und Blockieren von Folaten durch die zellulären Strukturen des Pflanzenmaterials. (GREGORY 2001)

Die Nahrungsfolate kommen hauptsächlich als 5-Methyl-THF und Formyl-THF vor, wobei die Methylform die Hauptform darstellt, die leicht zu 5-Methyl-5,6-DHF oxidiert werden kann. Während der Verdauung findet durch die saure Umgebung im Magen eine viel leichtere Zerstörung der 5-Methyl-DHF als 5-Methyl-THF statt, die gegenüber dem sauren Umfeld relativ stabil sind. Deswegen verbessern reduzierende Substanzen wie zum Beispiel Ascorbinsäure die Bioverfügbarkeit der Nahrungsfolate, indem sie die labile Dihydrofolatform wieder in die Tetrahydrofolatform reduzieren. (LUCOCK 2000)

## 2.3 Absorption und Stoffwechsel

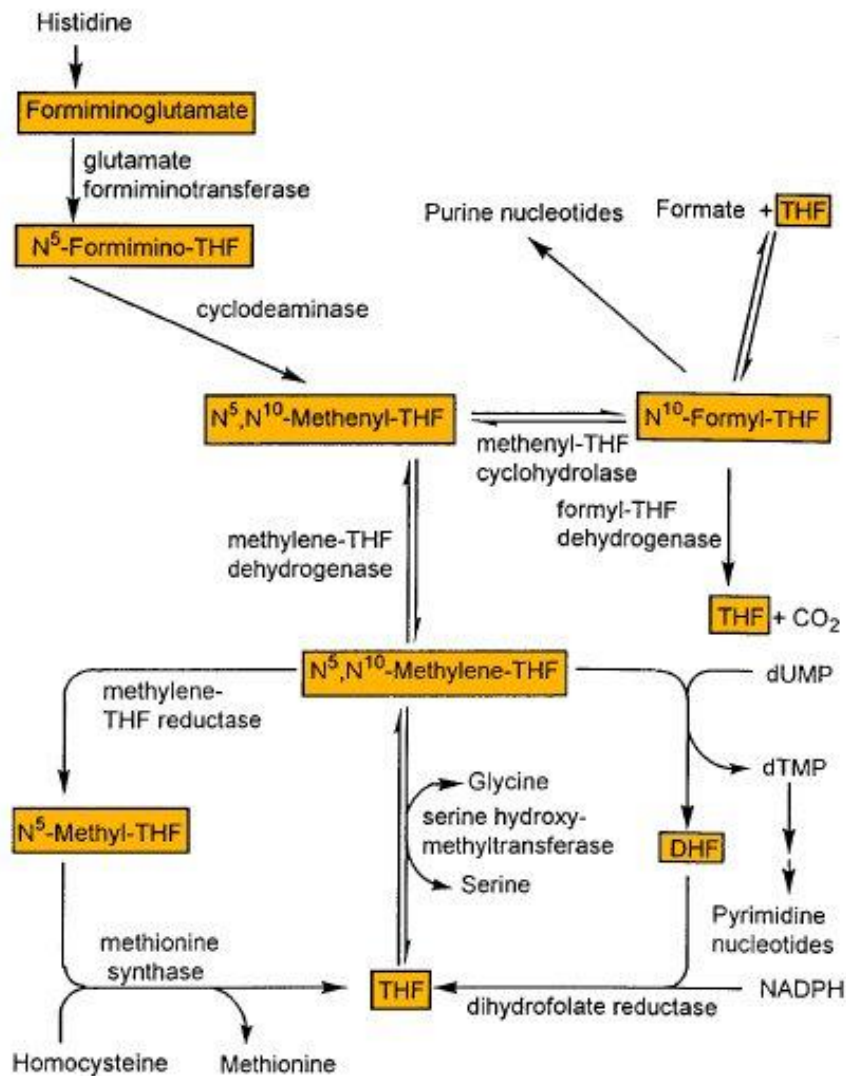
Die Absorption des Nahrungsfolates im Darm findet statt, indem die vorliegenden Polyglutamate mittels Konjugasen ( $\gamma$ -Glutamyl-Carboxypeptidase) zu Monoglutamaten gespalten werden und so durch aktiven, carriervermittelten Transport ins Duodenum und proximale Jejunum gelangen. Die Folate gelangen als erstes in die Leber, dort werden sie in die Transportform 5-Methyl-THF umgewandelt und daraufhin in den Blutkreislauf, wo sie neben der methylierten Form auch als THF und 10-Formyl-THF vorkommen und an Plasmaproteine und Transferrin gebunden zu verschiedenen Zellen transportiert werden. In den Zellen wird das Folat wieder in die Polyglutamatform überführt, die als Speicherform dient. Die für den Bluttransport benötigte 5-Methyl-THF wird im Zuge dieser Konjugation zum THF demethyliert, da nur dieses mit Polyglutamaten beladen werden kann. Somit ist die Polyglutamyl-THF die Speicherform, wie sie in allen Geweben vorkommt und die 5-MTHF die Haupttransportform im Blut. (PIETRZIK et al. 2008)

## 2.4 Biochemische Funktionen

Die biologisch aktiven Formen sind 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF) und ihre Derivate. (PIETRZIK et al. 2008)

Die Tetrahydrofolsäure fungiert als Coenzym, das für die biologische Funktion im Organismus als C1-Überträger verantwortlich ist. Die wichtigsten dieser 1-Kohlenstoffreste sind Methyl-, Formyl-, Formiat- und Hydroxymethylreste, die, wie oben erwähnt, an den N-Atomen auf den Positionen 5 bzw. 10 des Pteroylrestes der THF substituiert sind. (LÖFFLER et al. 2007)

Die verschiedenen C1-Reste werden für verschiedene Biosynthesen benötigt, wie zum Beispiel für die Purinsynthese, bei welcher der C2 und C8 des Purinrings durch N10-Formyl-Tetrahydrofolat bereitgestellt werden. Nach der erfolgten Reaktion bleibt THF übrig. (LÖFFLER et al. 2007; FOWLER 1998)



**Abbildung 3: Überblick über die biochemischen Funktionen der verschiedenen Folatverbindungen (FOWLER 1998)**

Außerdem ist eine weitere Funktion in der DNA-Synthese von Bedeutung: Durch das N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methylen-tetrahydrofolat wird eine Methylgruppe für die Methylierung von d-Uridylat zu d-Thymidylat gewährleistet. Dabei entsteht Dihydrofolat, das über eine Dihydrofolatreductase zu THF reduziert werden kann. (BÄSSLER et al. 2002)

Als dritte Funktion ist die Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Methylierung von Homocystein zu Methionin durch Methyl-THF zu erwähnen; eine Funktion, die bei einem Folsäuremangel ausfällt und der erhöhte Homocysteinspiegel im Blut als früher Indikator diagnostiziert werden kann. (LÖFFLER et al. 2007; BÄSSLER et al. 2002) Anhand des



## 2.5 Mangelsymptome

Bei einem Folsäuremangel tritt ein erhöhter Plasmahomocysteinspiegel auf, der mit verschiedenen Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose, einhergeht.

Einige Studien zeigten, dass obstruktive Gefäßerkrankungen ein Risikofaktor für Auftreten von Alzheimer sind, was somit auch bedeutet, dass Homocystein, der für das erstere verantwortlich ist, auch ein Risikofaktor für das zweite wäre. (LUCOCK 2000)

Ein klinisches Mangelsymptom ist die Megaloblastäre Anämie, bei der Megaloblasten, abnormale Vorstufen der Erythrocyten, im Knochenmark auftreten, verursacht durch die gestörte Zellteilung der Stammzellen. Es treten große Erythrozyten in verminderter Zahl und veränderter Form auf, die eine höhere Hämoglobinkonzentration als normal haben. Deswegen heißt diese Anomalie makrozytäre, hyperchrome Anämie. (BAILEY & GREGORY 1999a; THEWS et al. 1999)

Die Zahl der Leukocyten und der Thrombocyten ist vermindert. Die Gewebe mit hoher Zellteilungsrate, wie die Schleimhaut des Darms und des Urogenital-Traktes, sind vom Mangel, aufgrund der Schlüsselrolle der ausbleibenden Folsäure in der Nukleinsäuresynthese, sehr betroffen. (BAILEY & GREGORY 1999a; D\_A\_CH 2001)

Es kommt zur Entstehung bestimmter Krebsarten, da sich aufgrund des Vitaminmangels die DNA-Struktur, -Stabilität und die -Transkriptionsregulation verändern und somit der Reperaturmechanismus überlastet wird. (BAILEY & GREGORY 1999a)

Ein Folsäuremangel der Mutter kann sich auf die geistige Entwicklung des neugeborenen Kindes auswirken wie zum Beispiel die Inzidenz von Down Syndrom bei Kindern. Der C677T Polymorphismus der Methylentetrahydrofolat-Reduktase war höher bei Müttern, die Kinder mit Down-Syndrom hatten als bei Müttern ohne Kinder mit Down-Syndrom. Dieser Polymorphismus gilt dementsprechend als Risikofaktor für mentale Schäden von Kindern (siehe unten). Weiters ist das Auftreten von Neuralrohrdefekten bei Neugeborenen ein Mangelsymptom für Mütter, der durch eine perikonzeptionelle Supplementation behoben werden könnte. (TAMURA & PICCIANO 2006)

Weitere in der Schwangerschaft auftretende Komplikationen wären der schwangerschaftsbedingte Bluthochdruck, Fehlgeburten und niedriges Geburtsgewicht, die alle höchstwahrscheinlich durch einen erhöhten Homocysteinspiegel verursacht werden. (LUCOCK 2000)

Ein Risikofaktor für Folsäuremangel ist die C→T Substitution des Gens, das Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) kodiert, welche das 5-Methyl-THF aus 5,10-Methylen-THF produziert. Diese autosomal rezessive Mutation hat zur Folge, dass die MTHFR eine niedrigere Aktivität aufweist und somit niedrigere Konzentrationen an 5-Methyl-THF im Körper bestehen und folglich eine verminderte Methylierung des Homocysteins zu Methionin stattfinden kann. Es wird zwischen einem homozygoten und heterozygoten Genotyp der Mutation C677T unterschieden, wobei die homozygote Form ein höheres Risiko an Mangelsymptomen besitzt, da der Plasmafolatspiegel bei diesen Betroffenen signifikant niedriger ist. Deswegen ist der Folsäurebedarf unterschiedlich bezüglich des individuellen Genotyps. (BAILEY & GREGORY 1999b; LUCOCK 2000)

## 2.6 Zufuhrempfehlungen

Für Erwachsene liegen die Empfehlungen der D\_A\_CH 2001 bei 400µg Nahrungsfolat pro Tag. Bei Kindern gibt es keine experimentell belegten Daten, deswegen sprechen D\_A\_CH 2001 die Empfehlungen anhand von Schätzungen verglichen mit dem Erwachsenenbedarf aus, die jeweils vom Alter und Entwicklungsstufe des Kindes variieren (siehe Tabelle).

In der Schwangerschaft und Stillzeit ist der Bedarf an Folsäure durch den Fetus bzw. die Milchabgabe um 200µg/Tag erhöht. Zu beachten ist, dass Frauen, die schwanger werden möchten, 4 Wochen vor der Konzeption zusätzlich 400µg synthetische Folsäure am Tag aufnehmen sollten, um die Gefahr des Auftretens eines Neuralrohrdefektes in den ersten 4 Schwangerschaftswochen zu vermeiden. (D-A-CH 2001; GUJSKA & KUNCEWICZ 2005)

In einigen Ländern wurde die Folsäureanreicherung von Mehl initiiert, um die Risikogruppe der Schwangeren besser mit Folsäure zu versorgen. Diese Anreicherung

## LITERATURÜBERSICHT

stellt noch immer einen Diskussionspunkt für Experten dar, da sie sich für bestimmte Bevölkerungsgruppen auch gegensätzlich auswirken könnte, weil eine zu hohe Aufnahme an Folsäure einen Vitamin B12-Mangel maskieren könnte, während die Zielgruppe möglicherweise gar nicht erreicht werden würde. (GUJSKA & KUNCEWICZ 2005)

Deswegen haben D\_A\_CH 2001 einen Upper Level von 1000µg/Tag für die Zufuhr an synthetischer Folsäure aufgestellt. Das natürliche Nahrungsfolat, das weit unvollständiger absorbiert wird, unterliegt keinen Begrenzungen.

**Tabelle 2: Empfohlene Folatzufuhr (D-A-CH 2001)**

Alter	Nahrungsfolat		
	µg-Äquivalent <sup>1</sup> /Tag	µg/MJ <sup>2</sup> (Nährstoffdichte)	
		m	w
<b>Säuglinge</b>			
0 bis unter 4 Monate <sup>3</sup>	60	30	32
4 bis unter 12 Monate	80	27	28
<b>Kinder</b>			
1 bis unter 4 Jahre	200	43	45
4 bis unter 7 Jahre	300	47	52
7 bis unter 10 Jahre	300	38	42
10 bis unter 13 Jahre	400	43	47
13 bis unter 15 Jahre	400	36	43
<b>Jugendliche und Erwachsene</b>			
15 bis unter 19 Jahre <sup>4</sup>	400	38	47
19 bis unter 25 Jahre <sup>4</sup>	400	38	49
25 bis unter 51 Jahre <sup>4</sup>	400	39	51
51 bis unter 65 Jahre	400	43	54
65 Jahre und älter	400	48	58
<b>Schwangere</b> <sup>4</sup>	600		
<b>Stillende</b>	600		

<sup>1</sup> Berechnet nach der Summe folatwirksamer Verbindungen in der üblichen Nahrung = Folat-Äquivalente (gemäß neuer Definition)

<sup>2</sup> Berechnet für Jugendliche und Erwachsene mit überwiegend sitzender Tätigkeit (PAL-Wert 1,4)

<sup>3</sup> Hierbei handelt es sich um ein Schätzwert

<sup>4</sup> Frauen, die schwanger werden wollen oder könnten, sollten zusätzlich 400µg synthetische Folsäure (=Pteroylmonoglutaminsäure) in Form von Supplementen aufnehmen, um Neuralrohrdefekten vorzubeugen. Diese erhöhte Folsäurezufuhr sollte spätestens 4 Wochen vor Beginn der Schwangerschaft erfolgen und während des ersten Drittels der Schwangerschaft beibehalten werden.

## 2.7 Folatäquivalente

Nahrungsfolate und synthetische Folate werden unterschiedlich vollständig absorbiert. Ein Supplement wird fast zu 100% absorbiert, wenn ein mit Folsäure angereichertes Lebensmittel aufgenommen wird, ist die Bioverfügbarkeit des synthetischen Folates nur mehr 85% und die Absorptionsrate des natürlich vorkommenden Nahrungsfolates liegt bei ca 50%. Um die drei Folattypen miteinander gleichstellen zu können, werden Nahrungsfolatäquivalente angegeben. Sie stellen einen Umrechnungsfaktor von  $\mu\text{g}$  synthetischer Folsäure in Einheiten an natürlich vorkommenden Nahrungsfolaten dar.

$1\mu\text{g F}\ddot{\text{A}} = 1\mu\text{g Nahrungsfolat} = 0,6\mu\text{g synthetische Folsäure im Nahrungsmittel} = 0,5\mu\text{g synthetische Folsäure als Supplement. (WEST SUTOR \& BAILEY 2000)}$

## 2.8 Folatanalytik in Lebensmitteln

### 2.8.1 Trienzymmethode

Die Trienzymmethode, eine Methode zur Extraktion des Nahrungsfolates, wurde Mitte der 90er Jahre beschrieben. Sie zeichnet sich durch die Verwendung der Enzyme  $\alpha$ -Amylase, Protease und Folylpoly- $\gamma$ -Glutamat-Carboxylpeptidase II (Folatkonjugase) aus. Verschiedene Forscher setzen die Enzyme in anderen Verhältnissen und mit anderen Inkubationszeiten und Reihenfolgen sowie pH-Milieus ein und im Falle der Konjugase auch aus unterschiedlicher biologischer Herkunft – nämlich Schweineniere-, Hühnerpankreas-, Rattenplasma- oder auch Menschenplasma- Konjugase. Die 3 Enzyme ermöglichen die Zerstörung der Lebensmittelmatrix und Freisetzung des proteingebundenen Folates, sowie Zerstörung der Polyglutamatreste. Vor der Zugabe der Enzyme muss allerdings eine Homogenisierung des Nahrungsmittels stattfinden, manchmal ist daran auch eine Hitzebehandlung angeschlossen. Alternativ zu dieser „neueren Methode“ gab es früher die sogenannte „traditionelle Nahrungsmittelfolatextraktionsmethode“, die nur aus Wärmebehandlung und Folatkonjugasezugabe bestand, die mittlerweile durch positive Ergebnisse der Trienzymmethode als überholt gilt, in manchen Fällen, abhängig von der Nahrungsmittelkonsistenz, aber immer noch angewandt wird. (HYUN & TAMURA

2005)

Die Anwendung der Trienzymmethode zur Folsäureextraktion in Lebensmitteln hatte erhöhte Messwerte mit einem Anstieg der analysierten Folatverbindungen von 4-300% bei verschiedenen Forschungsteams in den 90er Jahren zufolge. (LIM et al. 1998)

Die Konzentrationsbestimmung von verschiedenen Folsäureformen in biologischen Proben kann mittels Radiobinding Assay, HPLC oder Mikrobiologischen Assay erfolgen. (LIM et al. 1998) Der Mikrobiologische Assay ist von allen Messmethoden am meisten verbreitet. Am öftesten wird *L. rhamnosus* als Mikroorganismus verwendet, da er die meisten metabolischen Folatformen verwerten kann. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass hiermit nur der Gesamtfolatgehalt bestimmt werden kann, die einzelnen Metaboliten bleiben undetektiert. Bei der HPLC hingegen ist es möglich die verschiedenen Folat-Formen festzustellen und somit auch eine bessere Analyse über ihre Interkonversion ineinander bzw. ihre Stabilität zu machen. Eine internationale Labor-Vergleichs-Studie im Jahr 2005 besagte, dass von 26 verschiedenen Labors zur Folsäuredetektion 20 den Mikrobiologischen Assay verwendeten, die HPLC fand in 4 Labors Anwendung und jeweils 1 Labor verwendete LC-MS und Radiobinding Assay. (HYUN & TAMURA 2005)

Der erschwerende Faktor bei der Anwendung der HPLC ist der niedrige endogene Folsäuregehalt in Lebensmitteln und somit die Notwendigkeit einer Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Folsäuremetaboliten. (PFEIFFER et al. 1997)

### **2.8.2 Probenaufbereitung und Aufreinigung**

Die Lebensmittelmatrizes stellen gleich bei der Aufbereitung eine Hürde da. Einerseits muss es eine Homogenisierung im geeigneten Puffer und zuvor, falls notwendig eine Zerreibung der Probenmatrix geben und daraufhin einen Erhitzungsschritt mit der darauf folgenden Abzentrifugierung der Festbestandteile, andererseits geht man mit diesem Vorgang ein großes Risiko bezüglich Folatverlusten bzw. Folatinterkonversionen ein. (ARCOT & SHRESTHA 2005) Verschiedene Puffertypen werden für die Folatextraktion angewendet: Phosphat-Ascorbat-Puffer (RUGGERI et al. 1999; JOHNSTON et al. 2002, IWATANI et al. 2003), Acetat-Ascorbat-Puffer, CHES/HEPES-Puffer mit Ascorbinsäure bzw. Na-Ascorbat und 2-Mercaptoethanol

(PFEIFFER et al. 1997; KARILUOTO et al. 2001; GUJSKA & KUNCEWICZ 2005).  
(ARCOT & SHRESTHA 2005)

Die im Puffer gelösten Antioxidantien werden benötigt, um vor Folatverlusten zu schützen, die sowohl durch eine Abspaltung auf der Position C9-N10 des Pteridinringes stattfinden, als auch durch Reduktion des Pteridinringes eintreten können, verursacht durch die hohen Erhitzungstemperaturen bei der Probenaufbereitung. (QUINLIVAN et al. 2006)

Ein weiterführendes Problem ist die Ermittlung der Effizienz der Folatfreisetzung von der Lebensmittelmatrix bei der durchgeführten Extraktionsmethode. Denn das Erhitzen beim Extraktionsvorgang führt nicht nur zur Zellauflösung, sondern denaturiert auch Proteine und befreit gebundene Folate. Wenn durch den Extraktionsschritt nicht das gesamte gebundene Folat freigesetzt wird, könnte es zum Unterschätzen des Folatgehaltes kommen. (QUINLIVAN et al. 2006)

Shrestha & Arcot, 2000 bemerkten einen höheren Folatverlust nach dem Erhitzen und Zentrifugieren bei der Probenaufbereitung im Gegensatz zu unerhitzten und unzentrifugierten Proben. Das könnte sowohl an der Hitzelabilität der Folate liegen, andererseits auch am Abzentrifugieren und somit Entfernen der nicht enzymatisch aufgespaltenen Lebensmittelmatrix, die noch immer einen signifikanten Teil der Folate gebunden hält. (TAMURA et al. 1997; SHRESTHA & ARCOT 2000; HYUN & TAMURA 2005)

Es wurden verschiedene Temperaturen zur Homogenisierung der Probensubstanz beschrieben, die über 70°C (WITTENBERG et al. 1962), 100°C (PFEIFFER et al. 1997; FINGLAS et al. 1993), 121°C (TAMURA et al. 1997; RADER et al. 1998) gingen, sogar Mikrowellenstrahlen (VAHTERISTO et al. 1996) wurden ausgetestet.

Der Grad des Folatabbaus hängt allerdings vom pH des Mediums, den antioxidativen Bestandteilen im Puffer, der Stabilität des jeweiligen Folatderivates, dem Puffertyp und des Nahrungsmittels an sich ab.

Ascorbinsäure und 2-Mercaptoethanol sind die zwei geläufigsten Antioxidantien, die in verschiedenen Mengen eingesetzt bei unterschiedlichen pHs und Temperaturen eine große Menge an Folatmetaboliten aufrechterhalten. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

### **2.8.3 Enzymbehandlung**

1990 erfanden De Souza & Eitenmiller und Martin et al. das Verfahren, das neben der Folatkonjugase auch Protease und  $\alpha$ -Amylase vorsieht. Mittlerweile ist die Trienzymmethode in verschiedenen Labors sehr verbreitet und bei vielen verschiedenen Lebensmittelgruppen erforscht worden. Es gibt keine spezielle Regel wie die Trienzymmethode angewendet werden sollte, damit optimale Ergebnisse erzielt werden. Das Prinzip wäre einen optimalen pH und eine geeignete Inkubationszeit für jedes Lebensmittel vor der eigentlichen Analytik zu finden und zu entscheiden, ob die Verwendung aller 3 Enzyme aufgrund der Lebensmittelmatrix gerechtfertigt ist.

Auch die Enzymreihenfolge variiert bei vielen Forschern, allerdings ist die Reihenfolge mit Protease/ $\alpha$ -Amylase/Konjugase am geläufigsten. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

Protease und  $\alpha$ -Amylase können kommerziell erworben werden. Das erstere Enzym stammt von *Streptomyces griseus*, das zweite von *A. oryzae*. (TAMURA 1998) Da die Proteasewirkung ziemlich unspezifisch ist, sollte diese nach der Einwirkung deaktiviert werden, um die Konjugaseaktivität nicht zu stören.

Bei der  $\alpha$ -Amylase handelt es sich um eine Endoglykosidase, die Stärke- und Glykogenmoleküle von innen an den  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen abspaltet. (QUINLIVAN et al. 2006) Leider enthält die  $\alpha$ -Amylase genauso wie die meisten Konjugasen im Gegensatz zu der Protease eine hohe Menge an endogenen Folaten, die aber leicht mit Aktivkohle entfernt werden können. (TAMURA 1998)

Die Konjugase ist in letzter Zeit schwer kommerziell erhältlich und muss in Eigenproduktion hergestellt werden.

Es gibt zwei Konjugase-Typen: Exopeptidasen, die Glutamatmoleküle von den Enden her abbauen und Endopeptidasen, die den Glutamatrest von innen abspalten und somit mehrere Glutamatmoleküle auf einmal entfernen. (QUINLIVAN et al. 2006) Hühnerpankreas-Konjugase ist eine Exopeptidase, nach der Dekonjugation mit dieser liegen die Folate als Diglutamate vor. Somit ist diese Konjugase nicht für die HPLC geeignet, sondern nur für einen Mikrobiologischen Assay. Andere Konjugasen sind Endopeptidasen und resultieren mit Monoglutamaten als Endprodukte, womit sie sich

für die HPLC eignen. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

Schweineniere- und menschliche Plasma- Konjugase haben ein pH-Optimum von ca. 4,5; Hühnerpankreas-Konjugase ein Optimum von 7,5 und Rattenplasma-Konjugase ein Optimum von 7,5 in Hepes-Puffer und 6,8 in Kaliumphosphatpuffer. (QUINLIVAN et al. 2006) Die Rattenplasma-Konjugase hat sich in vielen Fällen als die am meisten geeignete Konjugaseform bewährt. (TAMURA 1998)

### **2.8.4 Folatinterkonversionen**

Aus den biochemischen Körper-Funktionen der Folatmetabolite (siehe Kap. 2.4) ist ersichtlich, wie essentiell die Umwandlung der einzelnen Folsäuremetabolite ineinander für den Erhalt des Folatzykluses ist. Diese Umwandlungen passieren aufgrund verschiedener reaktionsspezifischer Enzyme.

In der Analytik ist die Fähigkeit der Folatmetabolite ineinander überzugehen angesehen von Nachteil, da die Interkonversionen hier ungewollt und pH-abhängig ablaufen. Nach einer abgelaufenen Metabolitenumwandlung bei der Trienzymmethode, kann nur durch Annahmen auf die ursprünglich im Lebensmittel vorhandenen Folatmetabolite zurückgeschlossen werden.

Bei sauren pHs zyklisieren 10-Formyl-THF, 5-Formyl-THF und 5-Formimino-THF zu 5,10-Methenyl-THF.

Bei pH4 hydrolysiert das 5,10-Methenyl-THF am meisten zu 5-Formyl-THF, bei höheren pHs am meisten zu 10-Formyl-THF. (BAGGOTT 2000; QUINLIVAN et al. 2006)

Das heißt, beim pH von 4,5, dem Optimum der Schweinenierekonjugase, ist beinahe das ganze 10-Formyl-THF zu 5,10-Methenyl-THF umgewandelt. Beim pH 7,5 wiederum, dem Optimum der Rattenplasma- und Hühnerpankreaskonjugase, ist beinahe das ganze 5,10-Methenyl-THF zu 10-Formyl-THF umgewandelt.

Die Interkonversionsrate kann aber durch die Auswahl des Extraktionspuffers verlangsamt werden. (TABOR & WYNGARDEN 1959; QUINLIVAN et al. 2006)

Bei physiologischen pHs dissoziiert 5,10-Methylen-THF zu Formaldehyd und THF.

Bei den typischen Extraktionsbedingungen bei Lebensmitteln (pH 7,85) verschwindet das ganze 5,10-Methylen-THF und es kommt zu einer Überschätzung der THF-Konzentration. (HORNE 2001; QUINLIVAN et al. 2006)

### **2.8.5 Messmethoden**

#### **2.8.5.1 Mikrobiologischer Assay**

Das Prinzip des Tests ist relativ einfach und billig: Die Wachstumsmenge an Mikroorganismen ist proportional zur Folatkonzentration in der Testsubstanz. Die mikrobielle Wachstumsmenge wird photometrisch durch die Messung der Lösungsstrübung erfasst. Bei dieser Methode ist weiters von Vorteil, dass sowohl Mono- als auch Polyglutamate erfasst werden und beinahe alle Folatisomere gemessen werden können, allerdings kann zwischen den einzelnen Isomeren nicht unterschieden werden. (ARCOT & SHRESTHA 2005) Wegen der guten Folatwiederfindung und der großen Zahl an bestehenden Studien, ist das die Hauptmethode zur Messung des Nahrungsfolates und wird in zahlreichen Labors durchgeführt: (LIM et al. 1998; RADER et al. 1998; SHRESTHA et al. 2000; RADER et al. 2000; JOHNSTON et al. 2001; JOHNSTON et al. 2002; IWATANI et al. 2003; HAN & TYLER 2003; CHEN & EITENMILLER 2007a; CHEN & EITENMILLER 2007b; DEVI et al. 2008)

Auch die Vorbereitungen vor der Messung sind relativ einfach: die Testsubstanz muss extrahiert und von der Matrix gelöst werden, außerdem sollte eine Dekonjugation der Glutamatreste erfolgen, da Monoglutamate leichter verwertet werden als Polyglutamate. Die negativen Aspekte wären, dass die Mikroorganismen auch von anderen Substanzen stimuliert oder inhibiert werden könnten, die im Lebensmittel vorkommen und so kann der Test auch unzuverlässig verlaufen. Leider ist der Test auch zeitintensiv und benötigt viel Erfahrung mit mikrobiologischem Arbeiten. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

#### **2.8.5.2 HPLC**

Die einzelnen Folatisomere werden chromatographisch aufgetrennt und die Konzentration der einzelnen Metabolite durch Vergleich mit Standards festgestellt. Aufgrund des polaren Charakters der Folatverbindungen, wird vorwiegend die reversed

phase chromatography angewendet.

Die vorherige Aufarbeitung der Testsubstanz ist in diesem Fall komplexer, da neben der Extraktion und unbedingter Dekonjugation zu Monoglutamaten auch ein daran angeschlossener Aufreinigungsschritt benötigt wird. (ARCOT & SHRESTHA 2005) Dieser ist mit verschiedenen Möglichkeiten zu erreichen, wie zum Beispiel über Ionenaustauschersäulen (DOHERTY & BEECHER 2003; PATRING & JASTREBOVA 2007), über Affinitätschromatographie mittels Folatbindendem Protein (FBP) (PFEIFFER et al. 1997; FREISLEBEN et al. 2003a; GUJSKA & KUNCEWICZ 2005) und bei Plasma und anderen biologischen Proben auch über Festphasenextraktion (SPE) (PRIETO et al. 2006; YAZYYNINA et al. 2008). FREISLEBEN et al. 2003b beschrieben eine 10-fach bessere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie als mit Festphasen-Anionen-Austauschersäulen.

Neben der Flüssigkeitschromatographie gibt es verschiedene Möglichkeiten der Detektion: UV-Detektor (PFEIFFER et al. 1997; PRIETO et al. 2006), Fluoreszenz-Detektor (DOHERTY & BEECHER 2003), UV-und Fluoreszenz-Detektion nacheinander (RUGGERI et al. 1999; NDAW et al. 2001; KONINGS et al. 2001; GUJSKA & KUNCEWICZ 2005; YAZYYNINA et al. 2008), elektrochemische Detektion (BAGLEY & SELHUB 2000), MS-Detektion bei der es auch mehrere Formen gibt z.B. Quadrupol-Massenspektrometer, Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS) und Ionenfallen-Massenspektrometer. Um bessere Quantifizierungen zu erreichen, werden oft mehrere MS-Detektionsarten aneinander gekoppelt, was dann als tandem mass spectrometry (MS/MS) bezeichnet wird. Triplequads (QqQ), Quadrupol-Quadrupol-TOF (QqTOF) und TOF-TOF sind unter Anderem gängige Analysatorkombinationen. (CAMMANN 2001) Bei der massenspektrometrischen Folatdetektion haben die meisten Massenspektrometer eine Electrospray-Ionisierungsquelle (ESI) eingebaut. Je nachdem ob die Ionisierungsart im positiven oder negativen Modus abläuft, werden die Moleküle als positive oder negative Ionen anhand der spezifischen Masse des Analytes detektiert. Man unterscheidet somit zwischen positive electrospray ionization (ESI+) (PATRING & JASTREBOVA 2007) und negative electrospray ionization (ESI-) (STOKES & WEBB 1999; PAWLOSKEY et al. 2003), die beide als Messtechniken für Folate gängig sind.

Die massenspektrometrischen Methoden haben gute Zukunftsaussichten, da die Ergebnisse viel besser mit den Mikrobiologischen Assays korrelieren als andere Detektoren, aber aufgrund der hohen Kosten solcher Anlagen sind sie vor allem in der Analytik von Nahrungsmittelfolaten noch eher selten. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

FREISLEBEN et al. 2003b machten einen Vergleich der Ergebnisse von Nahrungsfolatdetektionen mit zwei verschiedenen Detektionsmöglichkeiten nach der Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie und erkannten, dass der Fluoreszenz-Detektor bei allen durchgeführten Proben um einiges schlechtere Ergebnisse lieferte als die Detektion über tandem mass spectrometry (MS/MS).

### 2.8.5.3 Bindungs Assays

Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten einer Interaktion von Enzym und seinem Protein bzw. Antigen und Antikörper.

Einerseits finden radio-labelled protein binding assays (RPBA) (STRALSJÖ et al. 2002) und enzyme protein binding assays (EPBA) Anwendung (ARCOT et al. 2002), bei denen das Prinzip der Folatbindung an das natürliche Folatbindende Protein (FBP), das an ein Enzym gebunden bzw. radioaktiv markiert ist, ausgenutzt wird. Es findet eine Konkurrenz zwischen Folaten und Enzym bzw. radioaktiv markiertem Folat um die Bindung mit FBP statt. Gemessen wird jenes an das FBP gebundene Enzym, bzw. radioaktive Folat, das ein Substrat blau färbt bzw. über die Radioaktivitätsmessung. Die Enzymbindung ist umgekehrt proportional zur Folatkonzentration in der Testlösung. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

Andererseits finden Immunoassays Anwendung wie radioimmunoassay (RIA) und enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), wo Antikörper statt FBP herangezogen werden. Hier agieren Folate als Antigene und besetzen in Konkurrenz mit radioaktiv gebundenen Folaten bzw. Enzymen verschieden viele Antikörperbindungen. (ARCOT & SHRESTHA 2005)

## **2.8.6 Aufreinigungsmethoden**

### **2.8.6.1 Festphasenextraktion (SPE)**

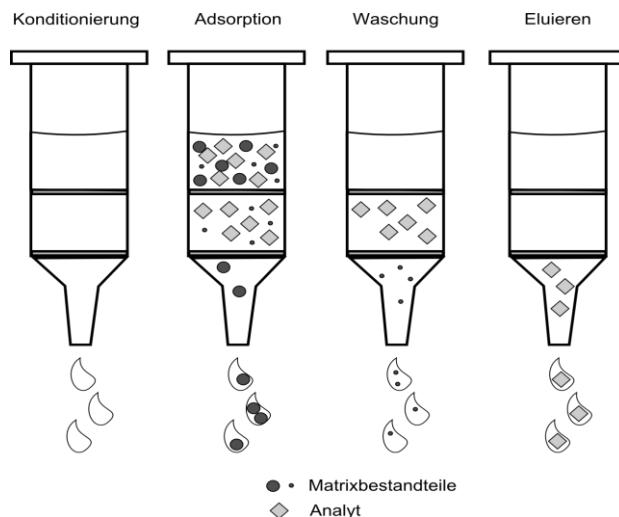
SPE (solid phase extraction) ist eine Technik für Isolierung, Aufkonzentrierung, Aufreinigung und Mediumwechsel einer Substanz. (POOLE 2003)

Das Prinzip beruht auf dem Überführen von Analyten aus einer flüssigen (oder gasförmigen) Phase in eine feste Phase, die aus porösem Silicagel mit daran gebundenen organischen Polymeren besteht. Diese Substanzen werden von der Festphase aufgehalten, während andere weniger organischen und somit weniger affinen Substanzen ungehindert durchgehen können. Es findet eine Aufreinigung von der gebundenen Substanz statt, die nun durch einen Elutionsschritt mittels eines geeigneten flüssigen Lösungsmittels verdrängt werden kann. Die meisten organischen Analyten können durch Aceton, Acetonitril oder Methanol von der SPE-Säule gelöst werden.

Normalerweise eluiert man die aufgereinigte Substanz mit einem kleineren Volumen als das ursprüngliche Probenvolumen war, um eine zusätzliche Aufkonzentrierung zu erhalten.

Die ganze Extraktion kann in 4 Schritte eingeteilt werden:

1. Konditionierung (Vorbereitung des Säulenmaterials)
2. Adsorption des Probenmaterials auf die Säule
3. Waschen
4. Eluieren



**Abbildung 5: 4 Schritte der SPE  
(modifiziert nach FRITZ 1999)**

Bei der Konditionierung wird die apolare Festphase auf die flüssige polare Probenlösung vorbereitet. Deswegen muss eine verbindende Lösung als Konditionierungsflüssigkeit eingesetzt werden um einen besseren Flächenkontakt zwischen der organischen und der wässrigen Phase zu ermöglichen. Nach der Vorbehandlung des Silicagels mit einer eher organischen Lösung, wird eine eher wässrige polare Lösung aufgetragen, um die Poren aufzufüllen.

Daraufhin kann die Auftragung des Probenmaterials stattfinden. Die flüssige Probe wird durch die gepackte Säule mit einem konstanten Druck durchgedrückt, ohne dass die Säule dabei trocken läuft.

Sobald die Probenlösung eingesickert ist, muss das ungebundene Matrixmaterial aus der Säule ausgewaschen werden. Dazu muss eine geeignete Waschflüssigkeit gefunden werden. Meistens ist es eine polare Flüssigkeit so wie Wasser mit einem kleinen Anteil an organischem Material (5-10%). Dabei muss aufgepasst werden, dass der organische Anteil nicht zu hoch ist, damit der Probenanalyt nicht mit ausgewaschen wird.

Unter Elution versteht man den letzten Schritt der Festphasenextraktion, in dem der adsorbierte Analyt von der Festphase abgewaschen wird und zurück in die flüssige Phase versetzt wird, um die analytische Messung zu ermöglichen. Die verwendete Eluatsubstanz ist meist organisch, es wird ein möglichst niedriges Volumen eingesetzt und es muss möglichst darauf geachtet werden, dass die Elutionslösung kompatibel mit der darauf folgenden Messung ist. (FRITZ 1999)

### 2.8.6.2 Affinitätschromatographie mittels FBP

Die Affinitätschromatographie-Säulen bestehen aus FBP (Folatbindendem Protein), das kovalent an eine Matrix, meistens Agarosematrix, gebunden ist. Solche Säulen müssen selber gepackt werden, was zu einer variablen Packungsdichte und zu einer unterschiedlichen Bindungskapazität führen kann. Deswegen muss die Bindungskapazität vor jedem Gebrauch ermittelt werden, um auf die Wiederfindungsrate von Analyten zurückschließen zu können. (QUINLIVAN et al. 2006) Das geschieht mit der Auftragung einer bekannten Menge an Folsäure auf die Säule und Messung ihrer Wiederfindungsrate. (PFEIFFER et al. 1997)

Auch in diesem Fall muss eine Vorbereitung der Säule auf das Probenmaterial stattfinden. Dies geschieht mit einem Puffer, um den optimalen Bindungs-pH um 7 einzustellen. Daraufhin folgt die Probenauftragung und ein Waschschrift mit dem Puffer um das nicht gebundene Matrixmaterial abzuwaschen. Das Eluieren der Folate erfolgt mittels einem sauren Puffer (pH 3), da bei diesem pH die Bindungskapazität am niedrigsten ist. (PFEIFFER et al. 1997; NELSON et al. 2004; QUINLIVAN et al. 2006)

### 2.8.6.3 Ionenaustauscher-Chromatographie

In diesem Fall müssen die Probenanalyten als Ionen aufgenommen werden und werden dazu entweder mit einer Säure oder Base behandelt, um die entsprechende Ionenform zu erlangen. In diesem Zustand werden die Analyten durch die Ionenaustauscher-Partikel zurückgehalten. Die nicht ionischen Substanzen werden durch einen Waschschrift mit einem wässrig-organischem Lösungsmittel ausgewaschen. Als letzter Schritt erfolgt die Elution mit einem geeigneten Gegenion. (FRITZ 1999)

## **2.9 Folatanalytik im Plasma, Serum und Vollblut**

„Plasma ist die flüssige Komponente des Blutes, in welchem die Blutzellen suspendiert sind. Plasma wird aus Vollblut gewonnen. Um Verklumpungen zu vermeiden wird dem Blut unmittelbar nach dem Entnehmen, ein Koagulans wie Citrat oder Heparin zugegeben. Die Blutprobe wird dann zentrifugiert um Plasma von den Blutzellen zu

trennen. Serum ist dem Plasma in der Zusammensetzung ähnlich, hier werden aber keine Koagulantien hinzugegeben. Es wird gewonnen, indem die Blutprobe vor der Zentrifugation gerinnt.“ (LUQUE-GARCIA & NEUBERT 2007)

### **2.9.1 Plasma und Serum**

Die vorherrschende Folatform im Plasma und im Serum ist 5-Methyl-THF. Es liegt hier als Monoglutamat vor und ist somit eine der geeignetsten Folatverbindungen für die Diagnose eines Folatmangels. (NELSON et al. 2003)

Als ersten Schritt gilt es das Plasma so zu verarbeiten, dass die reduzierten Folate dabei nicht zerstört werden, aber von den Plasmaproteinen für die weitergehende Analyse freigesetzt werden. Hier gibt es verschiedene Umsetzungsformen zum Beispiel Plasmafällung mittels Trichloressigsäure (NELSON et al. 2004), meta-Phosphorsäure (NELSON et al. 2004), Acetonitril (GARBIS et al. 2001), Ethanol, Perchlorsäure (SWEENEY et al. 2003) oder Aceton (KOHASHI 1986), bzw. es gibt auch Fälle, wo eine Präzipitation nicht durchgeführt wurde (NELSON et al. 2001; NELSON et al. 2003), in der Annahme, dass Plasmaproteine die Folatmessung nicht stören.

Als zweiter Schritt folgt eine Aufreinigung der zu identifizierenden Folate über die SPE (PAWLOSKY et al. 2001; CHATZIMICHALAKIS et al. 2004; PFEIFFER et al. 2004), Affinitätschromatographie (HART et al. 2002; KOK et al. 2004; NELSON et al. 2004) oder auch nur durch Filtration (GARBIS et al. 2001) als Vorbereitung für die nachfolgende spezifische Messung der Folatmetaboliten.

### **2.9.2 Vollblut**

Um Vollblut für eine Folatanalytik vorzubereiten, muss eine vollständige Hämolyse der Blutzellen erfolgen und nachfolgend muss eine Dekonjugation der hauptsächlich vorkommenden 5-Methyl-THF-Polyglutamate zu Monoglutamaten mittels der plasmatischen Konjugase stattfinden. (PFEIFFER & GREGORY 1996; FAZILI et al. 2005)

Die Hämolyse wird durch Aufquellen der Erythrocyten mittels wässriger

Ascorbinsäurelösung erreicht. Die Ascorbinsäure hat sowohl die Funktion der pH-Einstellung für die nachfolgende Konjugaseeinwirkung, als auch einen antioxidativen Schutz der reduzierten Folatverbindungen. (WRIGHT et al. 1998)

Die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Vollständigkeit der Folatdetektion sind Inkubationszeit, Temperatur und pH (FAZILI et al. 2005), Vollständigkeit der Hämolyse (WRIGHT et al. 2000) und Behinderung der Freisetzung der Folate durch das Hämoglobinmolekül, das in seiner reduzierten Form eine elektrostatische Bindung mit dem Folylpolylglutamt eingeht.(WRIGHT et al. 1998)

Aufgrund diesen Schwierigkeiten, die nur schwer zu umgehen sind, wird die Folatanalytik aus dem Vollblut immer weniger durchgeführt, obwohl die Folatkonzentration aus dem Vollblut ein besserer Indikator wäre als aus Plasma oder Serum. (PAWLOSKY et al. 2001)

Nach der Hämolyse und der Inkubation der Konjugase muss eine Extraktion der Folate erfolgen. Dies geschieht durch eine Erhitzung im siedendem Wasserbad und der nachfolgenden Abzentrifugierung der Festbestandteile. (PFEIFFER & GREGORY 1996) Der Überstand wird dann über SPE (FAZILI et al. 2005; DUEKER et al.2000; LIN et al. 2002) oder Affinitätschromatographie (PFEIFFER & GREGORY 1996) aufgereinigt.

### **2.9.3 Messmethoden**

Obwohl noch vor 1996 die Radiobinding Assays und Mikrobiologische Assays bei der Analyse von Folatkonzentrationen im Blut, Plasma und Serum am Geläufigsten waren (GROSSOWICZ et al. 1962; WAXMAN & SCHREIBER 1973; O'BROIN & KELLEHER 1992; GUNTER et al. 1996; STEIJNS et al. 1996), werden sie heutzutage fast nur mehr als Vergleichsmethoden zu den chromatographischen Methoden durchgeführt. (WIEGERTZ & JÄGERSTAD 1995; PFEIFFER et al. 2004; FAZILI et al. 2005) Bei den chromatographischen Methoden finden sowohl HPLC als auch GC (Gaschromatographie) (SANTHOSH-KUMAR et al. 1989; DUEKER et al. 2000; LIN et al. 2002) Anwendung, wobei der Aufwand, der bei der GC für die Derivatisierung der zu messenden Metaboliten entsteht, auch einen gewissen Fehlerquotienten mit sich

bringt. (PFEIFFER et al. 2004)

Die Folatdetektionen finden je nach Sensitivität, Probenmatrix, Probenvolumen, Folatformen und Kostenfaktoren mit unterschiedlichen Detektoren statt.: UV-Detektor (PFEIFFER & GREGORY 1996; CHATZIMICHALAKIS et al. 2004), Single-quadrupole Massenspektrometer (DUEKER et al. 2000; NELSON et al. 2001; HART et al. 2002; LIN et al. 2002; NELSON et al. 2003;), Ionenfallen-Massenspektrometer (PAWLOSKEY et al. 2001) und tandem mass spectrometry, vorwiegend in Form von Triplequads (QqQ) (GARBIS et al. 2001; NELSON et al. 2004; KOK et al. 2004; FAZILI et al. 2005; NELSON et al. 2005), sind die geläufigsten Verfahren, die sowohl als positive als auch als negative Electrospray Ionisierungen durchgeführt werden.

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien fanden bei der Umsetzung dieser Arbeit Anwendung:

Humanplasma: alle Plasmaproben wurden von Blutspenden von freiwilligen Probanden aus Studentenübungen abgedeckt. Das Blut wurde nach Entnahme mit Antikoagulantien EDTA oder Heparin versetzt, das Plasma durch Zentrifugieren in einer 0,9%iger NaCl-Lösung vom Vollblut getrennt. Das so erhaltene Plasma wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren.

Chemikalien:

- Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),  $>99\%$ , p.a., ACS für Puffererzeugung von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G 250/ Coomassie<sup>®</sup> Brillantblau G 250 für Bradford-Test von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Ethanol vergällt  $\geq 99,8\%$  mit ca. 1% MEK von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol 70% vergällt,  $\geq 70\%$  mit ca. 1% MEK für Proteinfällung von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- o-Phosphorsäure, ROTIPURAN<sup>®</sup>,  $\geq 85\%$ , p.a., ACS, ISO von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Wasser demineralisiert  $18\text{m}\Omega\text{ cm}^{-1}$  aufbereitet über einen SG-2800 Wasservollentsalzer von SG Wasseraufbereitung & Regenerierstation GmbH (Hamburg, Deutschland)
- Albumin Fraktion V,  $\geq 98\%$ , pulv., bovine für Proteinstandard-Herstellung von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ),  $>99,5\%$ , p.a., ACS, ISO von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Protease, Type XIV: Bacterial, From Streptomyces griseus 5,8 units/mg solid

- von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Heizblock/block heater SBH200D Stuart von Barlworld Scientific Limited Stone (Staffordshire, UK)
  - L(+)-Ascorbinsäure Natriumsalz (Na-Ascorbat),  $\geq 99\%$ , USP, f. d. Biochemie von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - 2-Mercaptoethanol von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - Acetonitril (ACN) Chromasolv<sup>®</sup> for HPLC, gradient grade von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - Water, Chromasolv<sup>®</sup> Plus, for HPLC von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ), Ph.Eur., BP, wasserfrei für Puffererzeugung von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - Trichloressigsäure (TCA),  $\geq 99\%$ , reinst, Ph.Eur. Für Proteinfällung von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - meta-Phosphorsäure, p.a., Stücke (glasig) für Proteinfällung von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - L(+)-Ascorbinsäure, Ph. Eur., USP, BP, E 300 von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - Natriumhydroxid (NaOH)  $\geq 99\%$ , p.a., ISO von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - Casein from bovine milk, Technical Grade von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - Salzsäure (HCl), 25%, reinst von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
  - Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2N für Lowry-Protein-Test von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - Sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ ), ReagentPlus<sup>™</sup>,  $\geq 99,0\%$  von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - Pancreatin, From Porcine Pancreas Activity equivalent to 4x U.S.P. Specifications von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
  - Sodium acetate trihydrate, ReagentPlus<sup>™</sup>,  $\geq 99,0\%$  von Sigma-Aldrich

Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

- Calcium acetate hydrate, ReagentPlus™,  $\geq 99\%$  von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- L-Tyrosine, Reagent Grade,  $\geq 98\%$  von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

### Folat-Standardsubstanzen:

- (6S)-5-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, Natriumsalz (5-MTHF) Sodium-L-Mefolate von Merck-Eprova AG
- Methotrexate,  $\geq 99,0\%$  (HPLC, sum of enantiomers) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

### verwendete Geräte:

- Photometer Cary 50 scan UV-visible Spectrophotometer
- pH-Meter Seven Easy™ pH Meter S20 mit Inlab Routine pro Glaselektrode von Mettler Toledo GmbH (Schwerzenbach, Schweiz)
- Vortex IKA® MS 1 Minishaker von IKA® - Werke
- Pipetten Eppendorf Reference® variabel (10µl; 100µl und 1000µl) von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Heizblock block heater SBH200D Stuart von Barlworld Scientific Limited Stone (Staffordshire, UK)
- Waage 1 Satorius ISO 9001 Modell KB BA 100 von Satorius AG (Göttingen, Deutschland)
- Waage 2 Mettler AT 201 von Mettler Toledo GesmbH (Wien, Österreich)
- Zentrifuge
- HPLC UltiMate 3000 Series Chromatograph (Dionex Austria GmbH, Wien, Österreich) mit analytischem 2-Kanal Vakuumdegaser Solvent Racks (SRD-3200), Hochdruckgradientenpumpe (HPG-3200M), Autosampler mit Temperaturregelung, eingestellt auf 8°C (WPS-3000 TSL, Micro), Säulenthermostat eingestellt auf 25°C (TCC-3000), variabler Wellenlängendetektor wurde nicht

zur Detektion verwendet(VWD-3400)

Wasser und ACN, jeweils mit 0,1% Ameisensäure versetzt als Laufmittel verwendet, Flow 0,3ml/min (linearer Anstieg von ACN von 5% auf 30%; nach 9,1 Minuten wieder Abfall auf 5%)

- HPLC-Säule1 Atlantis T3 3 x 150mm, 5µm (Vorsäule Atlantis T3 3,9 x 20mm Guard Cartridge 5µm))
- HPLC-Säule2 Atlantis T3 2.1 x 150mm x 3µm (Vorsäule Atlantis T3 2.1 x 10mm Guard Cartridge 3µm)
- Massenspektrometer micrOTOFq mit Elektrosprayionisationsquelle (ESI) (Bruker Daltonics<sup>®</sup> GmbH, Deutschland) zur Detektion des Probenmaterials, vor der Messung intern und extern mit Lithium-Formiat kalibriert
- Software für MS- bzw. HPLC-Kontrolle und Auswertungsprogramm:  
für MS: micrOTOF control 2.1 User Manual von Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland)  
für HPLC: Hystar Version 3.2 User Manual von Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland)  
LC/MS-Auswertung: Data Analysis<sup>TM</sup> 3.4 User Manual von Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland)

### Verbrauchsmaterialien:

- Filterpapiere MN 615 ¼ , Durchmesser 150mm von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
- Einmal-Küvetten, 1,5 ml halbmikro, PMMA, 12,5 x 12,5 x 45mm von Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
- Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter steril 0,22µm, PES von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Sep-Pak<sup>®</sup> Vac 3cc (500mg) C18 Cartridges, von Waters Corporation (Milford, USA)
- Sep-Pak Reservoir Adapter von Waters Corporation (Milford, USA)
- dunkel gefärbte HPLC-Vials (1,5ml vial) von Agilent Technologies (Deutschland)

- Snap cap 11mm polypropylene von Agilent Technologies (Deutschland)
- Rotilabo<sup>®</sup>-Einsätze 100µl für Probenfläschchen 1,5ml von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

### **3.2 Stufe 1: Etablierung einer optimalen Proteinbestimmungsmethode nach Bradford**

In Anlehnung an die Studie von Lim et al. 1998 sollte die Proteasewirksamkeit beim Plasma, das möglicherweise ähnliche Bedingungen wie Milchproben benötigt, auf ihre Proteinspaltungswirksamkeit getestet werden. Die Methode nach Bradford schien die Beste Möglichkeit dafür zu sein.

Als erstes sollten dieselben Bedingungen wie in der Studie von Lim et al. 1998 erzielt werden. Sie verwendeten einen sauren 0,1M Kaliumphosphatpuffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 4,1, der auch hier eingesetzt wurde.

Als zweiten Schritt galt es, die für den Bradfordtest benötigte Coomassieblaulösung, herzustellen. Hierzu wurden 25mg Coomassieblau, 12,5 ml 96%iges Ethanol und 25 ml Phosphorsäure mit destilliertem Wasser in einem 250ml Kolben aufgefüllt. Daraufhin wurde die Lösung in eine dunkle Flasche filtriert und bis zum Gebrauch kühl gelagert. Vor jedem Gebrauch wurde diese Lösung erneut durch einen Faltenfilter filtriert und auf Raumtemperatur gebracht.

Für die Bestimmung einer unbekanntem Proteinkonzentration wurde eine Standardgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen benötigt. Die erwünschten Konzentrationen von 1mg/ml; 0,5mg/ml; 0,1mg/ml und 0,05mg/ml wurden mittels bovinem Albumin hergestellt, das mit 0,9%iger NaCl- Lösung entsprechend verdünnt wurde.

Die photometrische Messung erfolgte bei 595nm Wellenlänge, nachdem 1ml Coomassieblau-Lösung mit 100µl der zu messenden Proteinlösung versetzt wurde und die Mischung 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert wurde.

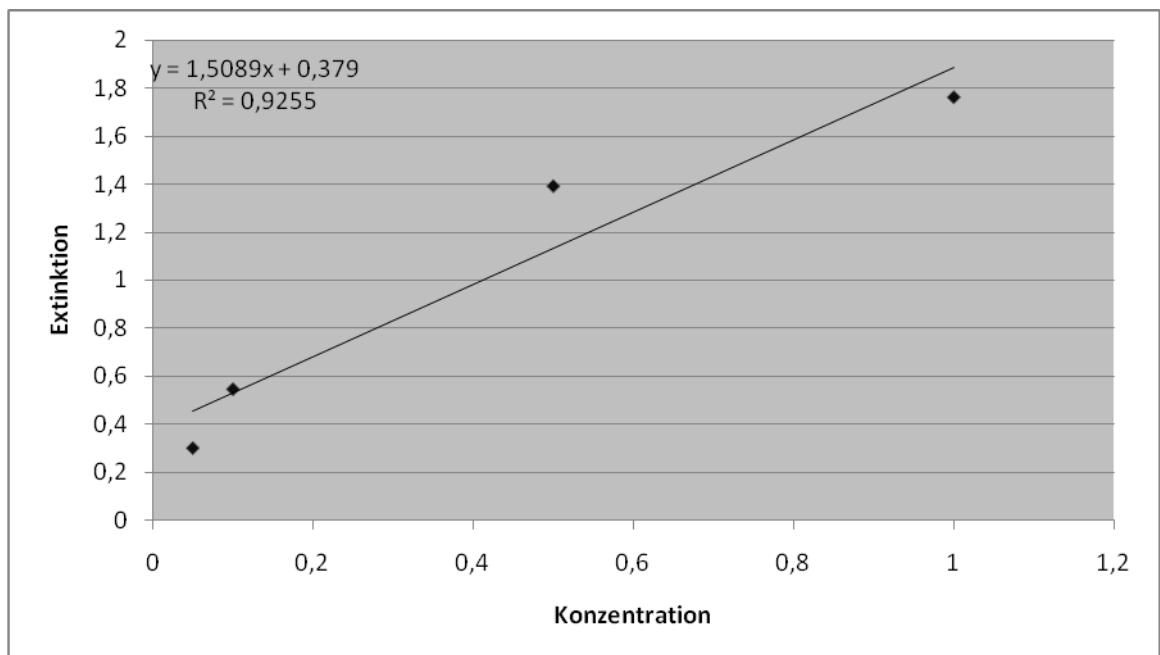
Die bekannten Albuminkonzentrationen wurden in einer Excel-Datei in einer Gerade gegen die gemessenen Extinktionen aufgetragen, mit der eine Geradengleichung ( $y=kx+d$ ) errechnet wurde. Der unbekannte Faktor  $x$  in der Gleichung stand für eine unbekannte Proteinkonzentration, die es zu errechnen galt, während alle anderen Variablen durch die Extinktion ( $y$ ), Steigung der Gerade ( $k$ ) und Achsenabschnitt der Gerade ( $d$ ) bekannt waren.

**Tabelle 3: Errechnung der Albuminkonzentration  $x$  anhand der Standardgerade**

Konzentration Albumin (mg/ml)	Absorption bei 595nm (y)	berechnete Albumin-Konzentration $x$ (mg/ml)
1	1,7639	0,92
0,5	1,3934	0,67
0,1	0,547	0,11
0,05	0,3014	-0,05

Steigung ( $k$ )                    1,5089  
 Achsenabschnitt ( $d$ )        0,379

$y = kx + d$   
 $x = (y - d) / k$



**Abbildung 6: Standardgerade zur Demonstration der Protein-Konzentrationsberechnung**

Durch den unbekanntem Faktor  $x$  in der Geradengleichung konnte durch das Einsetzen aller bekannten Faktoren sowohl die tatsächliche Konzentration einer bereits bekannten Albuminverdünnung aufgrund der Absorption bei 595nm errechnet werden (siehe oben), genauso gut konnte auch eine gänzlich unbekannte Konzentration ermittelt werden, was bei den folgenden Versuchen angewendet wurde.

### **3.2.1 Ermittlung der Proteinkonzentration nach verschiedenen Proteaseeinwirkzeiten**

Nach dem Prinzip des Berechnens einer unbekanntem Konzentration aus der Geradengleichung sollte die Proteinkonzentration von Plasma vor und nach der Proteaseeinwirkung von 1h und 4h nach LIM et al. 1998 errechnet werden.

Für diesen Versuch wurde Plasma 1:2 mit dem am Anfang beschriebenen 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer verdünnt. Eine 10mg/ml Proteaselösung wurde mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Lösung wurde durch einen 0,2 $\mu\text{l}$  Steril-Filter filtriert. Vier mal 0,2ml Plasma-Puffer-Gemisch wurden in vier verschiedene 1,5ml Eppendorf cups mit jeweils 0,2ml Protease versetzt. Jeweils zwei Eppendorf cups wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die anderen zwei Eppendorf cups 4 Stunden. Nach der erfolgten Inkubation, wurde jeweils eine Probe von den zwei Inkubationszeiten bei 12 000U/min für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und 1:2 mit Puffer verdünnt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die anderen zwei Proben blieben unbehandelt.

**Tabelle 4: Pipettierschema im Versuch 3.2.1**

	Inkubation 1h	Inkubation 4h
Ohne Zentrifugieren	0,2ml Plasma/Puffer (1:2) 0,2ml Protease (10mg/ml)	0,2ml Plasma/Puffer (1:2) 0,2ml Protease (10mg/ml)
Mit Zentrifugieren	0,2ml Plasma/Puffer (1:2) 0,2ml Protease (10mg/ml) Überstand entnehmen → 1:2 mit Puffer verdünnen	0,2ml Plasma/Puffer (1:2) 0,2ml Protease (10mg/ml) Überstand entnehmen → 1:2 mit Puffer verdünnen

Schlussendlich erfolgte der Bradfordtest aller 4 Proben. Zusätzlich wurden auch die Proteinkonzentrationen von 1:10 und 1:100 mit Puffer verdünnten Plasmaproben ohne Proteasebehandlung ermittelt.

1ml Coomassieblau-Lösung wurde mit 100µl Probelösung versetzt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte die Ermittlung der Absorption von jeder Lösung mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm.

Die Ermittlung der unbekanntenen Konzentrationen vor und nach der Proteasebehandlung wurde über die zuvor errechnete Geradengleichung erreicht.

### **3.2.2 Feststellen des Eigenproteingehaltes der Protease**

Da die Ergebnisse des vorherig beschriebenen Versuches trotz der Proteasebehandlung mit zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten und sogar bei denen ohne jegliche Behandlung keine signifikanten Unterschiede zeigten (siehe Kapitel 4.1), wurde ein Versuch zum Hinterfragen der endogenen Proteinkonzentration der Protease eingeleitet.

Dazu wurden drei verschiedene Proteasekonzentrationen mit entionisiertem Wasser und nachfolgender Filtration durch einen Sterilfilter hergestellt: 10mg/ml, 5mg/ml, 1mg/ml. Als Substrat für die Protease, diente bei diesem Versuch das Albumin, das auch als Standardsubstanz für den Bradfordtest verwendet wurde. Dieses wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (1mg/ml und 0,05mg/ml) durch die Verdünnung mit

einer 0,9%igen NaCl-Lösung vorbereitet.

Das Prinzip dieses Versuches beruhte auf der Inkubation jeder Proteasekonzentration mit jeder Albuminkonzentration für 1h bei 37°C, und einer nachfolgenden Proteinmessung mittels Bradfordtest.

Für die Inkubation wurde jede Albuminkonzentration 1:2 mit dem am Anfang hergestellten 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer verdünnt. 0,2ml des Albumin-Puffer-Gemisches wurde dann jeweils mit 0,2ml Protease der jeweiligen Konzentration versetzt und inkubiert.

**Tabelle 5: Ansätze der Protease- und Albuminkonzentrationen im Versuch 3.2.2**

Protease	10mg/ml		5mg/ml		1mg/ml	
Albumin	1mg/ml	0,05mg/ml	1mg/ml	0,05mg/ml	1mg/ml	0,05mg/ml

Zusätzlich wurden auch die Eigenabsorption der 10mg/ml Proteasekonzentration mittels Bradfordtest und die Absorption der nach der Inkubation von 10mg/ml Protease mit den beiden Albuminkonzentrationen (1mg/ml und 0,05mg/ml) mit nachfolgender 5-minütiger Proteindenaturierung mittels Kochen im 100°C Wasserbad bei 595nm gemessen.

Die Ergebnisse (siehe Kapitel 4.2), zeigen, dass die Protease zu einer beträchtlichen Proteinerhöhung in der Probe führt, die nicht vernachlässigt werden darf.

### **3.2.3 Bradfordtestdurchführung nach der SPE und nachfolgende**

#### **Messung des Spikes mittels HPLC/MS**

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt um die Proteinkonzentrationen nach der Inkubation von Albumin mit Protease nach 1h und 4h und nachfolgender Aufreinigung mittels Festphasenextraktion zu bestimmen und festzustellen ob der relativ hohe Proteingehalt direkt nach der Inkubation durch die SPE beseitigt wird.

Es wurden zwei verschiedene Albuminkonzentrationen, nämlich 1mg/ml und 2mg/ml mittels 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Diese zwei Albuminkonzentrationen wurden parallel mit jeweils drei verschiedenen Proteasekonzentrationen (0,05mg/ml, 1mg/ml und 2mg/ml) inkubiert. Die Proteaselösungen wurden wie bei den Versuchen zuvor mit entionisiertem Wasser und nachfolgendem Sterilfiltrieren hergestellt.

Auch hier wurden alle Albumin- und Proteasekonzentrationen miteinander kombiniert, allerdings gab es einen Unterschied zu den vorherigen Versuchen: die Kombinationen erfolgten in verschiedenen Volumina.

Die beiden Albuminlösungen wurden so wie bei den vorigen Versuchen 1:2 mit 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer vermischt. Von jeder Albuminkonzentration wurde ein solches Plasma-Puffer-Gemisch hergestellt, das dann entweder in 200µl oder 600µl Volumina mit genausoviel Protease versetzt wurde. Es wurde darauf geachtet, dass jede Albuminkonzentration mit jeder Proteasekonzentration in jedem Volumen bei sowohl 1h als auch 4 h inkubiert wurde. Zu jeder Kombination kamen 1% (w/v) Na-Ascorbat, 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol als Antioxidantien und 40µl 5-MTHF-Spike (Herstellung siehe Kapitel 3.3) dazu. Es wurden 24 verschiedene Kombinationen gefertigt.

**Tabelle 6: Pipettierschema aller 24 Ansätze im Versuch 3.2.3**

<p><b>Kombination 1</b>                      200µl Albumin/Puffer (1mg/ml)                      200µl Protease (0,05mg/ml)                      40µl 5-MTHF-Spike + AO                      1h inkubieren</p>	<p><b>Kombination 2</b>                      200µl Albumin/Puffer (1mg/ml)                      200µl Protease (1mg/ml)                      40µl 5-MTHF-Spike + AO                      1h inkubieren</p>	<p><b>Kombination 3</b>                      200µl Albumin/Puffer (1mg/ml)                      200µl Protease (2mg/ml)                      40µl 5-MTHF-Spike + AO                      1h inkubieren</p>
<p><b>Kombination 4</b>                      200µl Albumin/Puffer (2mg/ml)                      200µl Protease (0,05mg/ml)                      40µl 5-MTHF-Spike + AO                      1h inkubieren</p>	<p><b>Kombination 5</b>                      200µl Albumin/Puffer (2mg/ml)                      200µl Protease (1mg/ml)                      40µl 5-MTHF-Spike + AO                      1h inkubieren</p>	<p><b>Kombination 6</b>                      200µl Albumin/Puffer (2mg/ml)                      200µl Protease (2mg/ml)                      40µl 5-MTHF-Spike + AO                      1h inkubieren</p>

## MATERIALIEN UND METHODEN

<b>Kombination 7</b> 600µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 600µl Protease (0,05mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 1h inkubieren	<b>Kombination 8</b> 600µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 600µl Protease (1mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 1h inkubieren	<b>Kombination 9</b> 600µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 600µl Protease (2mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 1h inkubieren
<b>Kombination 10</b> 600µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 600µl Protease (0,05mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 1h inkubieren	<b>Kombination 11</b> 600µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 600µl Protease (1mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 1h inkubieren	<b>Kombination 12</b> 600µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 600µl Protease (2mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 1h inkubieren
<b>Kombination 13</b> 200µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 200µl Protease (0,05mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 14</b> 200µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 200µl Protease (1mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 15</b> 200µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 200µl Protease (2mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren
<b>Kombination 16</b> 200µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 200µl Protease (0,05mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 17</b> 200µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 200µl Protease (1mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 18</b> 200µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 200µl Protease (2mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren
<b>Kombination 19</b> 600µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 600µl Protease (0,05mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 20</b> 600µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 600µl Protease (1mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 21</b> 600µl Albumin/Puffer (1mg/ml) 600µl Protease (2mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren
<b>Kombination 22</b> 600µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 600µl Protease (0,05mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 23</b> 600µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 600µl Protease (1mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren	<b>Kombination 24</b> 600µl Albumin/Puffer (2mg/ml) 600µl Protease (2mg/ml) 40µl 5-MTHF-Spike + AO 4h inkubieren

Nach der jeweiligen Inkubation bei 37°C, wie in der Tabelle beschrieben, erfolgte die erste Bradfordmessung. Es wurde von jeder Probe 100µl entnommen und mit 1ml Coomassieblau-Lösung gemischt. Nach der Inkubationszeit von 15 Minuten erfolgte die photometrische Messung bei 595nm Wellenlänge.

Die restliche Probenmenge wurde für die Festphasenextraktion bereitgestellt.

Die SPE erfolgte indem die Kartuschen in einer Eprovette aufgestellt wurden und somit senkrecht mit der Spritze nach unten schauend gerichtet waren. Bei der SPE wurde stets HPLC-Wasser verwendet.

Der erste Schritt war die Konditionierung des Gels mittels 90:10 Acetonitril:Wasser (v/v), darauffolgend wurde die Säule mittels 10:90 Acetonitril:Wasser (v/v) equilibriert. Das Volumen war jeweils das Doppelte des Probenvolumens. Beim großen Volumen, das den Kombinationen 7-12 und 19-24 entspricht, wurde mit 2,2ml konditioniert und equilibriert, beim kleinen Volumen, das den Kombinationen 1-6 und 13-18 entspricht, wurde mit 600µl konditioniert und equilibriert.

Danach wurde die Probe aufgetragen und sanft durch die SPE-Säule gedrückt. Nachdem die Probenflüssigkeit eingesickert war, folgte der Waschschrift mittels HPLC-Wasser, der demselben Volumen entsprach wie der Konditionierungs- bzw. Equilibrierungsschritt der jeweiligen Probe. Schlussendlich wurde mit 75:25 Acetonitril:H<sub>2</sub>O eluiert. Das Elutionsvolumen entsprach dem Probenvolumen: im Fall des kleinen Volumens waren es 300µl, im Fall des großen Volumens 1,1ml.

**Tabelle 7: Ablauf der SPE im Versuch 3.2.3**

	ACN	H <sub>2</sub> O	großes Volumen	kleines Volumen
Konditionierung	90%	10%	2,2ml	600µl
Equilibrierung	10%	90%	2,2ml	600µl
Probenlösung	-	-	1,14ml	340µl
Waschen	-	100%	2,2ml	600µl
Elution	75%	25%	1,14ml	340µl

Nach der so gestalteten SPE erfolgte eine zweite Bradfordmessung des nach der SPE möglicherweise bestehenden Proteingehaltes. Auch hier wurden 100µl der Probe mit 1ml Coomassieblau gemischt und 15 Minuten inkubiert. Die gemessenen Extinktionen bei 595nm wurden in die Geradengleichung der zuvor gefertigten Eichgerade eingesetzt und die unbekanntene Proteinkonzentrationen ermittelt. Schlussendlich wurde der

restliche Probenansatz zum Vergleich der resultierenden 5-MTHF-Areas bei den einzelnen Proben mittels LC/MS gemessen.

### **3.3 Stufe 2: Ermittlung der optimalen pH-Einstellung mittels der HPLC/MS-Messung**

Nachdem bewiesen wurde, dass die Proteasekonzentration von 10mg/ml für die Abspaltung von 1mg/ml und 2mg/ml Albumin überschüssig war, sollte eine kleinere Proteasekonzentration eingesetzt werden.

Die optimale pH-Einstellung für die Wirksamkeit der Protease sollte anhand der HPLC/MS-Messwerte für den eingesetzten 5-MTHF-Spike gefunden werden. Nach einer hypothetischen Annahme wäre der pH dann optimal, wenn am meisten 5-MTHF in der Probe gemessen worden wäre, da in dem Fall zusätzliches Plasmafolat mitgemessen worden wäre, bzw. eine geringere 5-MTHF-Zerstörung durch den pH vorliegen würde.

Da noch keine Optimierung der SPE stattgefunden hat, wurde diese bei jedem Ansatz abhängig vom Probenvolumen gestaltet.

#### **Herstellung des 5-MTHF-Spikes**

Es wurden 1,24mg Na<sub>2</sub> 5-MTHF in einen 100ml Kolben eingewogen und bis zur Marke mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Hinzu kamen 1% (w/v) Na-Ascorbat und 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol als Antioxidantien.

Es resultierte eine 5-MTHF-Lösung mit einer Konzentration von 24,5µmol/100ml bzw. 250µmol/l.

Die Lösung wurde mit Argon begast und in 1,5ml Eppendorf cups aliquotiert, die bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren wurden.

**3.3.1 Enzymatische Inkubation von Albumin und Plasma mit und ohne saurem Phosphat-Puffer und nachfolgende Messung mittels HPLC/MS**

1000µl Albumin (2mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung) wurden 1:2 mit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer verdünnt und mit 120µl 5-MTHF-Spike versetzt. Genauso wurden 1000µl Albumin (2mg/ml) ohne Pufferzusatz mit Spike vermischt. Zu beiden Probenansätzen kamen 2000µl Protease (2mg/ml in wässriger Lösung und nachfolgend sterilfiltriert) und danach wurden diese bei 37°C 1 Stunde inkubiert.

Nachfolgend wurde die SPE durchgeführt, die für jeden Probenansatz unterschiedlich war (abhängig vom Probenvolumen), siehe Tabelle.

Es wurden auch 2 Probenansätze mit Plasma durchgeführt. Die Ansätze wurden auf die gleiche Weise hergestellt und unterschieden sich nur in ihrer Inkubationszeit: 500µl Plasma wurden 1:2 mit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer versetzt. Dieser Lösung wurden 50µl 5-MTHF-Spike zugegeben. Daraufhin kamen 1000µl Protease (2mg/ml in wässriger Lösung, sterilfiltriert) hinzu. Ein Ansatz wurde 1 Stunde inkubiert, der andere 4 Stunden. Auch hier erfolgte die SPE nach der Inkubation bei 37°C, siehe Tabelle 8. Die Eluatfraktionen wurden in dunklen HPLC-Vials mit 1% (v/v) vorgelegtem 2-Mercaptoethanol als Antioxidans gesammelt und bis zur Messung mittels LC/MS eingefroren.

**Tabelle 8: Durchführung der SPE im Versuch 3.3.1**

<b><u>SPE von Albumin mit Puffer</u></b>	<b><u>SPE von Albumin ohne Puffer</u></b>	<b><u>SPE von Plasma mit Puffer, 1h und 4h ink.</u></b>
<b>Konditionieren:</b> 5000µl 90:10 ACN:H <sub>2</sub> O	<b>Konditionieren:</b> 5000µl 90:10 ACN:H <sub>2</sub> O	<b>Konditionieren:</b> 4000µl 90:10 ACN:H <sub>2</sub> O
<b>Equilibrieren:</b> 5000µl 10:90 ACN:H <sub>2</sub> O	<b>Equilibrieren:</b> 5000µl 10:90 ACN:H <sub>2</sub> O	<b>Equilibrieren:</b> 4000µl 10:90 ACN:H <sub>2</sub> O
<b>Probenauftragung:</b> 4120µl Probe	<b>Probenauftragung:</b> 3120µl Probe	<b>Probenauftragung:</b> 2050µl Probe
<b>Waschen:</b> 8240µl H <sub>2</sub> O	<b>Waschen:</b> 6240µl H <sub>2</sub> O	<b>Waschen:</b> 4500µl H <sub>2</sub> O
<b>Eluieren:</b> 1000µl 75.25 ACN:H <sub>2</sub> O (3 Fraktionen)	<b>Eluieren:</b> 780µl 75.25 ACN:H <sub>2</sub> O (3 Fraktionen)	<b>Eluieren:</b> 500µl 75.25 ACN:H <sub>2</sub> O (4 Fraktionen)
LC/MS	LC/MS	LC/MS

### **3.3.2 Inkubation von Plasma mit Protease bei verschiedenen Phosphatpuffern und nachfolgende Messung des 5-MTHF-Spikes mittels HPLC/MS**

Um die Kompatibilität und möglicherweise eine bessere Eignung des sauren, basischen und des Misch-Phosphatpuffers mit der Protease auszutesten, wurden 3 Ansätze mit jeweils einem anderen Puffer und Plasma als Probenmatrix hergestellt.

Es wurden ein 20mM saurer Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 4,83; 20mM basischer Phosphatpuffer ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH 9,02; und ein 50:50 Mischpuffer aus den beiden vorher genannten Puffern, pH 6,94, bereitet.

Die drei Ansätze wurden hergestellt, indem jeweils 500 $\mu\text{l}$  Plasma 1:2 mit dem jeweiligen Puffer gemischt wurden, hinzu kamen 50 $\mu\text{l}$  5-MTHF-Spike und die Antioxidantien (1% w/v Na-Ascorbat und 0,1% v/v 2-Mercaptoethanol). Am Schluss wurden 1000 $\mu\text{l}$  Protease (1mg/ml in wässriger Lösung, sterilfiltriert) hinzugegeben. Der pH dieser 3 Probelösungen wurde mit pH-Meter gemessen und die Lösungen nachfolgend mit Argon begast. Danach folgte die einstündige Inkubation bei 37°C.

**Tabelle 9: Pipettierschema und pH-Messungen im Versuch 3.3.2**

<b>Versuch 1: <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>-Puffer</b>	<b>Versuch 2: <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math>-Puffer</b>	<b>Versuch 3: <math>\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4</math>-Puffer</b>
500 $\mu\text{l}$ Plasma	500 $\mu\text{l}$ Plasma	500 $\mu\text{l}$ Plasma
500 $\mu\text{l}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer	500 $\mu\text{l}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer	500 $\mu\text{l}$ Misch-Puffer
50 $\mu\text{l}$ 5-MTHF-Spike	50 $\mu\text{l}$ 5-MTHF-Spike	50 $\mu\text{l}$ 5-MTHF-Spike
1000 $\mu\text{l}$ Protease	1000 $\mu\text{l}$ Protease	1000 $\mu\text{l}$ Protease
<u>pH gemessen: 6,90</u>	<u>pH gemessen: 7,30</u>	<u>pH gemessen: 7,65</u>

Die SPE war diesmal aufgrund der identischen Volumina bei jedem Ansatz gleich: 4000 $\mu\text{l}$  90:10 ACN:H<sub>2</sub>O wurden für die Konditionierung des Säulenmaterials verwendet und dasselbe Volumen von 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O wurde für die Equilibrierung eingesetzt. Danach folgte die Auftragung von jeweils 2050 $\mu\text{l}$  Gesamtprobe auf die Kartusche. Der Waschschritt erfolgte mit 4500 $\mu\text{l}$  HPLC-Wasser und die Eluierung des Analyten mit 500 $\mu\text{l}$  75:25 ACN:H<sub>2</sub>O in 3 Fraktionen. Das Eluat wurde in dunkle HPLC-Vials mit

vorgelegtem 2-Mercaptoethanol (1% v/v) eingefangen und anschließend mit Argon begast. Die Proben wurden bis zur HPLC-Messung bei -20°C eingefroren.

### **3.4 Stufe 3: Einsatz geläufiger Fällungsmethoden**

#### **3.4.1 Plasmafällung mit Acetonitril, Trichloressigsäure und Ethanol**

Um zu vergleichen, welche geläufige Fällungsmethode sich am Meisten für die Fällung von Plasmaprotein eignet, wurden je 500µl Plasma jeweils mit 500µl ACN (eisgekühlt), 500µl TCA (10%, eisgekühlt) und 500µl Ethanol (70%, eisgekühlt) versetzt, geschüttelt, gevortext und für 10 Minuten bei 10500rpm, 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die SPE durchgeführt. Für das Konditionieren und Equilibrieren wurden jeweils 2000µl 90:10 ACN:H<sub>2</sub>O bzw. 10:90 ACN: H<sub>2</sub>O eingesetzt. Nach der Probenauftragung erfolgte das Waschen mit HPLC-Wasser (2000µl) und das Eluieren am Ende erfolgte mittels 75:25 ACN: H<sub>2</sub>O mit 500µl in 3 Fraktionen. Danach wurde die HPLC-MS aus Interesse am Total-Ionen-Chromatogramm durchgeführt.

#### **3.4.2 Untersuchung der Plasmafällung mit Acetonitril anhand der Wiederfindungsrate des 5-MTHF-Spikes**

Es wurden zwei Vergleichsansätze zur Ermittlung der Wiederfindungsrate des 5-MTHF-Spikes angesetzt, um die Auswirkung der Plasmafällung mit Acetonitril auf Folatverluste abzuschätzen. Einerseits wurde der 5-MTHF-Spike direkt vor der Fällung hinzugegeben, andererseits nach der Fällung, nach Entnahme des Überstandes.

Es wurden 6 Ansätze bereitet. Bei allen war die anfängliche Lösungszubereitung gleich. Es wurden in allen 6 Fällen 500µl Plasma mit 15mg Na-Ascorbat (1% w/v) und 1,5ml 2-Mercaptoethanol (0,1% v/v) in einem 1,5ml Eppendorf cup versetzt.

In drei von sechs Ansätzen kamen in dieser Stufe 50µl 5-MTHF-Spike hinzu, in den anderen 3 Fällen fand diese Zugabe erst später statt.

In jeweils zwei Fällen (einem mit zugesetztem Spike und einem ohne zugesetztem Spike) wurden nun nach dem Vortexen 1000µl ACN hinzugefügt, in anderen zwei Ansätzen (einem mit zugesetztem Spike und einem ohne zugesetztem Spike) wurden

nach dem Vortexen 750µl ACN zugesetzt und wiederum in den letzten zwei Doppelansätzen (einem mit zugesetztem Spike und einem ohne zugesetztem Spike) wurden 500µl ACN zugesetzt. Die Eppendorf cups wurden gut geschüttelt und gevortext. Alle Ansätze wurden bei 10 500rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde in allen 6 Fällen der Überstand abgenommen und mit diesem weitergearbeitet. Bei den Ansätzen, wo noch keine Spikezugabe erfolgt war, kamen jetzt 50µl 5-MTHF-Spike hinzu. Die Proben wurden gut gemischt.

Alle 6 Ansätze wurden sterilfiltriert und in HPLC-Vials, in denen 1% 2-Mercaptoethanol als Antioxidans vorgelegt war, eingesammelt. Die Vials wurden mit Argon begast und bis zur HPLC/MS-Messung bei -20°C eingefroren. Für alle drei Parallelansätze wurde zusätzlich ein, an die jeweiligen Volumina angepasster, 5-MTHF-Vergleichsstandard bereitet: 1500µl Wasser + 50µl Spike; 1250µl Wasser + 50µl Spike; 1000µl Wasser + 50µl Spike und als Gegenkontrolle für das Fällungsreagens wurden noch zusätzlich 1000µl ACN mit 50µl Spike versetzt.

### **3.5 Stufe 4: Enzymatische Plasmaproteinaufspaltung mittels Pankreatin**

#### **3.5.1 Bestimmung der Proteaseaktivität im Pankreatin**

Nach dem SIGMA Quality Control Test Procedure (SIGMA 1999) wurde ein enzymatischer Assay für Protease mit Casein als Substrat durchgeführt.

Demnach wurde eine Paralleluntersuchung von der Protease und Pankreatin auf die jeweilige Proteaseaktivität durchgeführt.

Da die Aktivität der bakteriellen Protease auf der Verpackung deklariert war, galt die Protease als Kontrolle für die Richtigkeit der durchgeführten Methode bei der Messung der Proteaseaktivität des Schweine-Pankreatins. Der Versuchsaufbau mit anschließender Messung wurde demzufolge gleich gestaltet.

Bei dem Assay handelte es sich um eine photometrische Messung des Proteinabbaus mit dem Folin & Ciocalteu's Phenol Reagens, das proportional zu der Höhe der

Tyrosinfreisetzung aus dem Caseinabbau durch die Protease eine Blaufärbung der Lösung verursachte.

Folgende Lösungen wurden für den Assay vorbereitet:

- **Lösung A:** 130ml 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer im entionisiertem Wasser, mittels 1M HCl auf pH 7,5 eingestellt
- **Lösung B:** 125ml 0,65% (w/v) Casein-Lösung. Die Lösung wurde langsam, unter ständigem Rühren für 10 min, auf 80-90°C erhitzt, damit sich das Casein auflöst. Der pH wurde auf 7,5 eingestellt (1M HCl und 1M NaOH)
- **Lösung C:** 20ml 110mM Trichloressigsäure-Reagens in entionisiertem Wasser
- **Lösung D:** Folin & Ciocalteu's Phenol Reagens (F-C), 10 ml in 40ml entionisiertem Wasser
- **Lösung E:** 50 ml 500mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, in entionisiertem Wasser
- **Lösung F:** 100ml 10mM Natriumacetatpuffer mit 5mM Calciumacetat, in entionisiertem Wasser
- **Lösung G:** 100ml 1,1mM L-Tyrosin Standard (=Standardlösung für Eichgerade) in entionisiertem Wasser. Die Lösung wurde erhitzt bis das Tyrosin gelöst war und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.
- **Lösung H:** Enzymlösungen (Protease bzw. Pankreatin)  
Einwaage Protease: 2,5mg Protease, auf 100ml mit Acetatpuffer (Lösung F) verdünnt → Endkonzentration von 0,025mg/ml  
Einwaage Pankreatin: 58,6mg Pankreatin, auf 25ml mit Acetatpuffer (Lösung F) verdünnt → Endkonzentration von 2,344mg/ml  
Von dieser ersten Konzentration wurde 1ml entnommen und weiter auf 10ml verdünnt → Endkonzentration von 0,2344mg/ml

Die Enzyme dürfen nicht im Überschuss vorhanden sein, da zur Ermittlung der Proteaseaktivität Casein nicht zur Gänze abgebaut werden darf, weil der Caseinüberstand für die Berechnung der Proteaseaktivität benötigt wird. Die vorliegenden Enzym-Konzentrationen wurden durch Vorproben ermittelt. Es wurde von einem Enzymüberschuss, bei dem nach der Inkubation kein Casein mehr vorhanden war, auf die Enzymkonzentration, bei der noch genug Casein vorhanden war, verdünnt und so die optimale Konzentration für den Versuch ermittelt.

Die hergestellten Reagentien dienen dem folgenden Arbeitsvorgang: Es wurden Testlösungen mit Pankreatin und Protease durchgeführt und für jedes von ihnen wurde ein Leerwert angesetzt.

**Tabelle 10: Pipettierschema für die Reagentien zur Proteaseaktivitätsbestimmung**

REAGENS	TEST	LEERWERT
Reagens B (Casein)	5ml	5ml
<i>Auf 37°C erwärmt</i>		
Reagens H (Enzymlösung)	1ml	-
<i>Geschüttelt, inkubiert bei 37°C für 10 Minuten, Zugabe von:</i>		
Reagens C (TCA)	5ml	5ml
Reagens H (Enzymlösung)	-	1ml
<i>Geschüttelt, bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, gefiltert durch 0,45µm Filter, Filtrat für Farbentwicklung mit Reagens D (Folin &amp; Ciocalteu's Phenol Reagens) verwendet:</i>		
REAGENS	TEST	LEERWERT
Test Filtrat	2ml	-
Reagens E (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	5ml	5ml
Reagens D	1ml	1ml
<i>Geschüttelt, bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt, gefiltert durch 0,2µm Filter, Extinktion des Filtrates bei 660nm gemessen.</i>		

Zusätzlich wurden Lösungen mit bekannten Tyrosin-Standards angesetzt, die zur Ermittlung einer Standardgeraden dienen. Durch diese konnte auf die übrig gebliebene Caseinkonzentration in der Testlösung rückgeschlossen werden.

**Tabelle 11: Pipettierschema für die Tyrosinstandards**

Standardgerade:	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Blank
Reagens G (Standard)	0,05ml	1,1ml	0,2ml	0,4ml	0ml
Reagens E (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Reagens D	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
<i>Geschüttelt, bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt, gefiltert durch 0,2µm Filter, Extinktion des Filtrates bei 660nm gemessen.</i>					

Im Kapitel 4.4.1 befinden sich die Berechnungen der Proteaseaktivität im Pankreatin anhand dieser Messungen.

### **3.5.2 Optimierung der Pankreatinkonzentration für den Plasmaproteinabbau**

Nachdem die Proteaseaktivität im Pankreatin ermittelt wurde, musste für die weitergehenden Versuche eine optimale Pankreatinkonzentration gewählt werden, mit der das Plasmaprotein, möglichst quantitativ abgebaut werden konnte. Das verbliebene Protein wurde wieder mittels Bradfordtest gemessen.

Zum Unterschied zu den schon durchgeführten Bradfordtests am Anfang, wurden hier 2 Standardgeraden aufgestellt. Die eine sollte mit den höheren Plasmaproteinwerten korrespondieren, die vorwiegend durch das zugesetzte Pankreatin auch nach der Inkubation verblieben, die andere mit den schon inkubierten Proben, bei denen der Pankreatinleerwert abgezogen wurde und demnach niedrige Proteinkonzentrationen zu erwarten waren (siehe Kapitel 4.4.2).

Die Standardgeraden wurden wieder mit Albumin als Standardsubstanz hergestellt. Die erste Gerade umfasste größere Konzentrationsbereiche mit 1mg/ml; 1,5mg/ml; 2mg/ml; 2,5mg/ml und 3mg/ml. Die zweite Gerade umfasste die kleineren Bereiche mit 0,05mg/ml; 0,1mg/ml; 0,2mg/ml und 0,5mg/ml. Für den Versuch wurden 3 verschiedene Pankreatinkonzentrationen (10mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml, hergestellt in Sörensen-Puffer pH 7,5) und eine Proteasekonzentration (1mg/ml) als Vergleichswert zur Inkubation von Plasma herangezogen und nachfolgend, nach der Einwirkung mit

dem Coomassieblau-Reagens, photometrisch bei 595nm gemessen.

Vier mal 500µl Plasma wurden mit 1000µl der jeweiligen Pankreatinkonzentration oder Proteasekonzentration versetzt, und 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Pankreatinbestandteile mit 3900rpm bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Es erfolgte bei jeder Probe auch eine Leerwertbestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration des Pankreatins bzw. der Protease, indem die Verdünnung und Inkubation wie mit den Originalproben verlief, nur mit dem Unterschied, dass statt Plasma dasselbe Volumen an Wasser verwendet wurde.

Nachfolgend erfolgte die 15 minütige Inkubation von 100µl jeder Probe mit 1ml Coomassieblaulösung. Die resultierende Blaufärbung wurde photometrisch bei 595nm gemessen.

Kapitel 4.4.2 enthält die Berechnungen und Erklärungen der Versuchsergebnisse, die durch die Subtraktion der entsprechenden Pankreatin- und Protease-Leerwerte von mit ihnen versetzten Proben, erhalten wurden.

### **3.5.3 Versuch zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes nach Plasmainkubation mit Pankreatin**

Im Dreifachansatz wurden 500µl Plasma mit 1000µl Pankreatin (30mg/ml im Sörensen-Puffer, pH 7,5 bereitet) und entsprechende Mengen an Antioxidantien (1% Na-Ascorbat und 0,1% 2-Mercaptoethanol) vermischt und gevortext. Daraufhin kamen 40µl 5-MTHF-Spike hinzu. Die Probelösungen wurden mit Argon begast und 1h bei 37°C inkubiert.

Danach folgte bei allen Proben eine Aufarbeitung mittels SPE. Mit jeweils 3000µl wurde konditioniert (90:10 ACN:H<sub>2</sub>O) und equilibriert (10:90 ACN:H<sub>2</sub>O), danach wurde die Probe aufgetragen, gewaschen (3000µl H<sub>2</sub>O) und schlussendlich die Elution mit 500µl 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O zu je 3 Fraktionen durchgeführt. Zusätzlich wurde noch ein Ansatz durchgeführt, der genau wie die anderen Proben behandelt wurde, nur dass nach der Inkubation, aber vor der SPE eine Proteinfällung mittels TCA (Zugabe von 1500µl 10% TCA) erfolgte, um die Auswirkungen anhand der LC/MS-Ergebnisse festzustellen.

Es wurde ein 5-MTHF-Leerwert für die LC/MS-Messung hergestellt, indem 500µl Wasser mit 40µl Spike und 1% 2-Mercaptoethanol versetzt wurden.

### **3.5.4 Versuche zur Wiederfindung des Spikes mit Hauptaugenmerk auf die SPE**

Da im vorherigen Versuch keine Spikewerte wiedergefunden werden konnten, musste untersucht werden, woran das lag. Der hauptverdächtige Schritt war die SPE, die es in diesem Versuch zu untersuchen galt.

Es wurde vermutet, dass der gesuchte Spike entweder an der SPE-Säule hängen geblieben und nicht eluiert wurde, oder umgekehrt, dass der Spike beim Waschschrift vorzeitig ausgewaschen wurde.

Die Versuchsdurchführung erfolgte gänzlich ohne Zugabe von Plasma und Pankreatin. Es wurde aber dasselbe Volumen wie im Vorversuch eingesetzt, indem beide Reagentien durch Puffer ersetzt wurden. 4 verschiedene Pufferarten wurden ausprobiert: Sörensen-Puffer, pH 7,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pH 4,83; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer pH 9,02

Um alle 3 Pufferarten auszuprobieren, wurden 3 Ansätze durchgeführt.

1500µl des jeweiligen Puffers wurden mit Antioxidantien (1% (w/v) Na-Ascorbat und 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt und 40µl Spike zugesetzt. Ohne zu inkubieren wurde gleich darauf die SPE wie im Vorversuch durchgeführt.

Es wurde zusätzlich das Waschwasser jedes Ansatzes in HPLC-Vials gesammelt (2 Vials zu je 1500µl wurden aufgefüllt), um es nachfolgend mit der LC/MS-Messung auf ausgewaschenen Spike zu untersuchen.

Bei der Eluierung wurden je 4 Fraktionen zu je 500µl gesammelt. Alle gesammelten Vials wurden mit Argon begast und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt.

Ein unbehandelter Spike-Leerwert wurde als Soll-Wert für die LC/MS-Wiederfindung bereitet. Dazu wurden 460µl HPLC-Wasser mit 40µl Spike in einem HPLC-Vial versetzt, mit Argon begast und bis zur Messung eingefroren.

Messergebnisse siehe Kapitel 4.4.4

### **3.6 Stufe 5: Übergang auf den basischen Phosphatpuffer- Fertigung von 5-MTHF-Spike im basischen Milieu**

#### **Spikeherstellung**

Es wurde ein 20mM  $K_2HPO_4$ -Puffer mit pH 9,08 hergestellt.

1,39mg  $Na_2$  5-MTHF wurden in einen 100ml Kolben mit vorgelegten Antioxidantien (1% w/v Na-Ascorbat und 0,1% v/v 2-Mercaptoethanol) eingewogen und mit dem zuvor hergestellten Puffer bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wurde gut gemischt, mit Argon begast und bis zum Auflösen dunkel gehalten. Danach wurde der so hergestellte 5-MTHF-Spike ( $c= 27,5\mu\text{mol}/100\text{ml}$ ) in 1,5ml Eppendorf cups aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### **3.6.1 Wiederfindung des im basischen Phosphatpuffer hergestellten 5-MTHF-Spike mit Hauptaugenmerk auf die SPE**

1500 $\mu\text{l}$   $K_2HPO_4$ -Puffer wurden mit 1% Na-Ascorbat und 0,1% 2-Mercaptoethanol versetzt und 40 $\mu\text{l}$  Spike zugegeben.

Die nachfolgende SPE wurde wie bei den vorigen Versuchen durchgeführt (3000 $\mu\text{l}$  Konditionieren und Equilibrieren, Probenauftragung, 3000 $\mu\text{l}$  Waschen, Eluieren mit 3mal 500 $\mu\text{l}$  75:25 ACN:H<sub>2</sub>O), nur mit dem Unterschied, dass nicht mit Wasser gewaschen wurde, sondern mit  $K_2HPO_4$ -Puffer. Der Waschpuffer wurde in 2 1,5ml HPLC-Vials getrennt gesammelt und bei der späteren Analyse miterfasst. Der Spike-Blank zum Vergleich als Soll-Wiederfindungsrate wurde hergestellt indem 460 $\mu\text{l}$  Puffer mit 40 $\mu\text{l}$  Spike in einem HPLC-Vial mit vorgelegtem 2-Mercaptoethanol vermischt wurden. Alle HPLC-Vials wurden mit Argon begast und mittels HPLC-MS gemessen.

### **3.6.2 Optimierung des Acetonitril:H<sub>2</sub>O-Verhältnisses beim**

#### **Elutionsschritt in der SPE**

1500µl basischer Phosphatpuffer wurden 7 Mal in 7 verschiedene Eppendorf cups pipettiert und jeweils mit 1% Na-Ascorbat, 0,1% 2-Mercaptoethanol und 40µl Spike im basischen Puffer versetzt.

Bis zum Elutionsschritt waren alle SPE-Behandlungen gleich wie beim Versuch zuvor. Der Waschpuffer wurde auch hier zur späteren Messung eingesammelt und mit Argon begast.

Die Elution fand in allen 7 Fällen mit 3 Mal 500µl statt, aber immer mit unterschiedlichen Acetonitril:H<sub>2</sub>O -Verhältnissen. Die Verhältnisse waren 90:10 ACN:H<sub>2</sub>O; 100:0 ACN:H<sub>2</sub>O; 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O; 0:100 ACN:H<sub>2</sub>O; 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O; 20:80 ACN:H<sub>2</sub>O; 30:70 ACN:H<sub>2</sub>O.

Der Spike-Blank wurde mit 460µl Puffer und 40µl Spike hergestellt und mit Argon begast. Alle HPLC-Vials wurden mittels LC/MS gemessen.

### **3.7 Stufe 6: Plasmaproteinfällung mittels Meta-Phosphorsäure nach Nelson et al. 2004**

Die Methode, die Nelson et al. 2004 beschrieben haben, sollte nachgemacht und für die hier vorliegenden Umstände erprobt werden. Der Hauptgesichtspunkt des Heranziehens der Methode besteht darin, die Pankreatin-Methode mit dieser zu vergleichen. Da andere Fällungsmethoden nicht so gute Werte erzielt haben und auch die Kompatibilität mit der anschließenden LC/MS Messung nicht gewährleistet war, lag eine neue Hoffnung in dieser Methode, die, wie Nelson et al. 2004 schrieben, besser und schonender für den 5-MTHF-Spike wäre als die TCA-Fällungsmethode.

Für die Durchführung der Versuche wurden jeweils drei Lösungen benötigt:

- eine frisch zubereitete 10%ige Ascorbinsäure-Lösung
- 0,4M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0,5M NaOH-Lösung; wurde auf Vorrat hergestellt und kühl gelagert

- 50%ige meta-Phosphorsäure, die durch das Lösen von festen Pellets in Wasser erhalten wurde; die Lösung musste alle 2-3 Tage frisch zubereitet werden, um eine gleichbleibende Konzentration zu gewährleisten.

### **3.7.1 Einsatz der von Nelson et al. 2004 entwickelten Methode und Versuch zur Aufkonzentrierung des 5-MTHF-Spikes durch die SPE**

Nach einigen Vorversuchen konnte die Beschreibung der Methode nach Nelson et al. 2004 gut nachgemacht werden:

500µl Plasma wurden mit 90µl Spike versetzt und sofort mit 500µl 10%iger Ascorbinsäure-Lösung für 15 Minuten auf Eis equilibriert. Zuvor wurde das Gemisch gevortext und mit Argon begast. Nach der verlaufenen Zeit wurden 10µl 50%ige meta-Phosphorsäure hinzugefügt, gevortext (für 1 Minute) und die Lösung bei 13 700g für 5 Minuten und 5°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Eppendorf cup pipettiert und mit 375µl 0,5M NaOH/0,4M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung versetzt. Der gemessene pH-Wert der so erhaltenen, entproteinierten, Lösung war 7,3, wie im Paper beschrieben. Die Proteinfällung war sehr zufriedenstellend, da sich nach dem Zentrifugieren eine große Menge an Pellet absetzte, beim Einsatz von nur 10µl Fällungsreagens.

Aufgrund technischer Limitierungen (höhere Umdrehungszahl der Zentrifuge nur mit den Eppendorf cups möglich) konnte keine höhere Plasmamenge als 500µl auf einmal gefällt werden.

Somit mussten für eine 5-MTHF-Anreicherung aus 3ml gepooltem Plasma 6 Mal 500µl Plasma in 1,5ml Eppendorf cups mit 90µl Spike versetzt werden. Der weitere Vorgang war für jeden der 6 Ansätze gleich wie die zuvor beschriebene Arbeitsanleitung.

Das Gesamtvolumen aller 6 Eppendorf cups entsprach nach der Zentrifugierung und der Neutralisierung des Überstandes mit 0,5M NaOH/0,4M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung ca. 9ml.

Diese sollten auf eine SPE-Kartusche aufgetragen und die Aufkonzentrierung des 5-MTHF-Spikes, die theoretisch 6-fach zum unbehandelten Spike-Blank ausfallen sollte, mittels LC/MS gemessen werden.

SPE-Bedingungen: 3000µl Konditionieren, Equilibrieren, Probenauftragung, Waschen mit 3000µl Puffer, Elution mittels 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O, jeweils 5 Fraktionen zu je 500µl gesammelt.

Ein ähnlicher Anreicherungsversuch wurde mit 6ml Plasma, auf 12 Eppendorf cups aufgeteilt, durchgeführt. Somit wurde der 5-MTHF-Spike 12 Mal zugesetzt und sollte bei der LC/MS-Messung auch 12-fach größer als der Spike-Blank ausfallen. Hier wurde die SPE bis zur Eluierung wie vorhin beschrieben durchgeführt. Die Elution allerdings fand mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O statt. Es wurden auch hier 5 Mal 500µl Fraktionen gesammelt.

### **3.7.2 Einstellung des Elutionsvolumen bei der SPE mit vorheriger Proteinfällung mit meta-Phosphorsäure**

Für eine Aufkonzentrierung sollte ein möglichst niedriges Volumen beim Eluieren des Metaboliten verwendet werden. Bei diesem Versuch sollte herausgefunden werden, wie groß die Fraktion mit dem beinhalteten Spike sein sollte, damit der Spike nicht in zwei Fraktionen aufgeteilt ist, aber ein möglichst niedriges Volumen an 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O aufgetragen wird.

Es wurden 5ml Plasma in 500µl Plasmavolumina auf 10 1,5ml Eppendorf cups aufgeteilt und mit jeweils 40µl Spike und 500µl 10%iger Ascorbinsäurelösung auf Eis equilibriert. Danach wurde mit jeweils 10µl meta-Phosphorsäure gefällt und bei 13700g bei 5°C und 5 Minuten zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde entnommen und in einem neuen Eppendorf cup mit 375µl 0,5M NaOH/0,4M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> vermischt.

Es folgte die SPE wie beschrieben (siehe Versuch 3.7.1 und vorige), mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O als Elutionslösung mit dem Unterschied, dass die Eluierung in kleine Zwischenschritte aufgeteilt wurde:

Anstatt 3 Fraktionen zu je 500µl zu eluieren, wurde die zweite und die dritte Fraktion in 5 Mal 100µl Schritte aufgeteilt. Die erste Fraktion blieb bei 500µl, da in Vorversuchen in dieser niemals der 5-MTHF-Spike auftrat.

Diese kleinen Volumina wurden in HPLC-Vials-Einsätze, mit vorgelegtem 1% 2-

Mercaptoethanol, pipettiert. Danach folgte die LC/MS-Messung.

### **3.7.3 Überprüfung der Einstellung der Fraktionsgröße anhand verschiedener Plasma- und Spikevolumina**

Im vorherigen Versuch wurde anhand von kleinen Schritten eine optimale Fraktionsgröße festgelegt, die es jetzt zu bestätigen galt.

Die erste Fraktion konnte laut Versuch 3.7.2 700µl umfassen. Zur Sicherheit wurde die erste Fraktion im folgenden Versuch auf 600µl reduziert. Die zweite Fraktion wurde hier bei 400µl belassen. Dies sollte die Hauptfraktion sein, wo der 5-MTHF-Spike eluiert wird. Zur Sicherheit wurde auch noch die dritte Fraktion eingefangen (400µl), die nur zur Überprüfung auf Spike-Freiheit diente. Diese Fraktionsgröße sollte bei allen Plasma- und Spikemengen ausreichen, um optimal zu sein. Das sollte in diesem Versuch eruiert werden.

Es wurden 3 Ansätze gefertigt, die wie die letzten Versuche, mit meta-Phosphorsäure zur Fällung des Plasmaproteins behandelt wurden.

**Tabelle 12: Pipettierschema der Probe- und Spike Blank-Lösungen im Versuch 3.7.3**

3ml Plasma+6 x 90µl Spike	3ml Plasma+6 x 40µl Spike	1ml Plasma+2 x 40µl Spike
6 x 500µl Plasma 6 x 90µl Spike 6 x 500µl 10% Ascorb.Sre.* Equilibrieren auf Eis 6 x 10µl m-Phosphorsre. <sup>+</sup> Zentrifugieren Entnehmen des Überstandes Neutralisieren (375ml 0,5M NaOH/0,4M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	6 x 500µl Plasma 6 x 40µl Spike 6 x 500µl 10% Ascorb.Sre.* Equilibrieren auf Eis 6 x 10µl m-Phosphorsre. <sup>+</sup> Zentrifugieren Entnehmen des Überstandes Neutralisieren (375ml 0,5M NaOH/0,4M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2x 500µl Plasma 2 x 40µl Spike 2 x 500µl 10% Ascorb.Sre.* Equilibrieren auf Eis 2 x 10µl m-Phosphorsre. <sup>+</sup> Zentrifugieren Entnehmen des Überstandes Neutralisieren (375ml 0,5M NaOH/0,4M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Spike Blank: 400µl Puffer+ 90µl Spike	Spike Blank: 400µl Puffer+ 40µl Spike	Spike Blank: 400µl Puffer+ 40µl Spike

\*10% Ascorbinsäure      <sup>+</sup> meta-Phosphorsäure

Die SPE war bei allen drei Ansätzen gleich:

- 3000µl 90:10 ACN:H<sub>2</sub>O
- 3000µl 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O
- Probenauftragung
- Waschen mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer  
Eluieren mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O
  1. Fraktion 600µl
  2. Fraktion 400µl
  3. Fraktion 400µl

Für kleine Volumina eignen sich herkömmliche HPLC vials nicht, man muss spezielle Einsätze verwenden, um einen optimalen Flüssigkeitsspiegel für das Eintauchen des HPLC-Autosamplers zu gewährleisten. Somit wurden die aufgefangenen 400µl Eluate in kleineren Volumina (zwischen 100 und 200µl) in Einsätze überführt und diese in ein herkömmliches Vial hineingestellt.

Der Spike Blank diente zum Vergleich des 5-MTHF-Sollwertes mit den aufkonzentrierten Probelösungen. Der Spike-Blank selber wurde nicht über die SPE aufkonzentriert, sondern es wurde im Kapitel 4.6.3 der Vergleich zwischen originalem Sollwert des Spikes mit der Aufkonzentrierungsrate der Probelösungen graphisch dargestellt und überprüft, ob die Soll-Aufkonzentrierung (6-fache oder 2-fache Aufkonzentrierung des 5-MTHF-Spikes) erreicht wurde.

## **3.8 Stufe 7: Kombination von den eingestellten Fraktionsgrößen und der Fällungsmethode nach Nelson et al. 2004 mit den enzymatischen Methoden**

### **3.8.1 Inkubation von Plasma mit Pankreatin/Protease mit dem verkleinerten Elutionsvolumen bei der SPE**

Es wurden 30mg/ml Pankreatin und 6mg/ml Protease im K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer hergestellt, 10 Minuten auf Eis stehen gelassen und danach bei 3 900rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand beider Lösungen wurde abgenommen und als

Enzymlösung eingesetzt.

Es wurden 4 Ansätze gemacht: 1 Doppelansatz mit der Pankreatin-Enzymlösung und 1 Doppelansatz mit der Protease-Enzymlösung.

1000µl der Enzymlösungen wurden mit jeweils 500µl Plasma gemischt und mit 1% Na-Ascorbat, 0,1% 2-Mercaptoethanol und 40µl Spike versetzt. Die Ansätze wurden mit Argon begast und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Die nachfolgende SPE verlief, wie gewohnt, mit 3000µl Konditionieren und Equilibrieren, Probenauftragung, Waschen mit Puffer und anschließendem Eluieren mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O mit den in den letzten Versuchen ermittelten Elutionsvolumina von 600µl für die erste Fraktion, 400µl für die 2. Fraktion und 400µl für die 3. Fraktion. Auch hier wurde ein aliquoter Teil der gesammelten kleinen Fraktionen in HPLC-Einsätze für die LC/MS-Messung überführt.

### **3.8.2 Versuche zur Wiederfindung des Spikes**

Da im vorherigen Versuch, unerklärterweise, der Spike weder anhand der Retentionszeit, noch anhand der spezifischen Masse wiedergefunden wurde, musste im folgenden Versuch geklärt werden, in welcher Stufe der Spike verloren geht, um den Fehler später beheben zu können.

Es wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt, die verschiedene Kombinationen beinhalteten. Alle Kombinationen wurden mit 1% Na-Ascorbat und 0,1% 2-Mercaptoethanol versetzt und 1h inkubiert (37°C).

**Tabelle 13: Pipettierschema im Versuch 3.8.2**

	Plasma	Spike	Pankreatin (30mg/ml in Puffer, zentrifugiert)	Puffer (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Ansatz 1	-	40µl	-	500µl
Ansatz 2	-	-	1000µl	-
Ansatz 3	-	40µl	1000µl	500µl
Ansatz 4	500µl	-	-	-
Ansatz 5	500µl	40µl	1000µl	
Ansatz 6	500µl + Proteinfällung	40µl	1000µl	-

Die Proteinfällung im Ansatz 6 entsprach der Fällung mittels meta-Phosphorsäure, wie sie im Kapitel 3.7 beschrieben wurde. Hier wurde sie nach der Inkubationszeit von 1h durchgeführt, um die Auswirkungen der Fällung auf die Spike-Wiederfindung zu ermitteln.

Jeder Ansatz wurde nachfolgend über die SPE aufgereinigt und mit 3 x 500µl 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O eluiert. Die Fraktionen wurden wieder zu je 500µl gesammelt und in HPLC vials überführt.

### **3.8.3 Wiederfindungsversuche von 5-MTHF-Spike und Methotrexat-**

#### **Spike**

Es sollte überprüft werden, ob auch Methotrexat, welches dem 5-MTHF strukturverwandt ist, dem Abbau unterliegt.

Dazu wurde ein Methotrexat-Spike hergestellt:

1mg Methotrexat wurden in einem 100ml Kolben mit vorgelegtem 1%Na-Ascorbat in K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer und 0,1% 2-Mercaptoethanol eingewogen. Der Kolben wurde bis zur Marke mit Puffer aufgefüllt, mit Argon begast und dunkel aufbewahrt. Die Lösung wurde in 1,5ml Eppendorf cups aliquotiert und bis zum Gebrauch eingefroren.

Auch hier wurden verschiedene Ansätze ausprobiert, um eine Möglichkeit zu finden, wie die zwei Spikes unversehrt detektiert werden können. Dazu wurden

## MATERIALIEN UND METHODEN

Kombinationen, wie in Tabelle 14 dargestellt, zusammengesetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Zu jeder Kombination kamen zusätzlich 1% Na-Ascorbat und 0,1% 2-Mercaptoethanol dazu.

**Tabelle 14: Pipettierschema im Versuch 3.8.3**

	Plasma	5-MTHF-Spike + Methotrexat-Spike	Pankreatin (30mg/ml in Puffer, zentrifugiert)	Puffer (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Ansatz 1	-	90µl + 90µl	1000µl	500µl
Ansatz 2	-	90µl + 90µl	1000µl	500µl
Ansatz 3	500µl	90µl + 90µl	1000µl	-
Ansatz 4	500µl	90µl + 90µl	1000µl	-
Ansatz 5	500µl	-	1000µl	-
Ansatz 6	500µl + Proteinfällung	90µl + 90µl	1000µl	-
Ansatz 7	500µl	90µl + 90µl	-	-

Beim Ansatz 6 wurde zusätzlich nach der Inkubation die Proteinfällung mittels meta-Phosphorsäure durchgeführt.

Bei allen Ansätzen, außer bei Ansatz 1, wurde eine SPE durchgeführt.

Bei den Ansätzen 2 und 3 wurde während der SPE sowohl die Flüssigkeit bei der Probenauftragung, als auch der Waschpuffer in einem HPLC-Vial gesammelt. Der Ansatz 4 unterschied sich von Ansatz 3 durch die Elution mit 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O statt 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O. Diese Elutionslösung wurde bei allen anderen Ansätzen verwendet. Es wurden jeweils 3 Fraktionen zu je 500µl gesammelt und mittels LC/MS gemessen.

Dieselben Ansätze wurden auch mit der Protease (6mg/ml) durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Stufe 1: Ergebnisse zu den Bradfordversuchen

#### 4.1.1 Ergebnisse zur Ermittlung der Proteinkonzentration nach verschiedenen Proteaseeinwirkungszeiten

Die Geradengleichung resultierte durch die Standardgerade mittels den Albuminkonzentrationen von 0,05-1mg/ml und der photometrischen Messung von deren Extinktionen bei 595nm. Im Excel wurde ein Geradendiagramm mit Hilfe dieser Werte gezeichnet, wodurch sich die Geradengleichung ermitteln ließ.

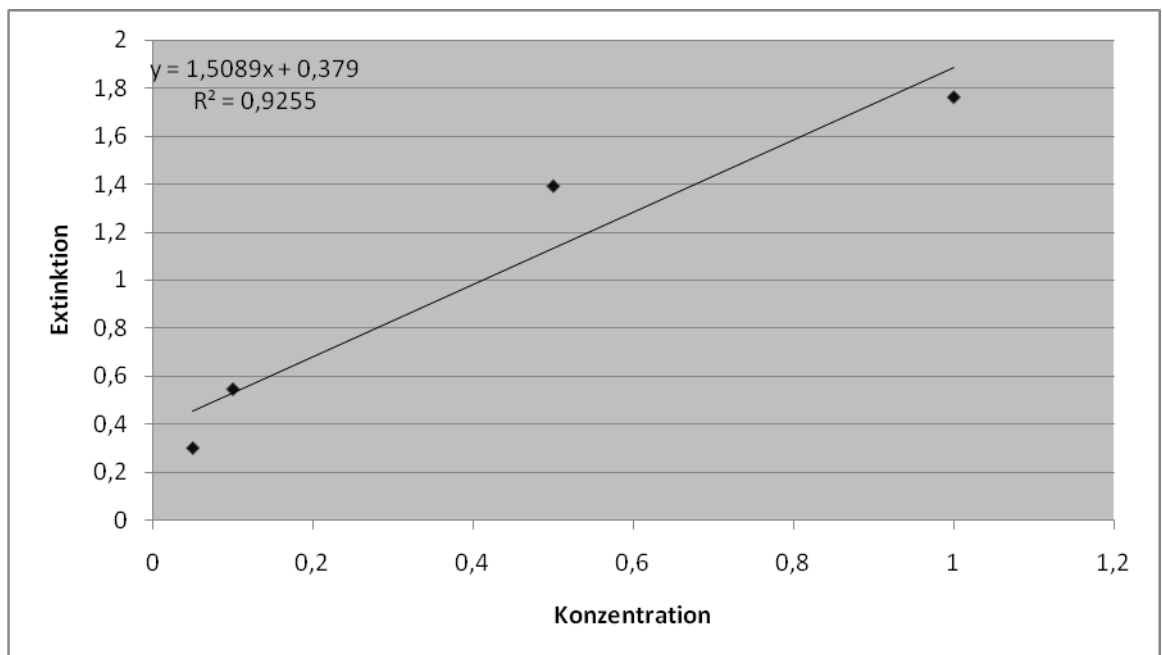


Abbildung 7: Standardgerade des Versuches 3.2.1

Durch die eingesetzten Werte lautet die Geradengleichung:  $y = 1,51x + 0,38$

Anhand dieser Geradengleichung wurden für die unbekanntes Proben aufgrund der gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentrationen berechnet (siehe Tabelle 15).

Die so erhaltenen Ergebnisse waren trotz zwei unterschiedlicher Inkubationszeiten sehr ähnlich und zeigten, dass noch immer eine gewisse Menge an Protein enthalten war.

## ERGEBNISSE

Auch die Ergebnisse von den unbehandelten, mit Puffer verdünnten Proben (vor allem die 1:10 verdünnte Probe), zeigten sehr ähnliche Werte, wobei die 1:100 verdünnte, unbehandelte Probe, von den anderen Ergebnissen nach unten hin abwich.

Es wurde angenommen, dass bei allen inkubierten Proben ein Großteil des gemessenen Proteins von der eingesetzten Protease stammte.

**Tabelle 15: Ergebnisse des Versuches 3.2.1**

Art der Probe	Extinktion bei 595nm	Berechnete Konzentration
Inkubation 1h ohne Zentrifugieren	2,01	1,08
Inkubation 1h mit Zentrifugieren	2,31	1,28
Inkubation 4h ohne Zentrifugieren	2,38	1,32
Inkubation 4h mit Zentrifugieren	2,17	1,18
Puffer:Plasma 1:10 ohne Protease	2,3	1,27
Puffer:Plasma 1:100 ohne Protease	1,45	0,71

### 4.1.2 Eigenproteingehalt der Protease

Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, mussten bei jedem neuen Versuch die Standardsubstanzen (Albuminstandards) neu gemessen und die Standardgerade neu gezeichnet werden.

Wie bekannt wurde auch hier die Geradengleichung ermittelt, diese lautet:  $y=1,55x+0,49$ . Mit dieser wurden die Versuchsergebnisse (siehe Tabelle 16) berechnet.

**Tabelle 16: Ergebnisse des Versuches 3.2.2**

Art der Probe	Extinktion bei 595nm	Berechnete Konzentration (mg/ml)
1mg/ml Albumin + 10mg/ml Protease	1,83	0,86
1mg/ml Albumin + 5mg/ml Protease	1,69	0,77
1mg/ml Albumin + 1mg/ml Protease	0,68	0,12
1mg/ml Albumin + 10mg/ml Protease + Kochen	0,11	-0,25
0,05mg/ml Albumin + 10mg/ml Protease	1,9	0,91

## ERGEBNISSE

0,05mg/ml Albumin + 5mg/ml Protease	1,7	0,78
0,05mg/ml Albumin + 1mg/ml Protease	0,7	0,14
0,05mg/ml Albumin+ 10mg/ml Protease + Kochen	0,13	-0,23
10mg/ml Proteaselösung	2,09	1,03

Aus den vorliegenden Ergebnissen ging eindeutig hervor, dass mit der Abnahme der Proteasekonzentration in einer gleich konzentrierten Albuminlösung auch der Proteingehalt nach der Inkubation abnahm.

Der ermittelte Leerwert der Protease-Proteinkonzentration (10mg/ml) war 1,03, was ziemlich genau den Messwerten des letzten Versuches (Kapitel 4.1.1) entsprach.

Demzufolge konnte angenommen werden, dass im vorigen Versuch das Enzym Protease im Überschuss vorlag und das Substrat Plasmaprotein zur Gänze abgebaut wurde. Die ermittelten Proteinwerte stammten nur noch von der Protease.

Dieses endogene Protein der Protease konnte, wie im vorliegenden Versuch gezeigt, durch einen 5-minütigen Kochschritt im 100°C heißen Wasserbad denaturiert werden und war folglich nicht mehr durch den Bradfordtest nachweisbar.

Somit musste in den späteren Versuchen, bei jeder Proteinanalyse mit vorheriger enzymatischer Aufspaltung der Leerwert des Enzyms berücksichtigt werden.

### **4.1.3 Ergebnisse der Proteinkonzentrationen nach der SPE**

Wie bei den zuvor durchgeführten Versuchen, wurde eine Standardgerade und deren Geradengleichung ermittelt.

Anhand dieser ließen sich die Proteinkonzentrationen der 24 Versuchskombinationen errechnen.

Aus diesen Ergebnissen ging wieder deutlich hervor, dass mit Abnahme der Proteasekonzentration bei der Bradfordmessung vor der SPE auch die ermittelte Proteinkonzentration niedriger war, was noch einmal die Richtigkeit der vorigen Versuchsergebnisse (Kapitel 4.1.2) darlegte.

Es gab aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen der gleichen

## ERGEBNISSE

Konzentrationen aber unterschiedlichen Inkubationszeiten vor der SPE.

Es kam überall heraus, dass das Plasmaprotein abgebaut wurde und der restliche Proteingehalt eindeutig das endogene Proteaseprotein darstellte.

Nach der SPE jedoch, waren alle Kombinationen praktisch proteinlos, da sich alle errechneten Werte um Null bewegten. Hiermit wurde bewiesen, dass über die SPE auch das proteaseeigene Protein entfernt werden konnte und die Folge einer solchen Aufreinigung eine proteinlose Lösung war.

## 4.2 Stufe 2: Ermittlungen der optimalen pH-Einstellung

### 4.2.1 HPLC-MS-Ergebnisse zur enzymatischen Inkubation von Albumin und Plasma mit und ohne saurem Phosphat-Puffer

Im Gegensatz zu den Plasmaproben wurde sowohl bei der Albuminprobe mit Puffer als auch beim Albuminansatz ohne Puffer die Masse ( $m/z$ ) 458,18 für den 5-MTHF-Spike in der ersten Fraktion gefunden. Allerdings war die Area (Peakfläche) 107 319 vom Albumin mit Puffer viel höher als die Area ohne Puffer (4 901,6), wodurch geschlossen werden konnte, dass der Puffer für die Inkubation unbedingt notwendig war und in den weiterführenden Versuchen nicht weggelassen werden konnte.

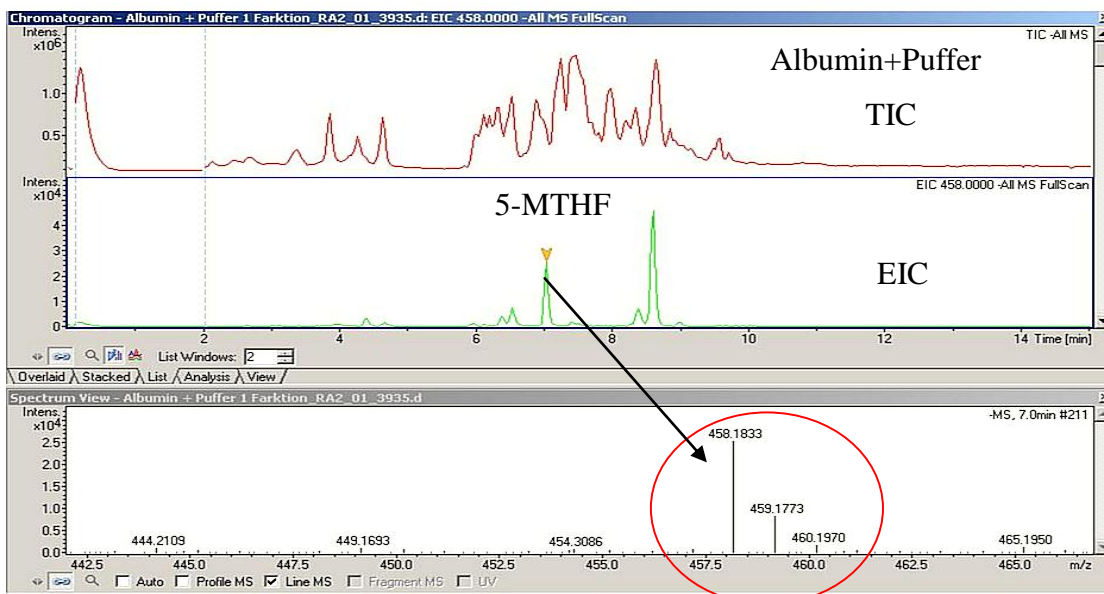


Abbildung 8: LC- und Massenspektrum des Versuches 3.3.1 (Albumin+Puffer)

## ERGEBNISSE

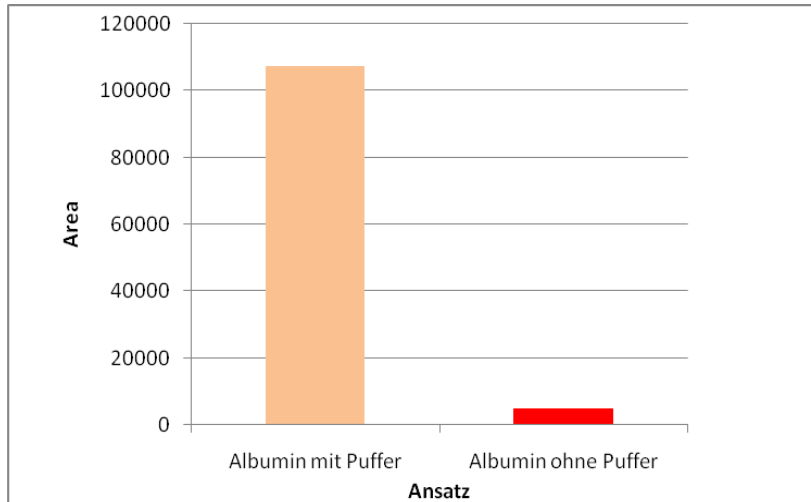


Abbildung 9: 5-MTHF-Vergleich zwischen Albumininkubationen mit und ohne Puffer

Bei allen Plasma-Puffer-Ansätzen ist in keiner Fraktion 5-MTHF ( $m/z$  458,18) gefunden worden.

Fest stand der Verlust des Spikes während der Inkubation. Ob der saure Kaliumphosphatpuffer dafür verantwortlich war, sollte im darauffolgenden Versuch festgestellt werden.

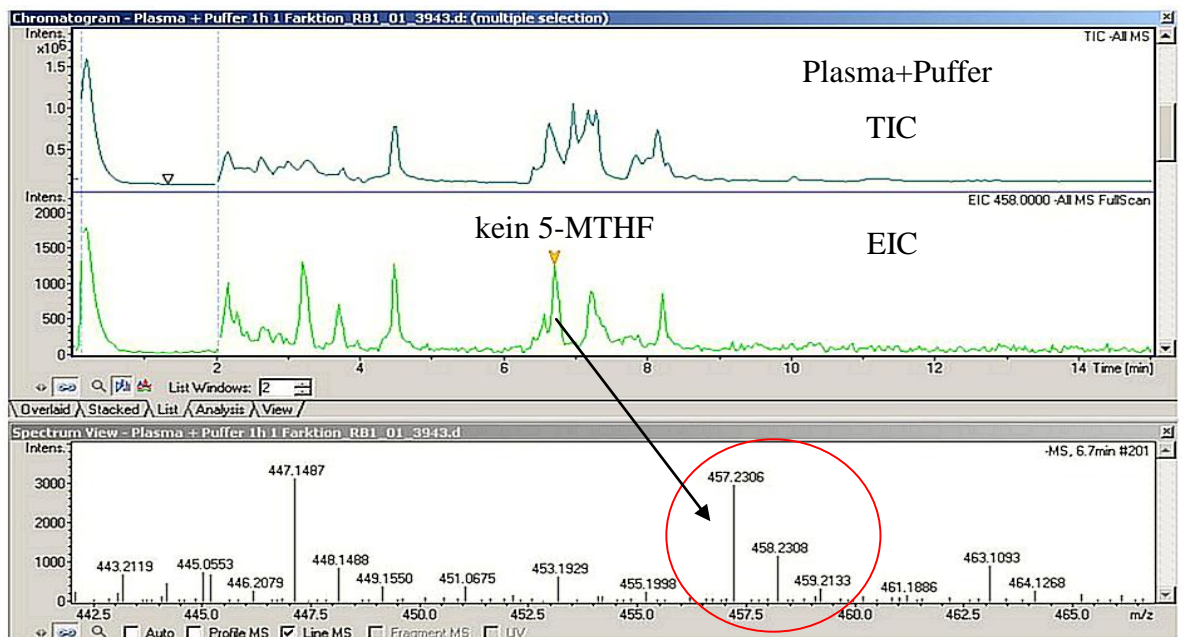


Abbildung 10: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.3.1 (Plasma+Puffer)

## 4.2.2 HPLC/MS-Ergebnisse zur Inkubation von Plasma mit Protease bei verschiedenen Phosphatpuffern

Bei allen 3 Pufferansätzen hat sich nach dem Zusammenmischen aller Reagenzien der pH verglichen zum Originalpuffer verändert (siehe Tabelle 9 im Kapitel 3.3.2).

Beim sauren Puffer ist nach dem Zusammenmischen der pH- Wert angestiegen (pH 4,83 → pH 6,90), beim basischen Puffer-Gemisch wurde ein pH-Abfall festgestellt (pH 9,02 → pH 7,30) und der pH des Mischpuffer-Ansatzes ist leicht gestiegen (pH 6,94 → pH 7,65). Alle Ansätze hatten die Eigenschaft eines neutralen pHs – der Mischpuffer war mit einem pH 7,65 am Höchsten.

Daraus ging deutlich hervor, dass der ursprüngliche pH Wert des Puffers nach dem Zusammenmischen aller Reagenzien nur sehr wenig Einfluss auf den resultierenden pH der Lösung hatte, da die pHs aller drei Ansätze stark verändert wurden und im Endeffekt sehr ähnlich waren. Möglicherweise war dafür die starke Pufferkapazität des Plasmas verantwortlich.

In allen drei Ansätzen ist es wiederum nicht gelungen den 5-MTHF-Spike mittels LC/MS Messung zu bestimmen. In keinen der 3 Fraktionen war die richtige Masse von 458,18 (m/z) vorhanden. Bei der sehr ähnlichen Masse 458,26 (m/z) auftretend in der 2. Fraktion, handelte es sich um eine andere Substanz, vermutlich ein Plasmabestandteil.

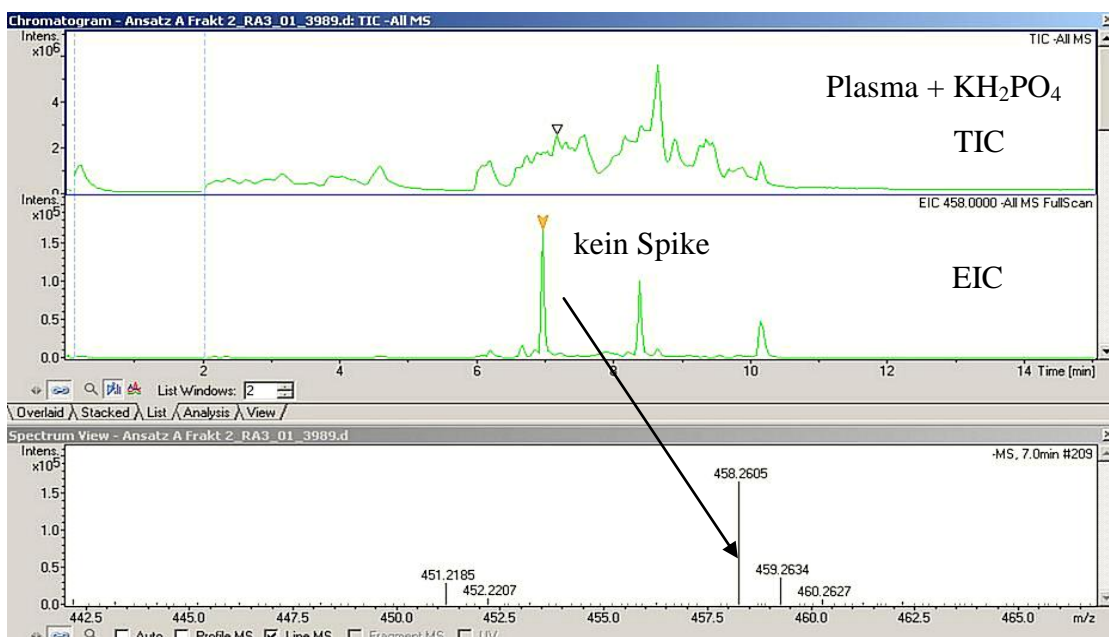


Abbildung 11: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.3.2

### 4.3 Stufe 3: Ergebnisse zu den Fällungsmethoden

#### 4.3.1 Total-Ionen-Chromatogramme zu den Fällungen mittels ACN, TCA und EtOH

Es ist eindeutig aufgefallen, dass die Fällung mit ACN und TCA funktioniert hat, während die Fällung mit 70%igem Ethanol nicht zufriedenstellend war, da sich nur wenig Niederschlag bildete.

Die LC/MS Messungen ergaben, dass die Fällung mit ACN und Ethanol besser funktioniert hat, als jene mit TCA. Hier gab es keine schöne Basislinie, während bei den ersten zwei Fällungsmethoden die Chromatogramme eine gerade Basislinie hatten.

Aus dem Grund, und weil die Fällung mit Ethanol keine gute Niederschlagbildung zur Folge hatte, wurde ACN für einen weiteren Versuch beibehalten.

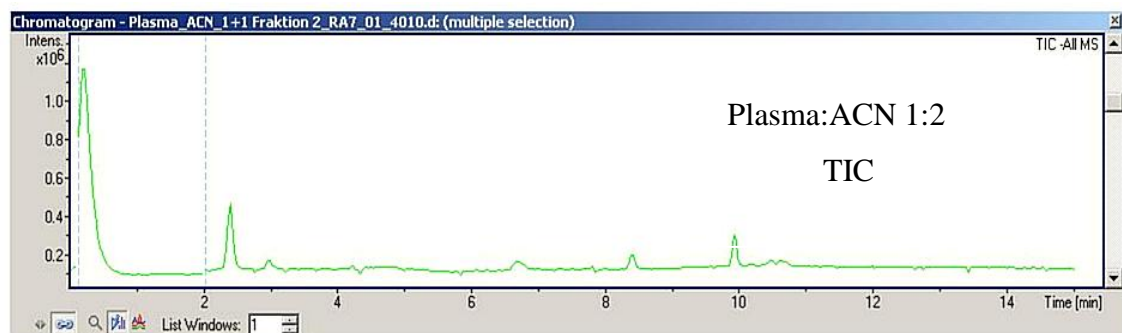


Abbildung 12:Fällung mit ACN

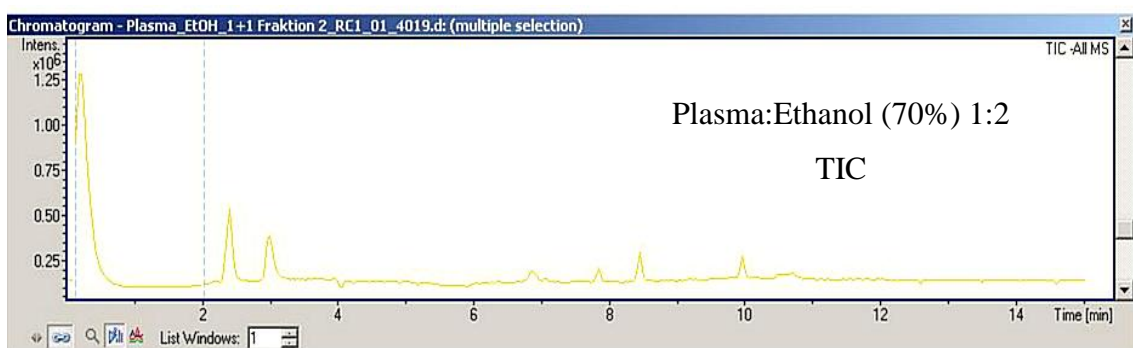


Abbildung 13:Fällung mit Ethanol

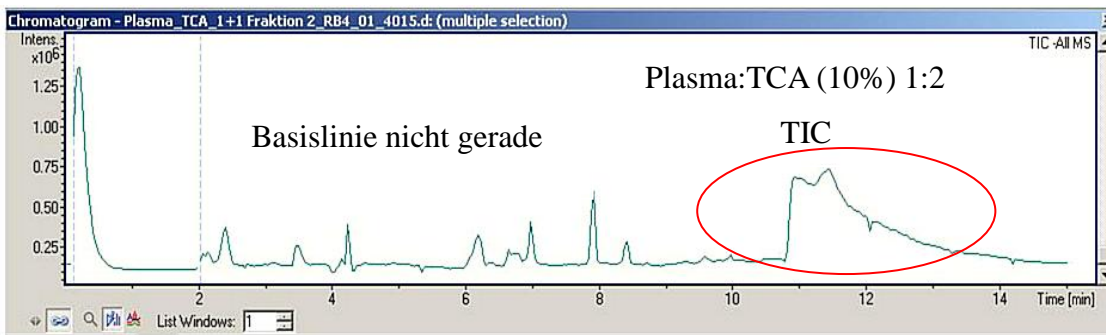


Abbildung 14:Fällung mit TCA

### **4.3.2 Ergebnisse zur Plasmafällung mit Acetonitril anhand der Wiederfindungsrate des 5-MTHF-Spikes**

Auch hier waren die Ergebnisse des Total-Ionen-Chromatogramms (TIC) zufriedenstellend, allerdings fanden sich für den 5-MTHF-Spike zwei Peaks mit der entsprechenden Masse bei unterschiedlichen Retentionszeiten im extrahierten-Ionen-Chromatogramm (EIC).

Bei diesem Versuch wurde wegen des Fällungsmittels Acetonitril keine SPE durchgeführt, da dieses keine Bindung des 5-MTHF-Spikes auf der SPE-Säule zugelassen hätte (Annahme aus Vorversuchen).

Die Verunreinigungen wurden durch eine Sterilfiltration beseitigt. Deswegen ist hier das ganze Probenvolumen in einer großen Fraktion (1550µl/1300µl/1050µl) in die HPLC-MS injiziert worden und als solches hier ausgewertet.

Da weder das extrahierte Chromatogrammbild wegen den zwei Peaks für die Masse 458,17, befriedigend war (siehe Abbildung 15), noch eine gute Wiederfindungsrate des Spikes erreicht wurde, wurde beschlossen mit einer anderen Methode vorzugehen. Es sollte Pankreatin zur enzymatischen Aufspaltung des Plasmaproteins ausgetestet werden (siehe Versuch Kapitel 3.5.1).

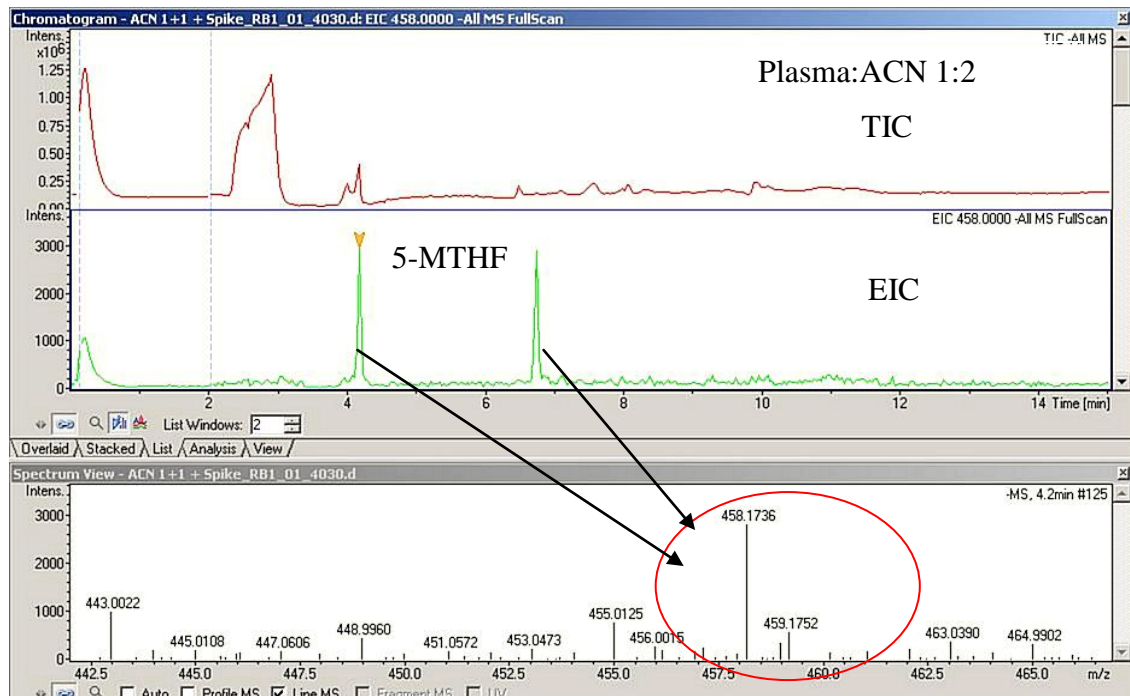


Abbildung 15: LC-MS-Spektrum der Fällung mit 500µl ACN

## 4.4 Stufe 4: Ergebnisse zur Enzymatischen Plasmaproteinaufspaltung mit Pankreatin

### 4.4.1 Ergebnisse zur Bestimmung der Proteaseaktivität im Pankreatin

Mit Hilfe der Standardsubstanz Tyrosin in verschiedenen Konzentrationen wurde anhand deren Extinktionsmessungen eine Standardgerade ermittelt.

Anhand der daraus resultierenden Geradengleichung konnten die unbekanntes Tyrosin-Konzentrationen aus der Spaltung mit Protease bzw. Pankreatin durch das Einsetzen ihrer gemessenen Extinktionen, errechnet werden.

## ERGEBNISSE

**Tabelle 18: Tyrosinstandards**

Tyrosin (mg/ml)	Extinktion (660nm)
0,0013	0,0389
0,0025	0,0711
0,0050	0,1398
0,0100	0,28

**Tabelle 17: Tyrosinkonzentrationen nach enzymatischer Einwirkung**

<i>Berechnet aus Geradengleichung <math>x = (y - 0,0036) / 27,363</math></i>		
Enzymansatz	Extinktion	Konzentration Tyrosin (mg/ml)
Pankreatin (0,2344 mg/ml)	0,2286	0,008

Aus den Tyrosinstandards wurde die Geradengleichung mithilfe einer Standardgerade errechnet (siehe Tabellen 17 und 18).

1 Unit Proteaseaktivität = Menge an Enzym, das 1 µg Tyrosin/ml/min produziert (KANEKAR et al. 2002)

0,025mg Protease produzierten 6 µg Tyrosin/ml/40min durch enzymatischen Abbau von Casein (siehe Tabelle 18). Das heißt, 1 µg Tyrosin würde von 0,167mg Protease pro Minute freigesetzt werden = 1 Unit; **somit hatte 1mg Protease 6 Units Proteaseaktivität.** (Dieses Ergebnis entspricht auch ungefähr der Packungsdeklaration 5,8 Units)

0,2344mg Pankreatin setzten 8 µg Tyrosin/ml/40min aus Casein frei. Das heißt, pro Minute wurden 0,2 µg Tyrosin freigesetzt. 1 µg Tyrosin würde von 1,172mg Pankreatin freigesetzt werden = 1 Unit; **somit hatte 1mg Pankreatin 0,853 Units Proteaseaktivität.**

### 4.4.2 Ergebnisse zur Optimierung der Pankreatinkonzentration für den Plasmaproteinabbau

Es wurden zwei Standardgeraden aus den in den zwei Tabellen angeführten Werten gemacht und die Geradengleichungen wurden daraus berechnet.

Tabelle 19: "kleine" und "große" Proteinstandards

Kleine Protein-Konzentrationen		Große Protein-Konzentrationen	
Albumin (mg/ml)	Extinktion (595nm)	Albumin (mg/ml)	Extinktion (595nm)
0,5	0,49	3	0,71
0,2	0,32	2	0,69
0,1	0,19	1,5	0,67
0,05	0,1	1	0,63
Gleichung: $y = 0,826x + 0,100$		Gleichung: $y = 0,036x + 0,605$	

Abbildung 16: Standardgerade mit "kleinen" Proteinstandards

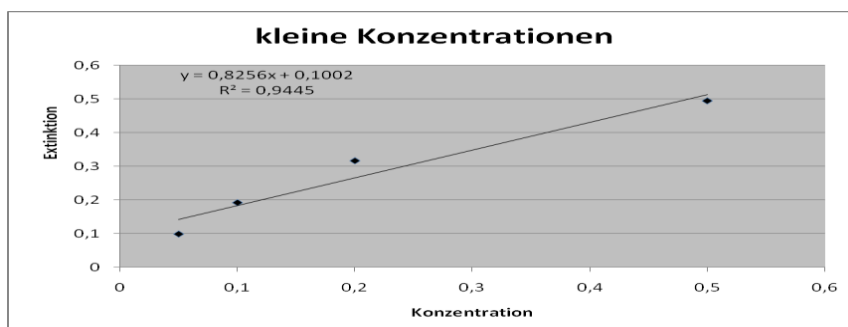
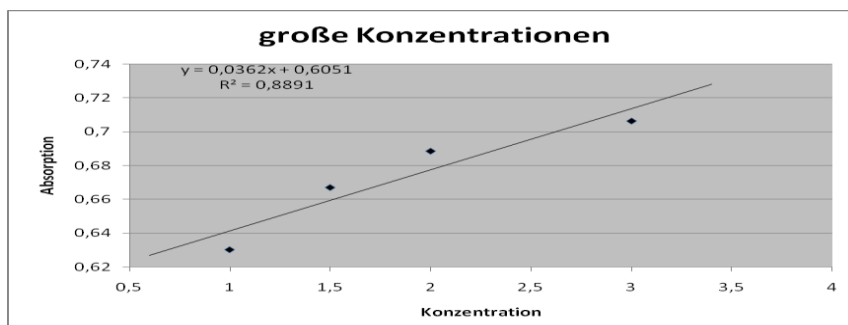


Abbildung 17: Standardgerade mit "großen" Proteinstandards



Mit einer der Geradengleichungen wurde die tatsächliche Konzentration der Ansätze

## ERGEBNISSE

berechnet. Es wurde die Geradengleichung ausgewählt, die von den Extinktionen besser zu den gemessenen Extinktionen der unbekanntenen Plasmaproben passte.

So wurde für die Werte in der ersten unten angeführten Tabelle, bei denen allen noch das Eigenprotein des Enzyms mit erfasst wurde, ausschließlich die Geradengleichung für die große Protein-Konzentrationen verwendet.

**Tabelle 20: Berechnung der Proteinkonzentrationen direkt nach der enzymatischen Inkubation mit der "großen" Geradengleichung**

Proteinansatz	Extinktion (595nm)	Berechnete Konzentration (mg/ml) mit Gleichung $y = 0,036x + 0,605$
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(10mg/ml)	0,987	6,40
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(20mg/ml)	0,988	6,45
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(30mg/ml)	0,995	6,62
500µl Plasma + 1000µl Protease(1mg/ml)	0,959	5,64
Leerwert	Extinktion (595nm)	Berechnete Konzentration mit Gleichung $y = 0,036x + 0,605$
500µl Wasser + 1000µl Pankreatin(10mg/ml)	0,669	0,51
500µl Wasser + 1000µl Pankreatin(20mg/ml)	0,848	2,57
500µl Wasser + 1000µl Pankreatin(30mg/ml)	0,891	3,77
500µl Wasser + 1000µl Protease (1mg/ml)	0,499	0,30

Als nächstes wurden die Extinktionen der jeweiligen Leerwerte von den Extinktionen des dazugehörigen Ansatzes abgezogen (30mg/ml Pankreatin-Leerwert wurde vom Ansatz mit 30mg/ml Pankreatin abgezogen usw.) und die resultierenden Konzentrationen mit der anderen Geradengleichung für kleinere Proteinkonzentrationen berechnet, da nach Abzug des Eigenproteingehaltes der Enzyme nur mehr eine sehr geringe Proteinkonzentration übrig blieb (siehe Tabellen 21 und 22).

## ERGEBNISSE

**Tabelle 21: Abzüge der Enzymleerwerte von den Proteinansätzen**

Minuend	Subtrahend	Ext-Ext	Differenz
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(10mg/ml)	500µl Wasser + 1000µl Pankreatin(10mg/ml)	0,987-0,669	0,318
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(20mg/ml)	500µl Wasser + 1000µl Pankreatin(20mg/ml)	0,988-0,848	0,140
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(30mg/ml)	500µl Wasser + 1000µl Pankreatin(30mg/ml)	0,995-0,891	0,103
500µl Plasma + 1000µl Protease(1mg/ml)	500µl Wasser + 1000µl Protease (1mg/ml)	0,959-0,499	0,460

**Tabelle 22: Berechnung der Proteinkonzentrationen ohne Eigenproteingehalt der Enzyme mit der "kleinen" Geradengleichung**

Ansatz	Differenz der Extinktionen	Berechnete Konzentration (mg/ml) mit Gleichung $y = 0,826x + 0,100$
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(10mg/ml)	0,318	0,26
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(20mg/ml)	0,140	0,05
500µl Plasma + 1000µl Pankreatin(30mg/ml)	0,103	0,00
500µl Plasma + 1000µl Protease(1mg/ml)	0,460	0,44

Aus den so berechneten Endkonzentrationen nach dem Abzug des Eigenproteins der Enzyme ist sichtbar, dass bei der 30mg/ml Pankreatin-Konzentration am wenigsten Plasmaprotein übrigbleibt. Es ist anzunehmen, dass das ganze Plasmaprotein durch das Pankreatin abgebaut wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte in den nachfolgenden Versuchen die 30mg/ml Pankreatin-Konzentration zur Digestion des Plasmaproteins verwendet werden.

### 4.4.3 MS-Ergebnisse zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes nach Plasmainkubation mit Pankreatin

In keinem der 4 Proben ist es gelungen den Folsäurespike zu messen. Obwohl bei jedem Ansatz 3 Fraktionen gesammelt wurden, ist in keinem der Spike als Masse 458,18 (m/z), wie er bei der Spike Blank-Messung vorkommt, gefunden worden.

Es waren allerdings eine Menge zusätzlicher Peaks durch die verschiedenen Plasma- und/oder Pankreatinbestandteile in den Chromatogrammen vorhanden, die nicht durch die SPE aufgereinigt wurden.

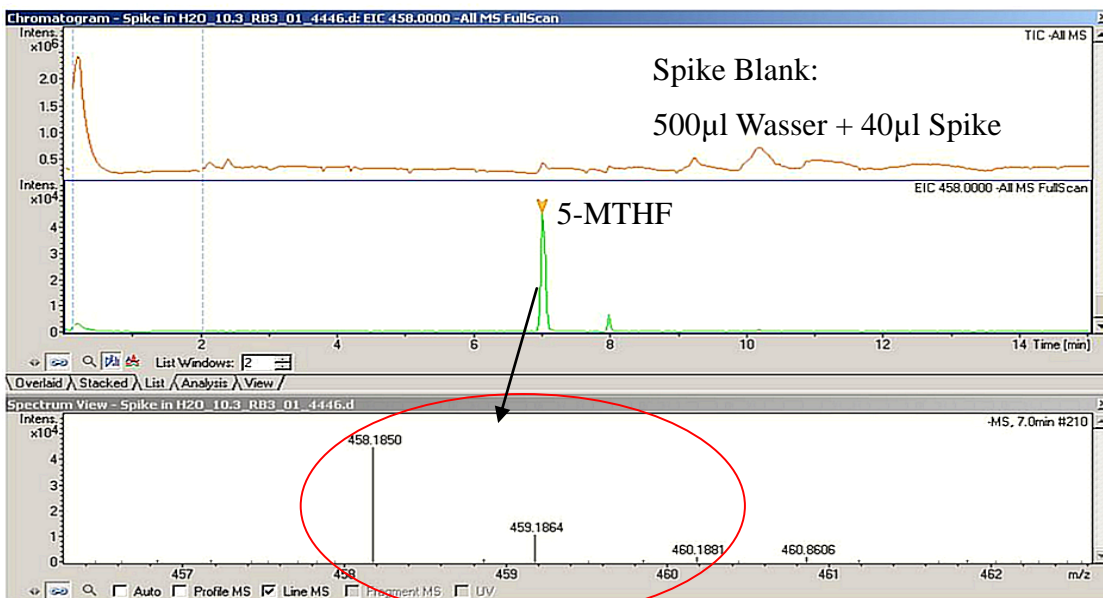


Abbildung 18: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (Spike Blank)

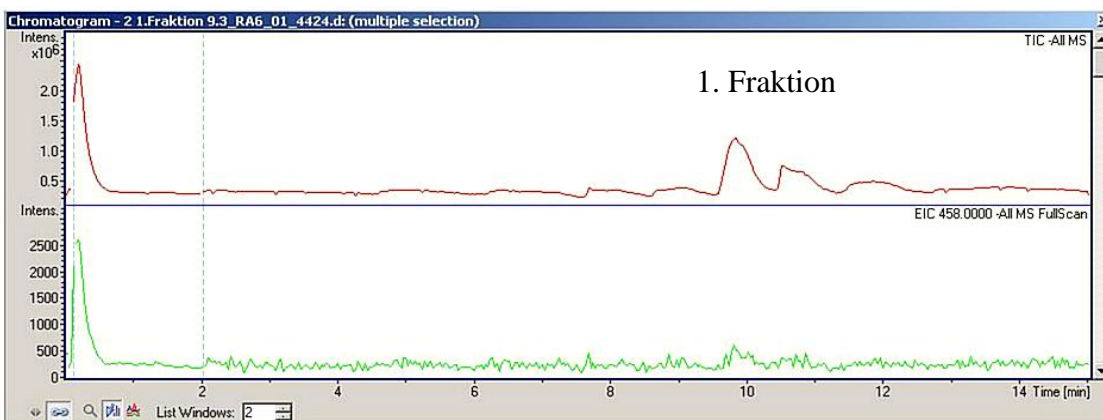


Abbildung 19: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (1. Fraktion)

## ERGEBNISSE

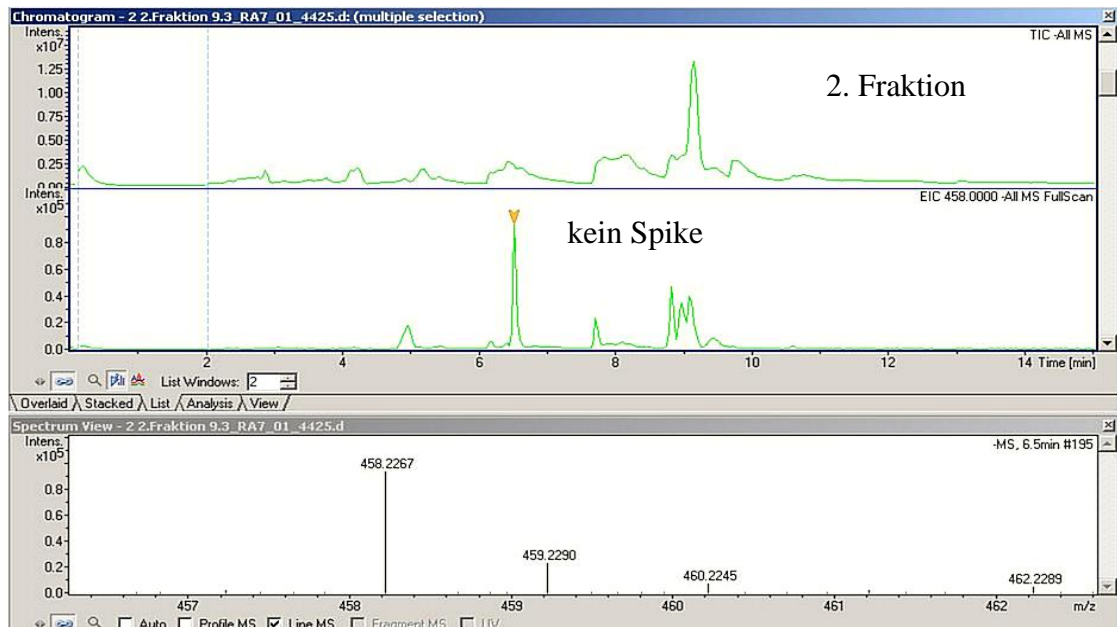


Abbildung 20: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (2. Fraktion)

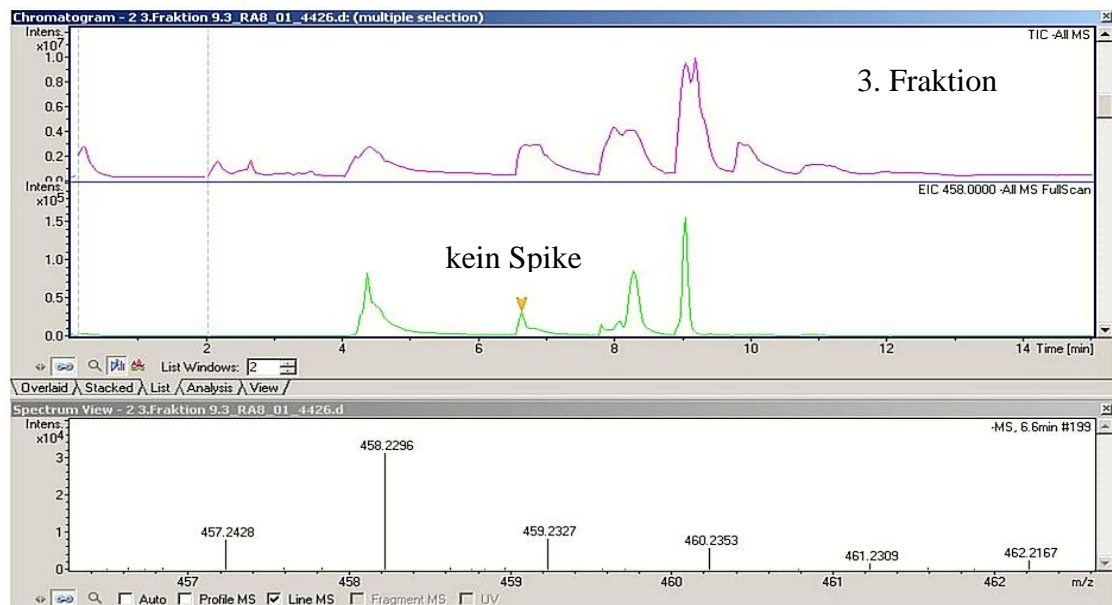


Abbildung 21: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.5.3 (3. Fraktion)

Der 5-MTHF-Spike hatte die Masse 458,18 (m/z) und eine Retentionszeit von 7,0 Minuten. In der 2. und in der 3. Fraktion des Ansatzes ohne zusätzliche Fällung mit TCA gab es Peaks, die zwar eine ähnliche, aber nicht dieselbe Masse hatten (m/z 458,22). Diese Peaks hatten auch eine andere Retentionszeit (6,5 bzw. 6,6 Minuten). Es waren eindeutig keine 5-MTHF-Peaks.

Beim Ansatz mit der Fällung nach der Inkubation wurde auch keine 5-MTHF gefunden.

Anscheinend wurde der zugesetzte Spike durch etwas in der Lösung oder durch einen Vorgang zerstört. Naheliegender ist, dass der Spike bei der SPE Aufarbeitung entweder vorzeitig ausgewaschen wurde, oder nach der Elution trotzdem an der SPE-Säule gebunden blieb. Dazu wurden weiterführende Versuche gemacht (siehe Kapitel 3.5.4)

#### **4.4.4 Ergebnisse zur Wiederfindung des Spikes nach der SPE**

Es wurde von jedem Ansatz mit insgesamt 3 verschiedenen Puffern auch das jeweilige Waschwasser gemessen. Vorwiegend galt es zu erkennen, ob der Spike mit dem Waschwasser ausgewaschen wurde. Hier sind deswegen keine Zahlenwerte angegeben, da die Waschfraktionen nur ungenau gesammelt wurden (keine genauen Volumina waren im Vial drinnen – ca. 1500µl). In der Tabelle wird mittels + (Spike gefunden) und – (Spike nicht gefunden) angegeben, in welcher Fraktion bei welchem Pufferansatz bzw. dazugehörigen Waschwasser der 5-MTHF-Spike gefunden wurde. Waschwasser I enthielt ca. die ersten 1500µl, Waschwasser II dementsprechend die zweiten 1500µl, von insgesamt 3000µl Wasser, das während dem Waschvorgang bei der SPE aufgetragen wurde.

**Tabelle 23: Spikewiederfindung (qualitativ) im Versuch 3.5.4**

<b>Probe (Fraktion)</b>	<b>Spike +/-</b>	<b>Probe (Fraktion)</b>	<b>Spike +/-</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fraktion 1)	-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fraktion 1)	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fraktion 2)	-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fraktion 2)	+
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fraktion 3)	-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fraktion 3)	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fraktion 4)	-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fraktion 4)	-
Waschwasser I	-	Waschwasser I	-
Waschwasser II	+	Waschwasser II	-

## ERGEBNISSE

<b>Probe (Fraktion)</b>	<b>Spike +/-</b>
Sörensen-Puffer (Fraktion.1)	+
Sörensen-Puffer (Fraktion 2)	+
Sörensen-Puffer (Fraktion 3)	-
Sörensen-Puffer (Fraktion 4)	-
Waschwasser I	-
Waschwasser II	+

Beim  $K_2HPO_4$ -Puffer-Ansatz wurde der ganze Spike mit dem Waschwasser ausgewaschen. Die ausgewaschene Menge entsprach ungefähr dem Spike-Blank.

Der Ansatz mit dem  $KH_2PO_4$  -Puffer enthielt den Spike in der ersten und der zweiten Fraktion, allerdings war es nur ein Bruchteil vom eingesetzten Spike. Wahrscheinlich wurde der Spike durch den niedrigen pH zerstört.

Beim neutralen Sörensen-Puffer war sowohl in den ersten zwei Fraktionen Spike auffindbar, der meiste Teil aber im Waschwasser.

Da zum Waschen bei der SPE immer nur Wasser verwendet wurde, wurde in den nächsten Versuchen Waschen mit basischem Puffer ausprobiert, um das Verhalten des Spikes in so einer Waschlösung herauszufinden.

### **4.5 Stufe 5: Übergang auf den basischen Phosphatpuffer**

#### **4.5.1 Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes beim basischen Phosphatpuffer**

Die hier abgebildeten Chromatogramme haben eine andere Retentionszeit für den 5-MTHF-Spike als die vorherig abgebildeten, da ab hier statt der HPLC-Säule Atlantis T3 3 x 150mm x 5 $\mu$ m die Atlantis T3 2.1 x 150mm x 3 $\mu$ m verwendet wurde. Die Retentionszeit für den 5-MTHF-Spike war demnach ab hier 5,3min.

Der 5-MTHF-Spike wurde in der 2. Fraktion gefunden, ein minimaler Teil auch im Waschwasser I, der aber im Vergleich zum Vorversuch vernachlässigt werden konnte.

# ERGEBNISSE

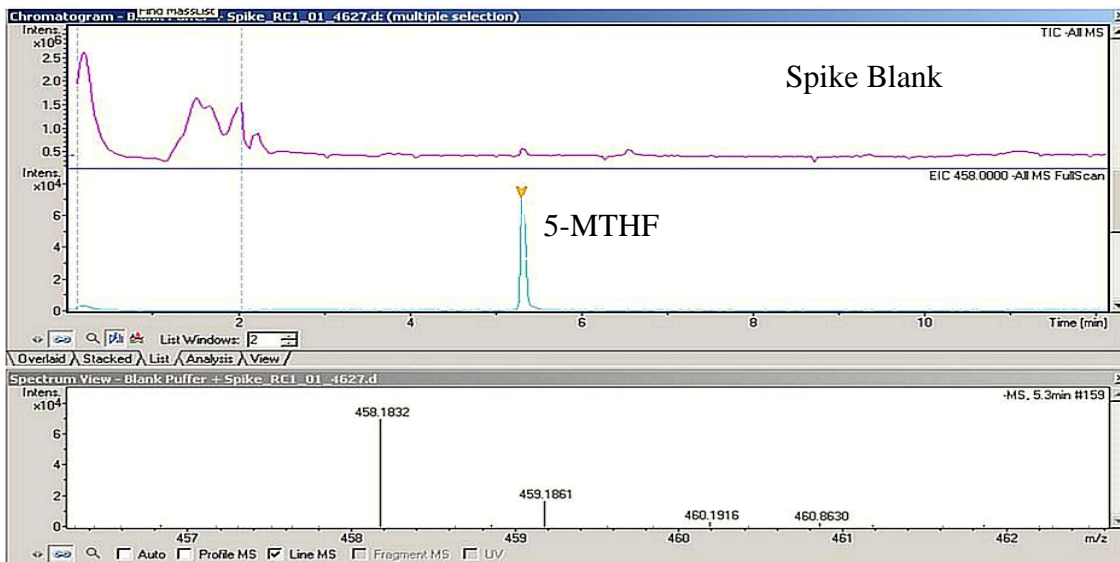


Abbildung 22: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.6.1 (Spike-Blank)

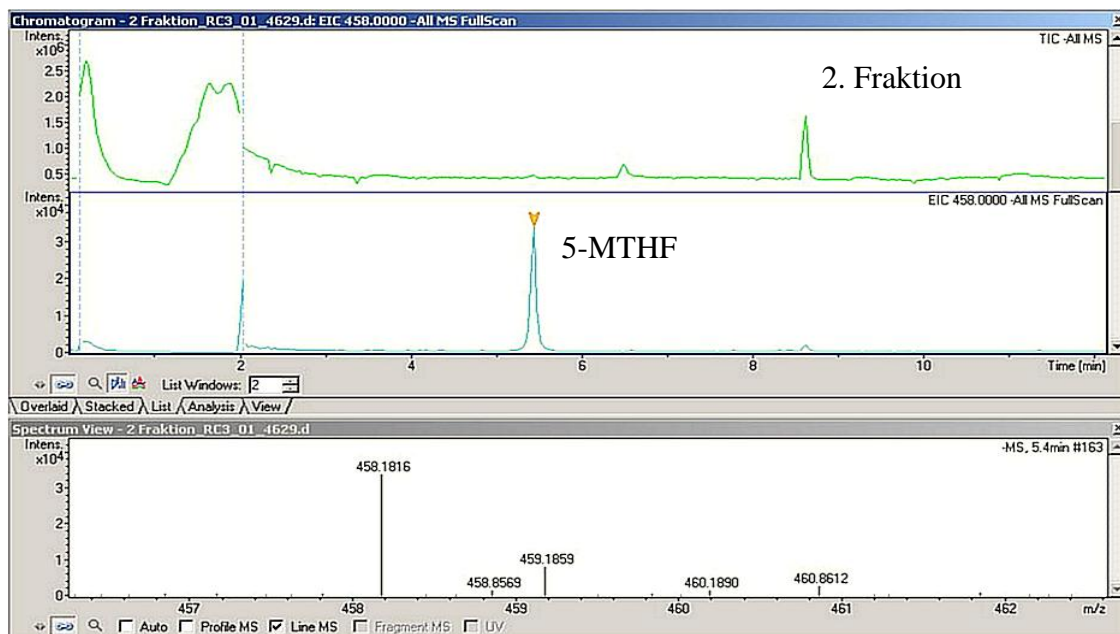


Abbildung 23: LC-MS-Spektrum des Versuches 3.6.1 (2.Fraktion)

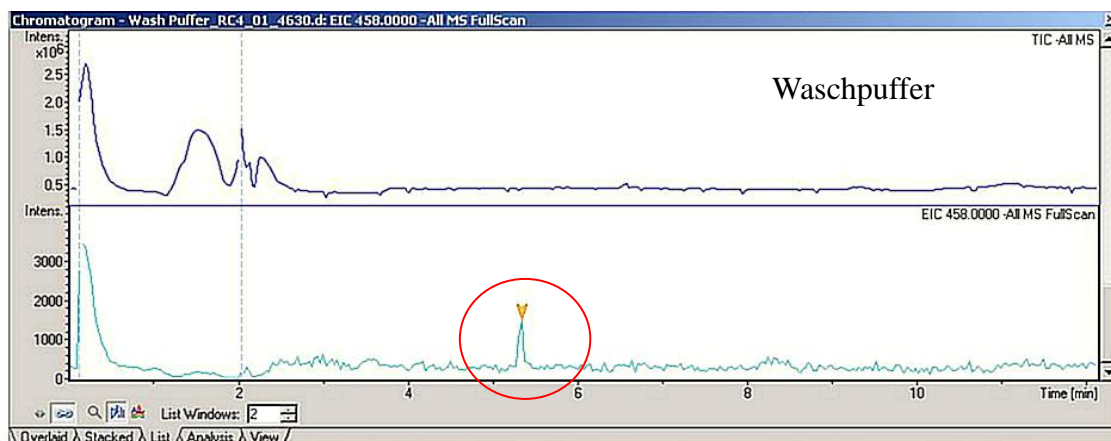


Abbildung 24: LC-Spektrum des Versuches 3.6.1 (Waschpuffer)

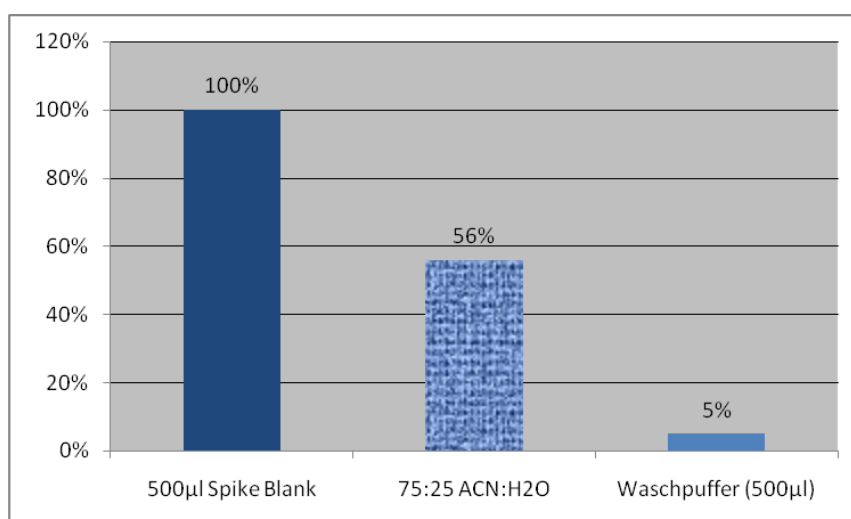


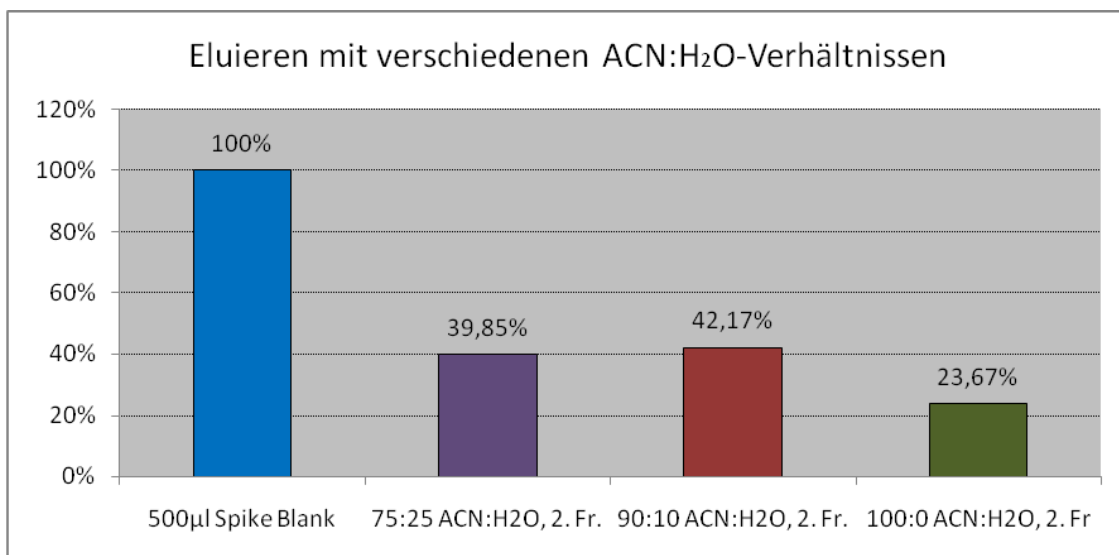
Abbildung 25: 5-MTHF-Wiederfindung im Versuch 3.6.1

Die Wiederfindung des eingesetzten 5-MTHF-Spikes ist, wie im Diagramm ersichtlich, nur zu 56% erreicht worden. Der Waschpuffer, der für die Darstellung von 1500µl auf 500µl umgerechnet werden musste, hat nur einen Bruchteil von dem in der Analyse fehlenden Spike beinhaltet. Es musste getestet werden, inwieweit der Spike auf der SPE-Säule hängen geblieben ist. Im nächsten Versuch (3.6.2) wurden verschiedene Elutionskonzentrationen getestet, mit dem Ziel, ein möglicherweise besseres ACN:H<sub>2</sub>O-Verhältnis für die Spike-Eluierung zu finden.

#### **4.5.2 Ergebnisse zur Optimierung des Acetonitril:H<sub>2</sub>O-Verhältnisses beim Elutionsschritt in der SPE**

Hier werden die Areas aller Fraktionen (500µl), in denen 5-MTHF-Spike vorgekommen ist, graphisch dargestellt, um einen Vergleich mit dem Spike-Blank als Sollwert für die Spike-Wiederfindung zu ermöglichen. Alle Volumina wurden auf eine Einheit zusammengeführt (500µl = Elutionsvolumen), um den direkten Vergleich miteinander darstellen zu können.

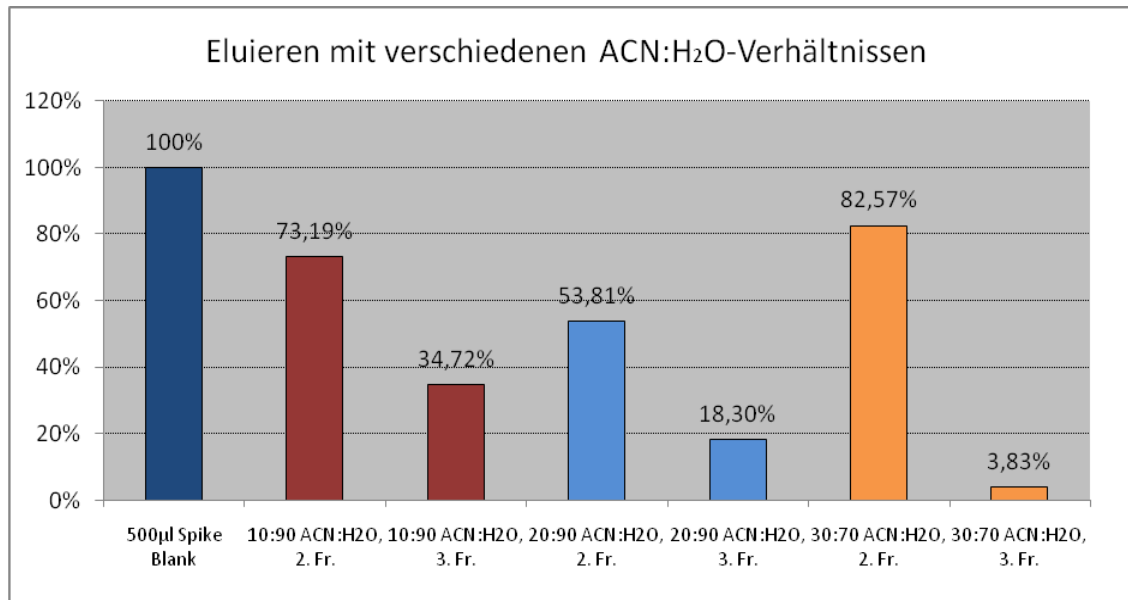
Im Waschpuffer war keine 5-MTHF nachweisbar, sodass diesmal nur die Fraktionen nach der Elution angeführt sind.



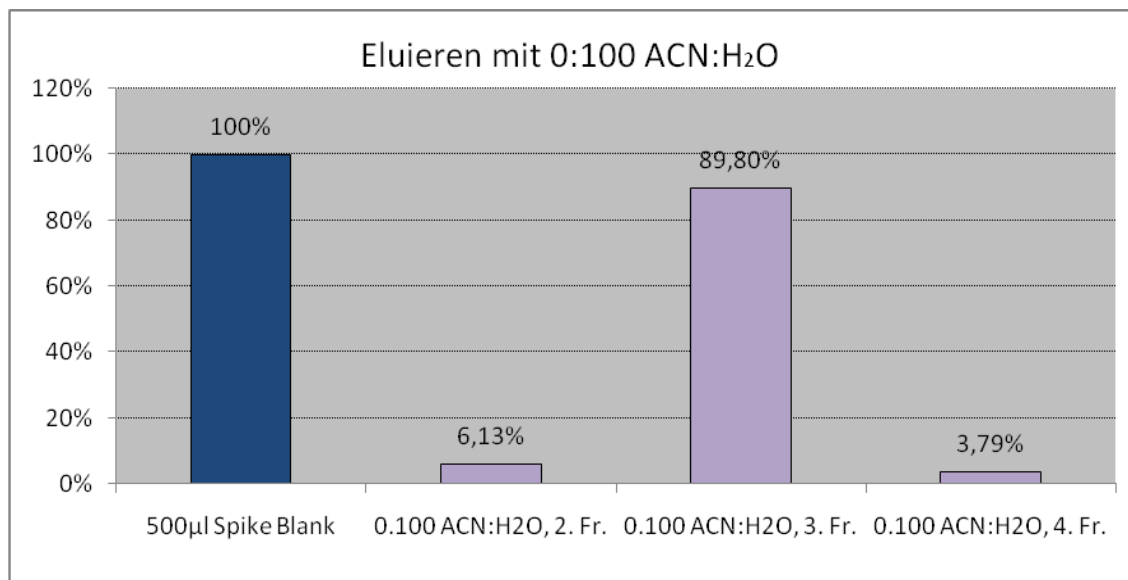
**Abbildung 26: Prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate bei unterschiedlichen Elutionsverhältnissen I**

Je organischer das Elutionsverhältnis der beiden Lösungen war (Zunahme des ACN-Anteils), desto niedriger war die Spikewiederfindung.

Beim Eluieren mit polarereren Elutionslösungen (Zunahme des H<sub>2</sub>O-Anteils), war ein umgekehrtes Phänomen bemerkbar. Diese Resultate widersprachen allerdings der Definition und Durchführung der SPE, die ja mit der Elution durch ein organisches Lösungsmittel beendet wird. (siehe Definition der SPE Kapitel 2.8.6.1)



**Abbildung 27: Prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate bei unterschiedlichen Elutionsverhältnissen II**



**Abbildung 28: Prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindung bei der Elution mit reinem Wasser**

Negativ an so einem wässrigen Elutionsverhältnis ist zu bemerken, dass die Fraktionen größer als 500µl sein müssen, da sich das Eluieren, wie in den Diagrammen verdeutlicht, auf 2 bzw. beim Eluieren mit reinem Wasser sogar auf 3 Fraktionen mit Spikevorkommen ausdehnt.

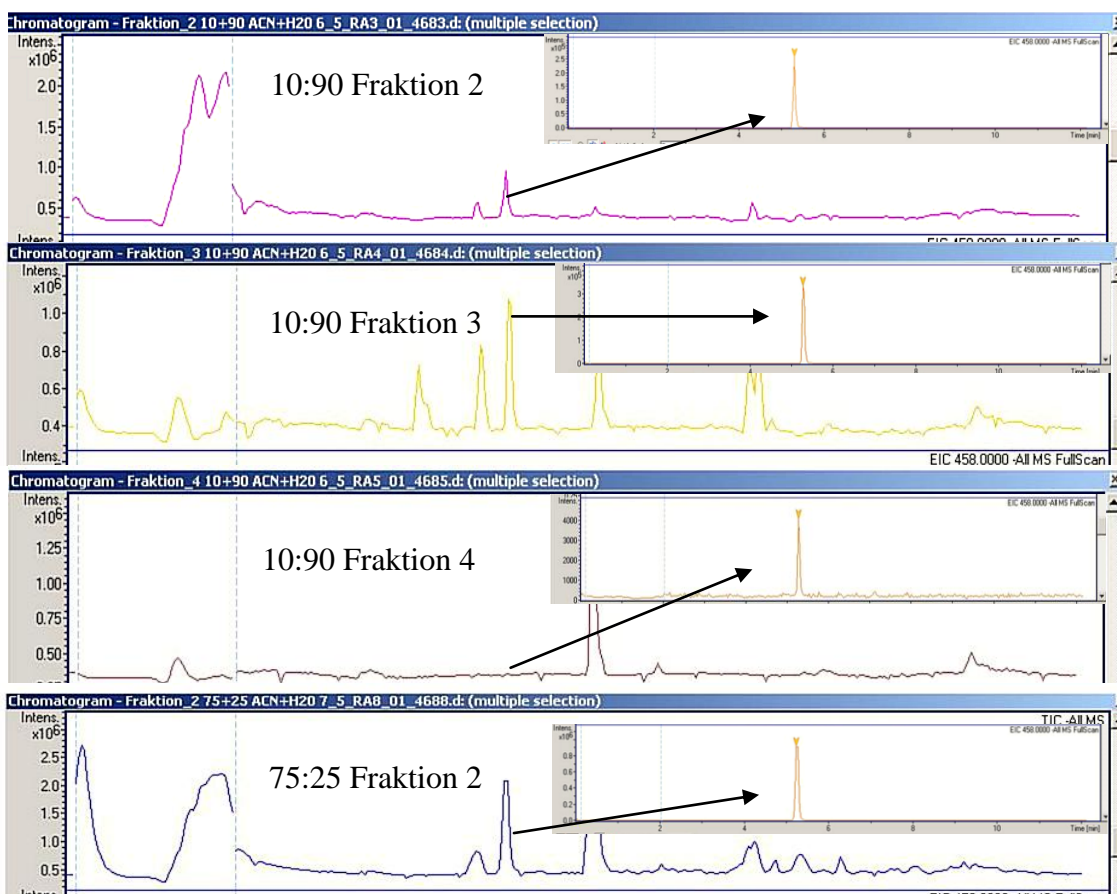
Möglicherweise liegt die Neigung des Eluierens des 5-MTHF-Spikes in wässrigen

Lösungen am Salzcharakter des eingesetzten Spikes (Natriumsalz – siehe Kapitel 2.1 Materialien).

## 4.6 Stufe 6: Ergebnisse zur Plasmaproteinfällung mittels meta-Phosphorsäure

### 4.6.1 Ergebnisse zur von Nelson et al. 2004 entwickelten Methode und Aufkonzentrierung des 5-MTHF-Spikes durch die SPE

Die folgenden Chromatogramme zeigen die Fraktionen von 3ml bzw. 6ml Plasma nach der Fällung mit unterschiedlicher Elution (10:90 ACN:H<sub>2</sub>O, bzw. 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O), in denen 5-MTHF-Spike gefunden wurde.



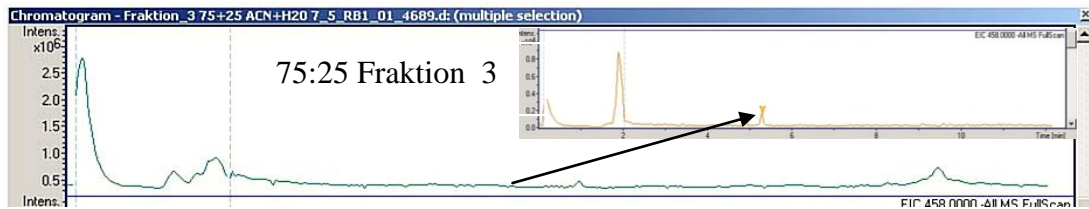


Abbildung 29: LC- und MS-Spektren der Elutionen mit 10:90 und 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O

Die Wiederfindungsraten in Relation zum Spike werden in den Abbildungen 30 und 31 dargestellt:

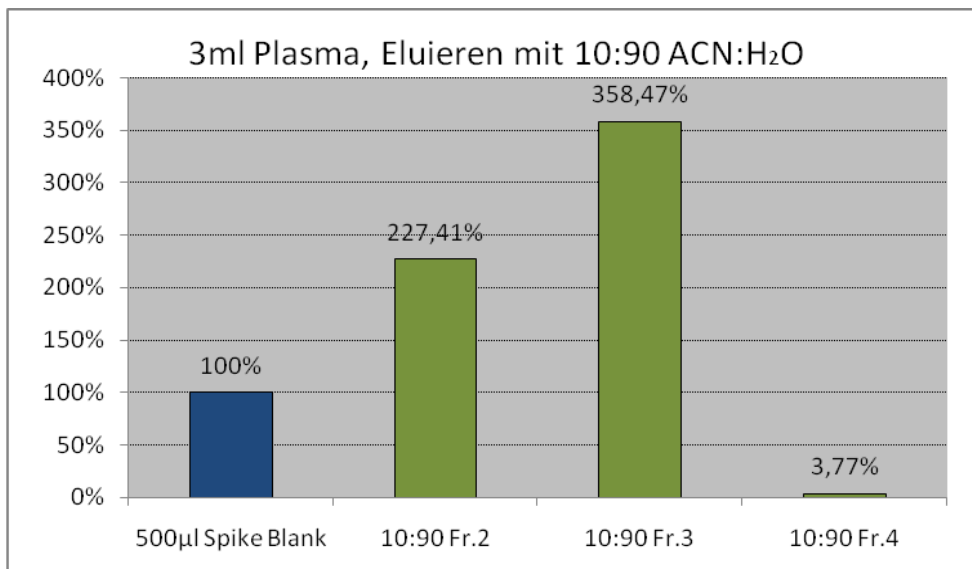


Abbildung 30: prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate in 3ml Plasma beim Eluieren mit 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O

Die Darstellungen zeigen erneut, dass das Eluieren mit 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O zu einer verzögerten Elution über 3 Fraktionen führte, während das Eluieren mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O eine vollständige Elution in zwei Fraktionen gewährleistete, welche auch, wie im nächsten Versuch (3.7.2 und 4.6.2) dargestellt, zu einer einzigen Fraktion reduziert werden konnte.

Die erwarteten 6 bzw. 12-fachen Aufkonzentrierungen wurden in beiden Fällen erreicht. Die Methode nach Nelson et al. schien eine relativ sensible Methode zu sein, die hier auch weiter angewendet werden sollte. Beide Elutionsmethoden haben anscheinend den gesamten Spike eluiert, im Fall des 75:25 Verhältnisses war der Spike sogar über

## ERGEBNISSE

dem zu erwartendem Wert, was auf das plasmaeigene Folat hinweisen könnte. Deswegen wurde entschieden, mit der 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O Elutionslösung fortzufahren, da diese anscheinend besser mit plasmainterner 5-MTHF korrespondierte.

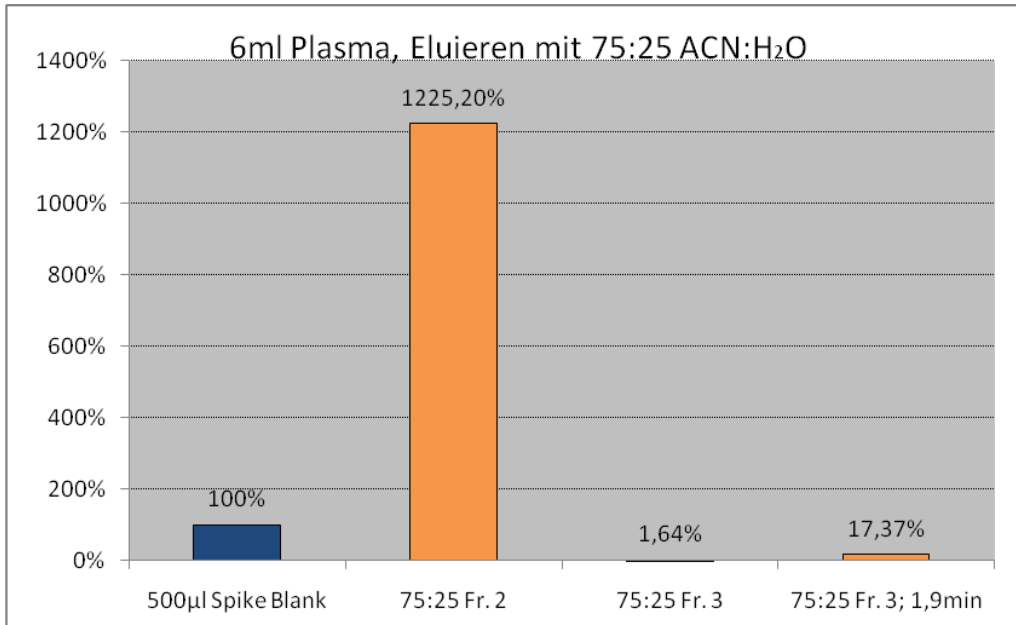


Abbildung 31: prozentuelle 5-MTHF-Wiederfindungsrate in 6ml Plasma beim Eluieren mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O

### 4.6.2 Ergebnisse zur Einstellung des Elutionsvolumens

In den folgenden Chromatogrammen werden jeweils die 2. und die 3. Fraktion in ihren 100µl Zwischenschritten dargestellt, und vermerkt, in welchem Zwischenschritt 5-MTHF gefunden wurde. Die Summe aller 100µl Zwischenschritte, die den Spike enthielten, wurde als neues Fraktionsvolumen ausgewählt. Die 100µl Zwischenschritte, die vorher oder nachher eluiert wurden, wurden in Zukunft verworfen.

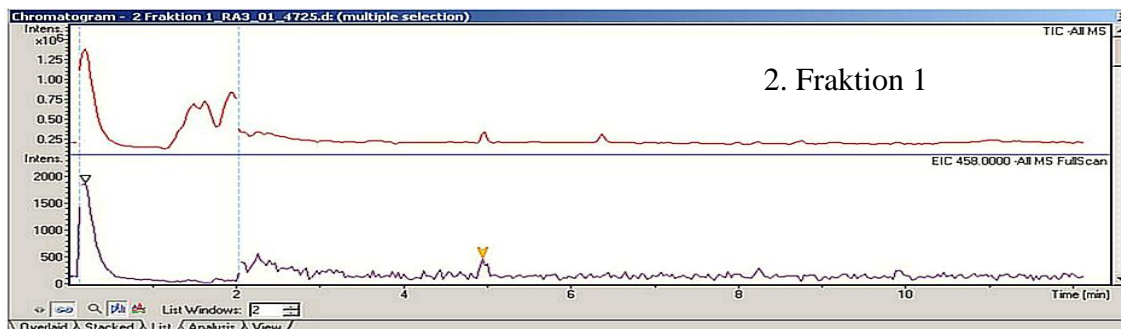
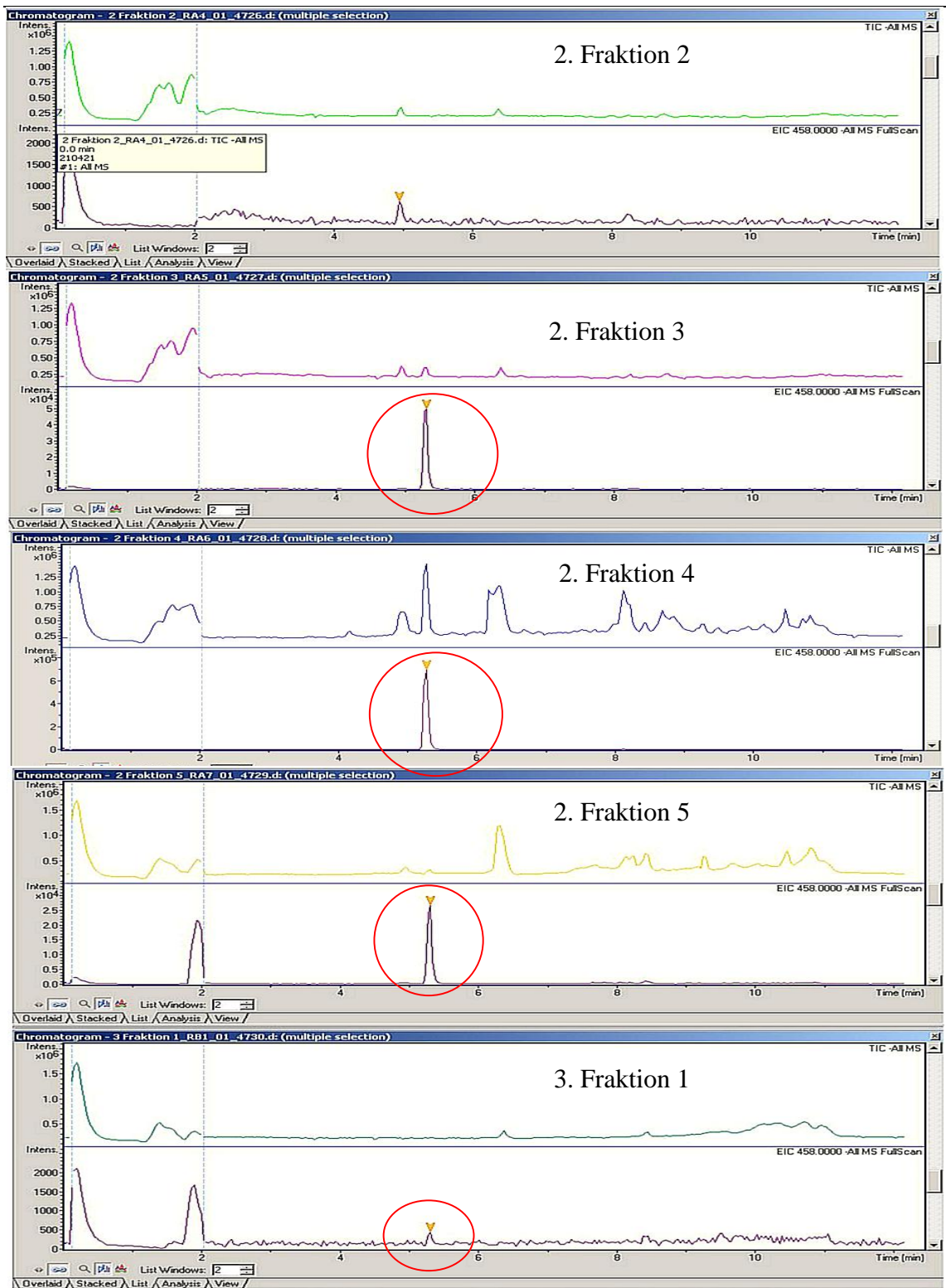


Abbildung 32: LC-MS-Spektren zur Ermittlung des optimalen Elutionsvolumens

# ERGEBNISSE



Eine daraus ermittelte optimale Fraktionsgröße wäre 400 $\mu$ l. Das heißt die ersten 200 $\mu$ l der 2. Fraktion könnten zusammen mit der ersten Fraktion eluiert werden

### 4.6.3 Ergebnisse zur Überprüfung der Einstellung der Fraktionsgröße anhand verschiedener Plasma- und Spikevolumina

Da im letzten Versuch die optimale Fraktionsgröße von 400µl eingestellt wurde, sollte hier überprüft werden, ob der eluierte Spike tatsächlich nur in diesen 400µl vorkommt. Anhand der Diagramme wurde graphisch dargestellt, wie sich die einzelnen Fraktionen jeweils zum Spike verhielten.

Es sollten theoretisch verschiedene Anreicherungen stattgefunden haben. Bei 1ml Plasmavolumen wurde eine 2-fache Anreicherung erwartet. Wie in den ersten 2 Diagrammen gezeigt wird, wurde diese Anreicherung beinahe erreicht.

Das Diagramm in welchem die jeweiligen Areas dargestellt werden, zeigt die Fläche des Chromatogramm-Peaks korrespondierend zur Konzentration für die gefundene 5-MTHF. Es wurden Spike-Blank und die 3 verschiedenen Plasmaansätze, immer in der 2. Fraktion, da hier die Hauptausbeute an Spike war, verglichen.

Das dazugehörige zweite Diagramm zeigt die direkte Relation zwischen Spike-Blank und dazugehörigem Ansatz in Prozent und ermöglicht somit die Erkennung der Anreicherungsrate auf einen Blick.

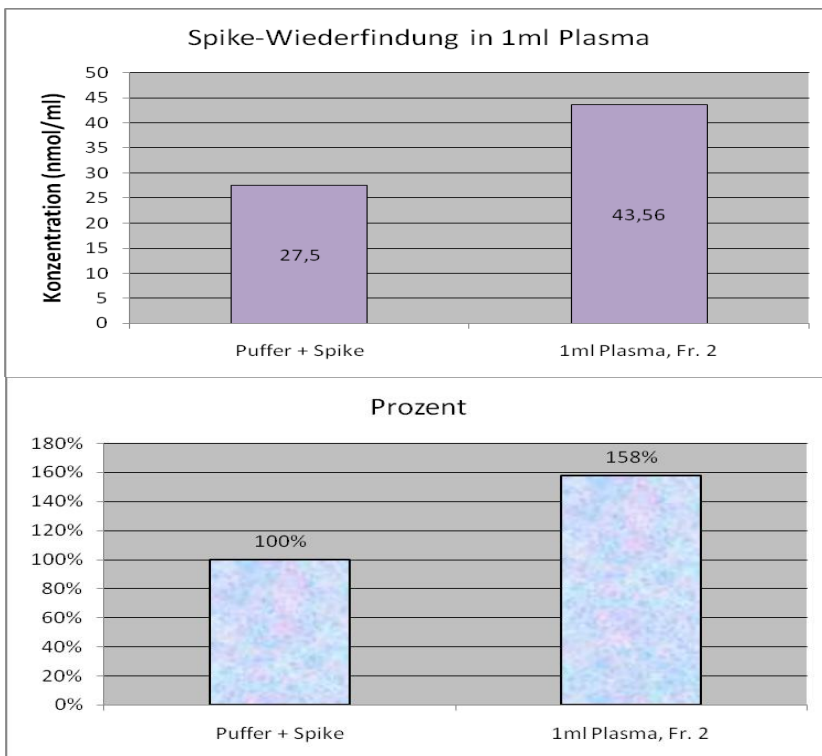
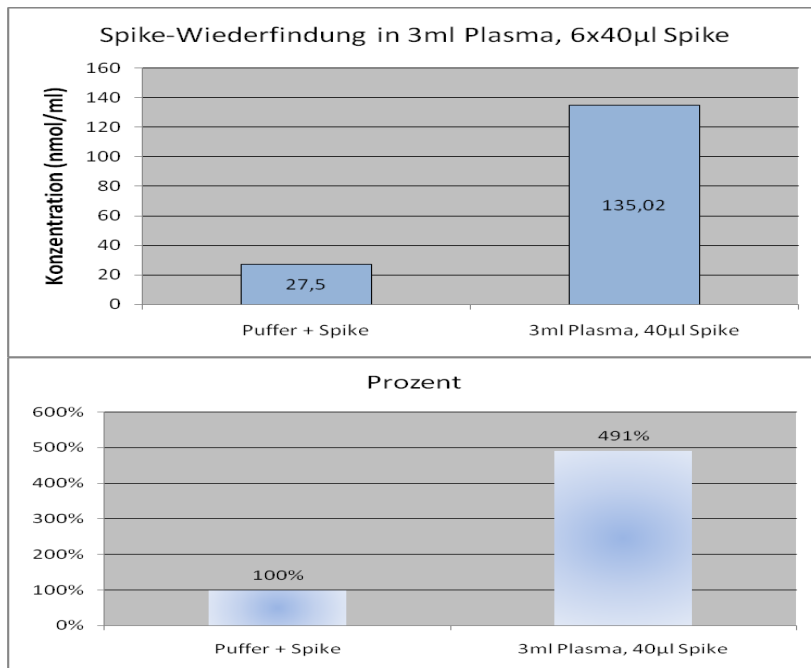


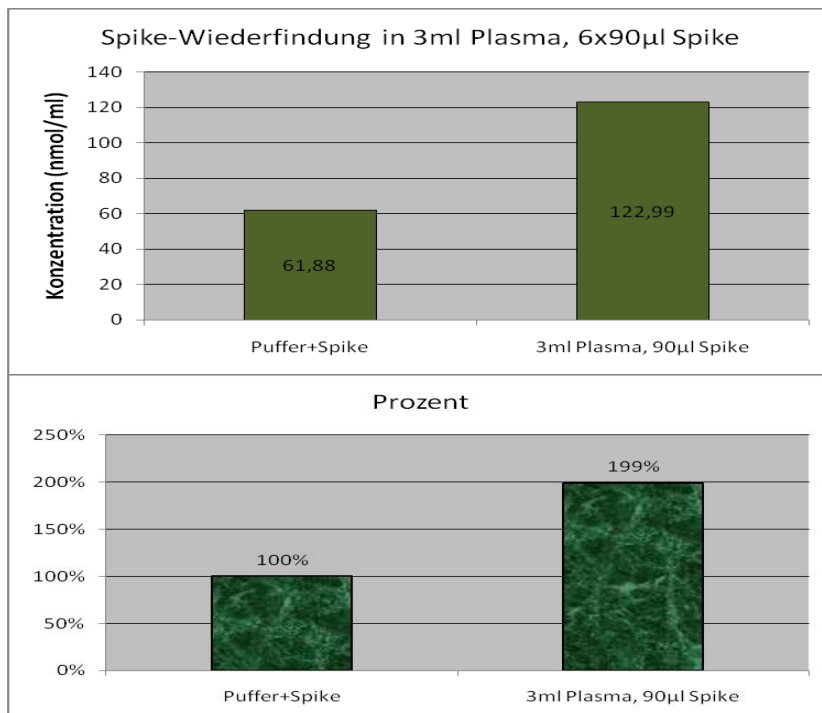
Abbildung 33: 5-MTHF-Wiederfindungsrate in 1ml Plasma

## ERGEBNISSE

Bei den beiden 3ml Ansätzen wurde eine 6-fache Anreicherungsrate von 5-MTHF erwartet. In einem Fall wurde die 5-fache Rate erreicht (Zugabe von 40µl Spike), im anderen Fall (Zugabe von 90µl Spike) nur ein Drittel des erwarteten Wertes.



**Abbildung 34: 5-MTHF (40µl)-Wiederfindung in 3ml Plasma**



**Abbildung 35: 5-MTHF (90µl)-Wiederfindung in 3ml Plasma**

## 4.7 Stufe 7: Ergebnisse zur Kombination von eingestellter Fraktionsgröße, Fällungsmethode mit meta-Phosphorsäure und den enzymatischen Methoden

### 4.7.1 Ergebnisse zur Inkubation von Plasma mit Pankreatin/Protease mit dem verkleinerten SPE-Elutionsvolumen

Unglücklicherweise wurde hier genauso wie bei allen vorigen Versuchen mit Plasma und Enzymen in Kombination kein 5-MTHF-Spike gefunden.

In den nachfolgenden Versuchen sollte herausgefunden werden, bei welchem Schritt der 5-MTHF-Verlust genau passiert.

### 4.7.2 Ergebnisse zu den Versuchen zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes

Die Kombinationen mit Plasma, Spike und Pankreatin ergaben keine positiven Ergebnisse. In diesen Fällen wurde kein Spike wieder gefunden.

Es wurde nur im Puffermilieu ein gewisser Anteil an Spike wieder gefunden. In den zwei Diagrammen wird das Verhältnis Spike Blank, inkubierter und aufgereinigter Spike und mit Puffer und Pankreatin inkubierter und aufgereinigter Spike dargestellt.

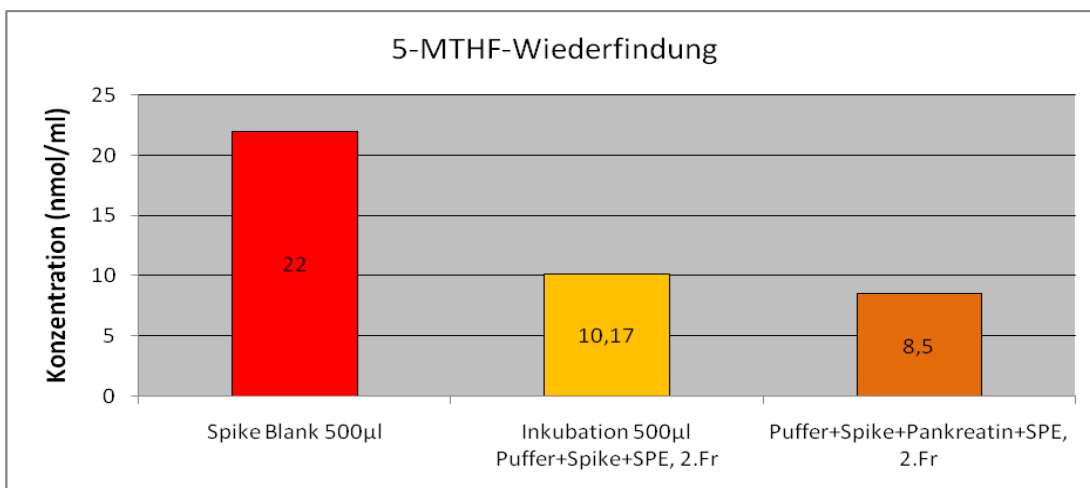
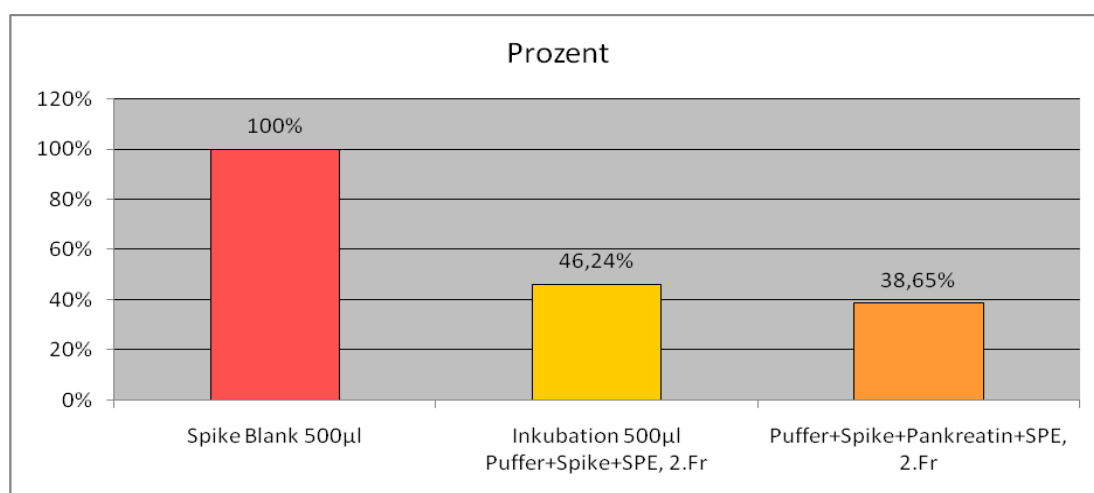


Abbildung 36: Vergleich der Spike- Spikewiederfindung nach Inkubation mit und ohne Pankreatin

## ERGEBNISSE



**Abbildung 37: prozentueller Vergleich der Spike- Spikewiederfindung nach Inkubation mit und ohne Pankreatin**

Durch die Temperatur (37°C) oder durch das Pankreatin beim Inkubieren, wurde anscheinend ein großer Teil des Spikes zerstört. Bei den Ansätzen mit Plasma ist überhaupt der ganze eingesetzte Spike verschwunden oder in eine unerkennbare Form (andere Masse als  $m/z$  458,18 oder die üblichen Metaboliten) umgewandelt worden.

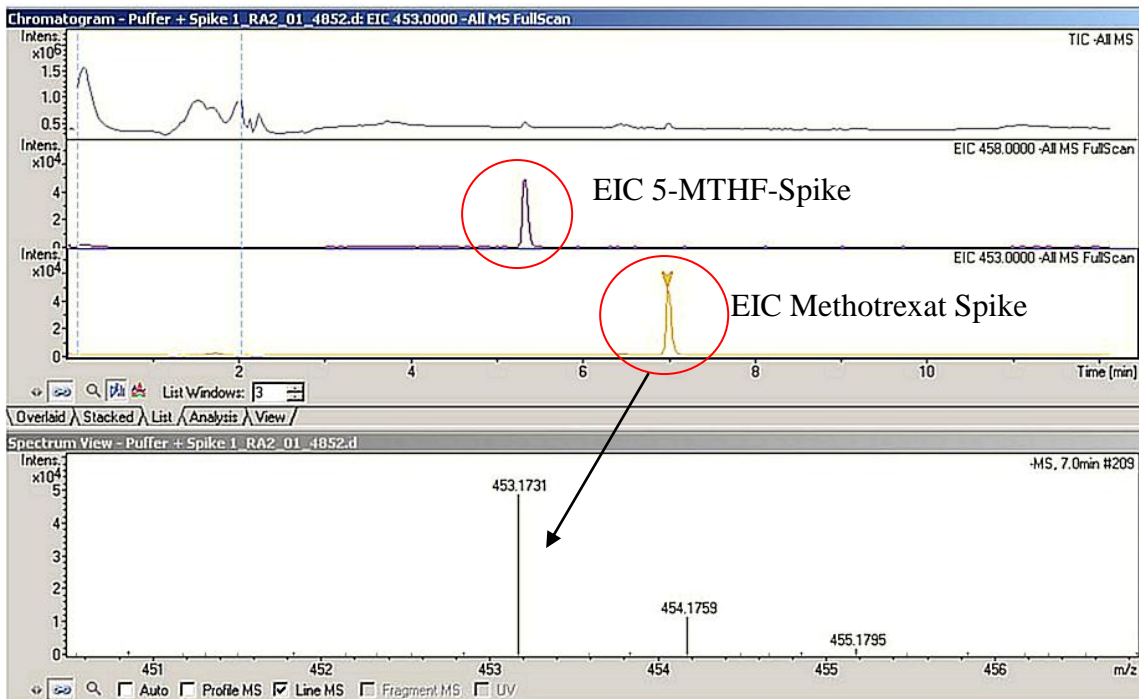
### **4.7.3 Ergebnisse zur Wiederfindung des 5-MTHF-Spikes und des Methotrexat-Spikes**

Methotrexat, als neuer Spike zu den Lösungen zugesetzt, hatte auch eine Veränderung des Totalionenstroms zur Folge: einerseits wurde 5-MTHF detektiert und andererseits Methotrexat, die in derselben Probe enthalten waren. Die detektierte Masse des Methotrexates war bei  $m/z$  453,17 bei einer Retentionszeit von 7,0 Minuten.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Areas (Flächen der Peaks aus den LC/MS-Chromatogrammen) von den zwei Spike-Blanks (5-MTHF und Methotrexat) im Vergleich zur Spike-Wiederfindungsrate in den verschiedenen Ansätzen.

Die Ansätze unterschieden sich untereinander in der Verwendung und nicht Verwendung der SPE als Aufreinigungsschritt und Verwendung der Enzyme Protease bzw. Pankreatin.

## ERGEBNISSE



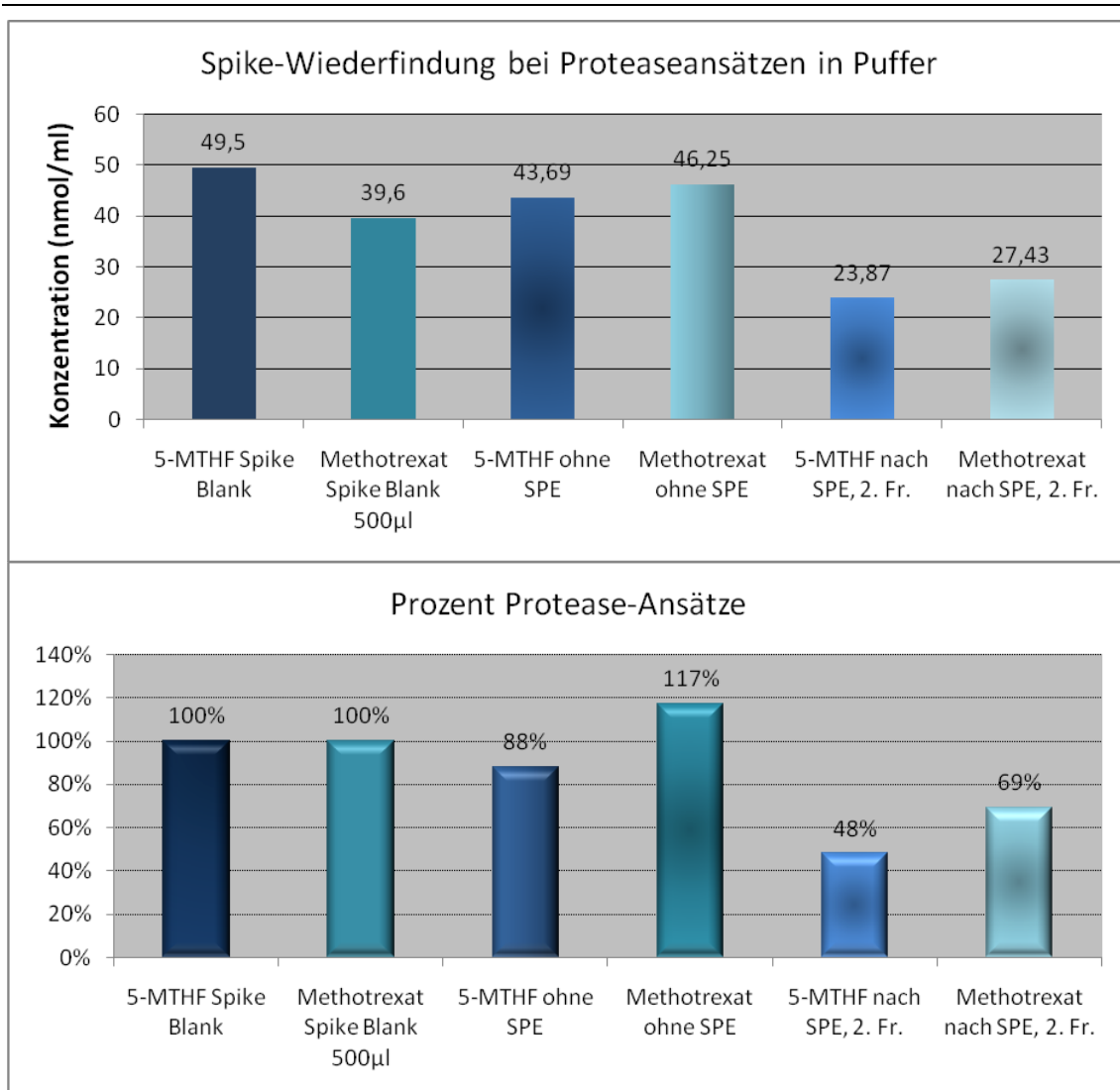
**Abbildung 38: LC-MS-Spektren von den 5-MTHF und Methotrexat-Spikes**

In allen Ansätzen, in denen Plasma, Pankreatin/Protease und Spike vermischt wurden, ist kein Spike wieder gefunden worden.

Dementsprechend beziehen sich diese Balkendiagramme auf die Wiederfindungsraten im  $K_2HPO_4$ -Puffer. Es ist deutlich zu sehen, dass die Areas, die sich direkt proportional zur Spikekonzentration verhalten, ohne die SPE um beinahe das Doppelte höher sind als bei der SPE-Anwendung im selben Ansatz. Das bedeutet, dass die SPE auf jeden Fall eine negative Auswirkung auf den Spike hatte.

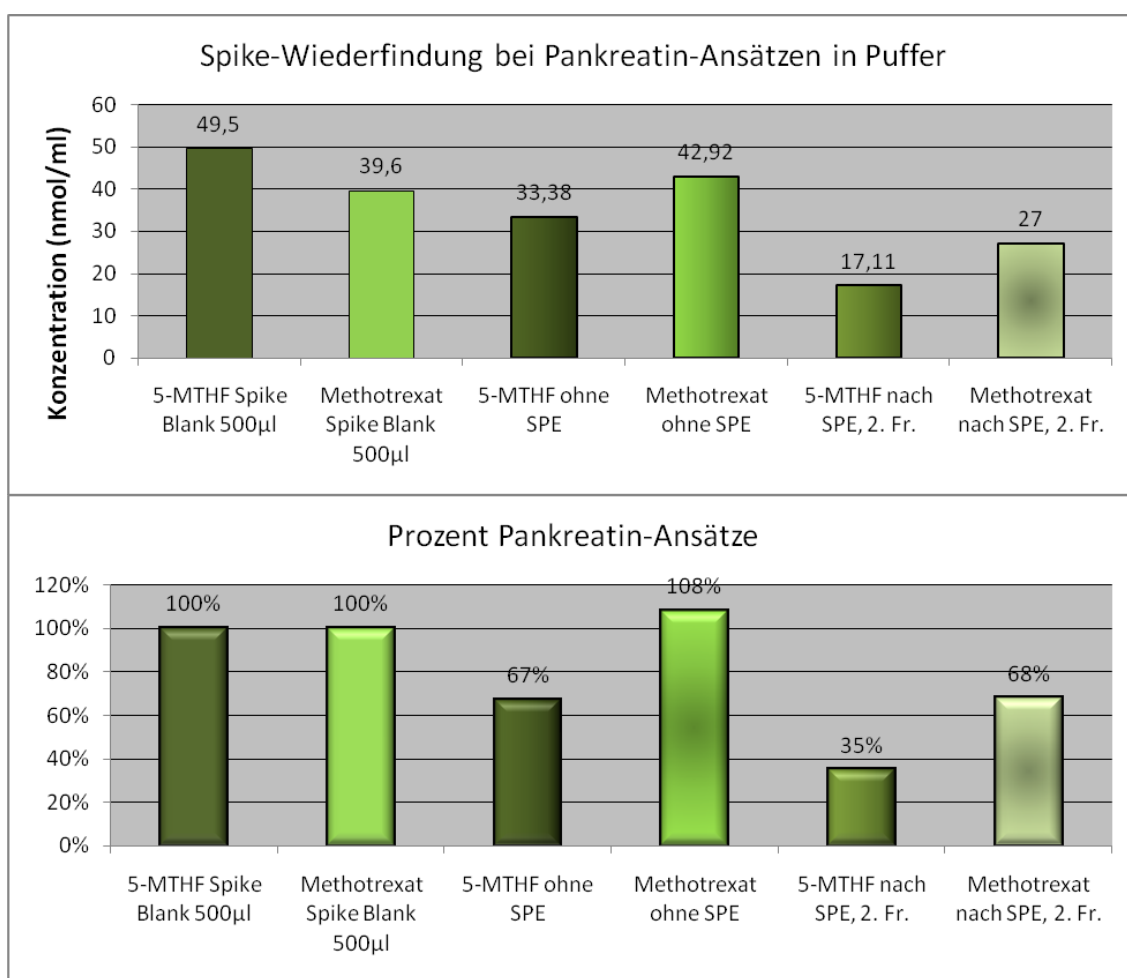
Die beiden Protease- und Pankreatinansätze verhielten sich mit der Wiederfindungsrate beider Metaboliten ungefähr gleich. Vor der SPE wurden die Spikes relativ vollständig wiedergefunden, nach der SPE war der Prozentsatz um ca. die Hälfte kleiner. Möglicherweise lag es an der Inkubation mit den Enzymen, die dann bei der SPE die Elution verhindert haben.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 39: 5-MTHF- und Methotrexat- Wiederfindung mit und ohne SPE nach der Proteaseeinwirkung im Puffer**

## ERGEBNISSE



**Abbildung 40: 5-MTHF- und Methotrexat- Wiederfindung mit und ohne SPE nach der Pankreatineinwirkung im Puffer**

## 5 DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG

### 5.1 Problematik der Proteinkonzentrationsermittlung nach der Inkubation mit Protease/Pankreatin

Mit dem Ziel zu ermitteln, ob die Enzymbehandlung für den Proteinabbau des Plasmas ausreichend war (Zeitfaktor, Konzentrationsfaktor des Enzyms), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Die Frage nach der Aussagekraft einer solchen Proteinbestimmung stellte sich schon bald, denn in der getesteten Probe war auch das Enzym enthalten, das für die Proteinabspaltung verantwortlich war und konnte aus der Lösung nicht quantitativ entfernt werden, ohne dass das möglicherweise restliche Plasmaprotein in der Lösung auch mitzerstört wurde (Kochen nach Inkubation, SPE).

Deswegen wurde entschieden, eine Leerwertbestimmung des Enzyms zu machen. Es wurde dieselbe Verdünnung wie bei dem getesteten Plasmaprobengemisch hergestellt, nur dass hier Wasser statt Plasma das restliche Volumen darstellte. Somit konnte der Leerwert gemessen werden, allerdings stellte sich die Frage nach der Richtigkeit eines nachfolgenden Abzuges des Leerwertes von der Probe, die dadurch Proteinkonzentrationen unter Null erreichte. Die Proteinkonzentrationen waren aber auch unter Null, wenn direkt nach dem Inkubieren die Probelösung gekocht wurde ( $-0,25\text{mg/ml}$ ;  $-0,23\text{mg/ml}$ ), um das Enzym zu zerstören, bzw. nach der SPE ( $MW -0,15$ ). Deswegen wurde entschieden die so berechneten Leerwertabzüge als richtig zu werten und den Proteinabbau als vollständig zu erachten.

Bemerkenswert war, dass sich verschiedene Inkubationslängen (1h und 4h) mit Protease nicht signifikant mit abgefallener Proteinkonzentration nach 4 stündigen Inkubation bemerkbar gemacht haben (*Plasma+Protease nach 1h Ink.: 1,08mg/ml; 1,28mg/ml; nach 4h Ink.: 1,32mg/ml; 1,18mg/ml*), was anscheinend ein weiteres Indiz für die Vollständigkeit des Proteinabbaus in der Testlösung war.

Für die Optimierung der Pankreatinkonzentration für den Plasmaproteinabbau ist noch die Erkenntnis dazugekommen, dass die Albuminstandards für die Ermittlung der

## DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG

---

Geradengleichung ab einer gewissen Konzentration nicht mehr linear verlaufen und somit eine Standardgerade nicht ausreicht, um höhere Proteinwerte, wie die des Pankreatins, zu erfassen, da die Extinktionen der Albuminkonzentrationen bei höheren Werten leicht flach verlaufen. Deswegen wurde bei diesem Versuch eine zweite Standardgerade für höhere Konzentrationen, die dem Plasma direkt nach der Inkubation mit zugesetztem Pankreatin entsprachen, gemacht (siehe Versuch Kapitel 3.5.2 und 4.4.2). Es gab also zwei verschiedene Standardgeraden mit zwei verschiedenen Geradengleichungen. *Gleichung 1 (kleinere Konzentrationen):*  $y = 0,826x + 0,100$  und *Gleichung 2 (größere Konzentrationen):*  $y = 0,036x + 0,605$

Wenn gemessene Extinktionen von verschiedenen Proteinansätzen, gemischt mit Pankreatin, in Konzentration Protein umgerechnet werden sollten, dann wurden die Extinktionen in die Gleichung 2 eingesetzt.

Nachdem die Extinktion des Pankreatin-Leerwertes abgezogen wurde, wurde die resultierende Endkonzentration durch das Einsetzen der Extinktionsdifferenz in die Geradengleichung für kleinere Konzentrationen errechnet. Daraus resultierten nun folgende Proteinkonzentrationen für den tatsächlichen Proteinrückstand in den verschiedenen Ansätzen ohne den Eigenproteingehalten des Pankreatins/der Protease: *Plasma Ink. mit Pankreatin(10mg/ml), 1h: 0,26mg/ml; Plasma Ink. mit Pankreatin(20mg/ml), 1h: 0,05mg/ml; Plasma Ink. mit Pankreatin(30mg/ml): 0,00mg/ml; Plasma Ink. mit Protease(1mg/ml): 0,44*

Anders verhielt es sich mit den Konzentrations-Ergebnissen, wenn die entsprechenden, aus den Extinktionen mit der Geradengleichung 2 errechneten Konzentrationen, voneinander (Konzentration von Plasmaansatz mit Enzym direkt nach der Inkubation und Konzentration des Leerwertes) abgezogen wurden. Die Werte waren viel höher und gar nicht ähnlich den Konzentrationen, die aus den Extinktionssubtraktionen errechnet wurden. (*Plasma Ink. mit Pankreatin(10mg/ml) 6,40-0,51 = 5,89; Plasma Ink. mit Pankreatin(20mg/ml) 6,45-2,57= 3,88; Plasma Ink. mit Pankreatin(30mg/ml) 6,62-3,77= 2,85; Plasma Ink. mit Protease(1mg/ml) 0,445,64-0,30= 5,34*)

Trotzdem wurden die aus den Extinktionsdifferenzen gebildeten Proteinkonzentrationen als richtig erachtet, weil die aus der Geradengleichung 2 resultierenden Proteinkonzentrationen ja nur Annäherungen an eine Gerade waren, die in Wirklichkeit nicht existierte, da die Werte nicht linear anstiegen. Die Gerade bildete in dem Fall nur

eine mittlere Annäherung an alle Punkte, die weit von der Gerade entfernt waren (siehe Abbildung 17).

## 5.2 Problematik des Einsatzes von verschiedenen Puffern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Puffer ausprobiert, um einerseits die Protease/Pankreatinwirksamkeit zu gewährleisten, andererseits um eine möglichst niedrige Zerstörung des 5-MTHF-Spikes zu verursachen. Der Puffer wurde als Lösungsmittel für das Enzym verwendet und stellte sich schon ziemlich am Anfang als essentiell für die Spikewiederfindung heraus (siehe Versuch Kap.3.3.1 und Ergebnisse 4.2.1).

Es stellte sich die Frage, welcher Puffer für die Inkubation am geeignetsten war, sodass alle Parameter berücksichtigt wurden.

Im Versuch 3.5.4 wurde die SPE mit vorheriger Lösung des Spikes in drei verschiedenen Puffern (Sörensen-Puffer, pH 7,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 4,83;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 9,02) ausprobiert. Der saure  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer zeigte sich am wenigsten kompatibel mit dem 5-MTHF-Spike, da hier zwar kein Spike mit dem Waschwasser bei der SPE ausgewaschen wurde, aber am Wenigsten Spike wieder gefunden wurde.

Bei dem Sörensen-Puffer und dem  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer verhielt es sich mit der Wiederfindungsrate ungefähr gleich. Beim Sörensen-Ansatz war zwar die 5-MTHF in der ersten und der zweiten Fraktion und zusätzlich noch im Waschwasser enthalten, beim  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer wurde der gesamte Spike mit dem Waschwasser ausgewaschen.

Im Versuch 3.3.2 wurde gezeigt, dass beim Einsatz von Plasma und einem der 3 Puffer sowieso kein Unterschied im End-pH nach dem Zusammenmischen aller Substanzen bestand.

Der Sörensen-Puffer wurde schon vorher erfolglos zur Spikewiederfindung in Kombination mit Plasma ausprobiert (Versuch 3.5.3), deswegen wurde auf den  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer zurückgegriffen, der sich in weiterer Folge als nur relativ kompatibel mit dem darin gelösten Spike verhielt, und auch weiterhin keine Wiederfindung im Plasma ermöglichte (Versuch 3.6.1; 4.5.1Ergebnisse; Versuch 3.8.1; 4.7.1Ergebnisse).

In der Puffer-Problematik besteht möglicherweise noch Optimierungspotential. Möglicherweise kann ein optimaler Puffer für die Kombination Plasma, Spike und Pankreatin (oder Protease) gefunden werden, um die Spikewiederfindung zu ermöglichen.

### **5.3 Problematik der Aufreinigung mittels SPE**

Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit zur Wiederfindung des eingesetzten Spikes wäre die SPE, die im Rahmen dieser Arbeit zwar ausgiebig untersucht wurde, bei der aber immer noch nicht alle Aspekte berücksichtigt wurden.

Nach der enzymatischen Inkubation war aufgrund der Verunreinigung mit vielen anderen Substanzen solch ein Aufreinigungsschritt unbedingt notwendig, allerdings bestand die Sorge und die Annahme, dass nach der Bindung an die SPE-Säule der Spike nicht vollständig eluiert werden kann.

Wie Katharina Unger, 2008 in ihrer Diplomarbeit herausfand, waren die Besten Parametereinstellungen für die SPE von biologischen Proben jeweils 3ml 90:10 ACN:H<sub>2</sub>O für das Konditionieren und 10:90 ACN:H<sub>2</sub>O für das Equilibrieren, 2ml Waschen mit Puffer und Eluieren mit 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Konditionierungs- und Equilibrierungsschritte übernommen und nur der Waschvorgang und der Elutionsvorgang hinterfragt und zu optimieren versucht.

Beim Waschvorgang wurden HPLC-Wasser und Puffer als Waschlösungen ausprobiert und festgestellt, dass sich Puffer besser eignete, da mit Wasser sehr viel 5-MTHF ausgewaschen wurde (Versuch 3.5.4, Ergebnisse 4.4.4).

Beim Untersuchen des Elutionsverhältnisses mussten jedoch mehrere Parameter betrachtet werden. Einerseits ist aufgefallen, dass reines Wasser sehr viel Spike mitriss und wurde deswegen auch als Elutionslösung ausprobiert, wo sie zwar auch funktionierte, allerdings wurde die Elution über 3 Fraktionen ausgedehnt. Genauso verhielten sich die Lösungen mit hohem wässrigen Anteil gemischt mit niedrigem Acetonitril-Anteil (10:90 ACN:H<sub>2</sub>O; 20:80 ACN:H<sub>2</sub>O; 30:70 ACN:H<sub>2</sub>O) siehe Kap.

4.5.2. Bei den Verhältnissen mit höherem ACN-Anteil, aber niedrigerem Wasser-Anteil (75:25, 90:10, 100:0, verhielt es sich aber so, dass nur ein gewisser Anteil an 5-MTHF bei gleichen, nicht inkubierten Puffer-Spike-Lösungen, wiedergefunden wurde (75:25 39,85%; 90:10 42,17%; 100:0 23,67%)

In den Puffer-Lösungen eigneten sich eindeutig die wässrigen Elutionslösungen besser zur Elution des Spikes und vollständiger Wiederfindung, allerdings verzögert in mehreren Fraktionen.

Dieses Ergebnis widersprach aber der Theorie der Festphasenextraktion, bei welcher der Metabolit aus der wässrigen Phase an der Säule gebunden wird und die wässrige Lösung verdrängt wird, sodass der Metabolit mit einer organischen Phase eluiert werden kann und damit optimal für die nachfolgende Messung gelöst ist. (FRITZ 1999)

Ein möglicher Umstand für dieses Phänomen war vielleicht der Salzcharakter der 5-MTHF, die als Natrium-L-Mefolinat in der Lösung eingesetzt wurde. Möglicherweise war aufgrund dieses Umstandes die 5-MTHF in Wasser besser löslich als in organischen Lösungsmitteln und wurde somit leichter mit dem ersteren eluiert.

Da alle bisher beschriebenen Studien die 5-MTHF aus Plasma mit einem höherem organischen Anteil eluierten, vorwiegend mit Methanol (NELSON et al. 2003 *H<sub>2</sub>O:Methanol 50:50*; PFEIFFER et al. 2004 400ml/l Methanol, 100ml/l Acetonitril, 10ml/l Essigsäure; PAWLOSKY et al. 2001 *ACN:H<sub>2</sub>O:Methanol 26:60:14*; CHATZIMICHALAKIS et al. 2004 *85:15 Methanol:H<sub>2</sub>O*) wurde angenommen, dass die 5-MTHF, die nativ im Plasma enthalten war, keinen solchen Salzcharakter besaß und eine Elution mit 10:90 oder 0:100 H<sub>2</sub>O nicht vertretbar war.

In unserem Fall wurde für den organischen Anteil in der Elutionslösung Acetonitril ausgewählt, weil Acetonitril auch das Laufmittel in der HPLC war und Methanol die HPLC-Auftrennung gestört hätte.

Bei der Fällung mit meta-Phosphorsäure aber war das 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O Verhältnis optimal für die Erfassung des 5-MTHF-Spikes. Hier wurde der Spike auch im Plasmamilieu gefunden. Nach der Elution mit 10:90 wurde zwar auch der Spike vollständig gefunden, allerdings wieder auf mehrere Fraktionen verteilt. Deswegen erwies sich das 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O Verhältnis als optimal. (Versuch Kap. 3.7.1, Ergebnisse

### Kap. 4.6.1)

Beim nachfolgendem Versuch sind allerdings die Wiederfindungsraten etwas abgefallen (Versuch Kap. 3.7.3, Ergebnisse 4.6.3). Hier sollte die SPE im Großen und Ganzen optimiert werden. Auch die Konditionierungs- und Equilibrierungslösungen sollten genau auf die Plasmafällung mit meta-Phosphorsäure ausgerichtet werden, um das volle Potential dieser Methode zu nützen.

Bei der Pankreatin-Methode sollte allerdings der Hauptgrund für das Verschwinden des Spikes bei der Kombination Plasma, Spike und Pankreatin (mit Antioxidantien) herausgefunden werden. Ist es die Schuld der 1-stündigen Inkubation bei 37°C, des Pankreatins, das möglicherweise die 5-MTHF während dieser Zeit zerstört, der SPE, die nicht richtig auf diese Kombination eingestellt ist oder gibt es möglicherweise andere, nicht beachtete, Aspekte?

Möglicherweise spielten alle Parameter eine gewisse Rolle bei der Zerstörung des Spikes. Bei der Betrachtung der Ergebnisse (Kap. 4.7.2) des Versuches in Kap. 3.8.2, erkennt man, dass bei alleiniger Inkubation des Spikes mit Puffer (= inkubierter Spike-Blank) und nachfolgender SPE nur mehr 46% des Spikes wiedergefunden wurden. Bei der Inkubation von Puffer, Spike und Pankreatin ist die Wiederfindungsrate mit 38% ungefähr gleich geblieben. Sobald aber beim gleichen Ansatz Plasma statt Puffer zugegeben wurde, wurde keine 5-MTHF gefunden. Möglicherweise spielen hier sowohl die SPE, als auch das Pankreatin als auch das Plasma eine Rolle zur Zerstörung des Spikes. Möglicherweise stellt diese Fragestellung Potential für weitere Untersuchungen dar.

## 5.4 Problematik der Fällungsmethoden

Die Versuche der Plasmafällungen mit den bis dato gängigen Fällungsreagentien mit TCA, ACN und Ethanol (70%) waren nicht optimal.

Einerseits wurde bei diesen Methoden die Annahme einer möglichen Folatbindung am Plasmaprotein nicht gestellt, so bestand die Gefahr, dass durch die Fällung auch Folate mitgerissen wurden, mit einer Unterschätzung der Folatkonzentration als Folge.

Bei den hier trotzdem durchgeführten Versuchen, um die Ergebnisse mit anderen

Methoden zu vergleichen, waren die Fällungen mit Ethanol ziemlich unzufriedenstellend, da immer unterschiedliche Mengen an Niederschlag ausgefallen waren, bei den anderen zwei Fällungsreagentien war zwar die Fällung gut, aber die MS-Kompatibilität dafür unzufriedenstellend. Bei der TCA gab es keine gerade Basislinie im Total-Ionen-Chromatogramm der MS-Messung, bei ACN resultierten zwei Peaks mit zwei unterschiedlichen Retentionszeiten mit ähnlicher Masse wie die des 5-MTHF-Spikes. (Versuche Kap. 3.4.1; 3.4.2; Ergebnisse Kap. 4.3.1; 4.3.2)

Die von NELSON et al. 2004 beschriebene Fällungsmethode mit meta-Phosphorsäure allerdings, war überraschenderweise beim Einsatz von minimaler Menge an 50%igem Fällungsmittel (10µl) ausgesprochen zufriedenstellend. Auch die Sensibilität gegenüber eingesetztem Spike war passend und somit war auch die 5-MTHF-Wiederfindungsrate der 75:25 ACN:H<sub>2</sub>O eluierten Proben viel besser als bei anderen, im Rahmen dieser Arbeit ausprobierten, Methode. (Versuche Kap. 3.7.1-3.7.3; Ergebnisse Kap. 4.6.1-4.6.3)

Bei der Entwicklung dieser Methode haben NELSON et al. 2004 nicht auf das proteingebundene Folat vergessen. Sie bedienten sich der Erkenntnisse von HOLM et al. 1979 und HANSEN et al. 1978, die feststellten, dass proteingebundene Folate bei einem pH  $\leq$  3,5 von den Proteinen befreit werden. Dieser pH wurde durch den Einsatz der Ascorbinsäure und der meta-Phosphorsäure erreicht. Andererseits bewiesen NELSON et al. 2004, dass TCA, die ja sehr häufig zur Fällung eingesetzt wird, einen zu starken Säurecharakter besaß, der die 5-MTHF zerstörte.

Um nach dem Entfernen des Proteins durch die Fällung mit meta-Phosphorsäure die Bindungskraft der 5-MTHF an der SPE-Säule zu verbessern, wurde der niedrige pH der gefällten Lösung auf pH 7,3 angehoben. Dies geschah mit 0,5M NaOH/0,4M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und versicherte eine optimale Überführung der Folate aus der Fällungslösung in die Elutionslösung.

Für eine schnelle und effiziente Isolation von Plasmafolaten ist diese Methode mit Sicherheit eine der Besten. In unserem Fall sollten allerdings noch einige Optimierungsschritte bezüglich der SPE gemacht werden, um die Methode vollständig auszuschöpfen und als Routinemethode für Folatmessung verwenden zu können. Dieser Punkt könnte ein zukünftiges Forschungspotential darstellen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das essentielle Vitamin Folsäure ist in Form ihrer zahlreichen Metabolite für verschiedene biochemische Körperfunktionen im Bereich der Übertragung von 1-Kohlenstoffresten bei der DNA- und Aminosäuresynthese unersetzlich. Eine Unterversorgung mit schweren Spätfolgen ist auch in Industrieländern nicht so selten. Bekannt ist das Vitamin als das kritische Vitamin in der Schwangerschaft, da hier eine höhere Aufnahme benötigt wird, die allerdings durch eine normale Ernährung sehr schwer zu erreichen ist. Deswegen sind Supplementierungen noch vor der Schwangerschaft notwendig, um bestimmte Embryonalschädigungen wie Spina bifida zu vermeiden.

Wegen der Gefahr verschiedener Mangelsymptome wie obstruktiver Gefäßerkrankungen, megaloblastärer Anämie, Entstehung bestimmter Krebsarten und verschiedener Schwangerschaftskomplikationen, deren Entwicklung noch dazu von genetischen Faktoren beeinflusst wird, besteht dringendes Bedürfnis nach einer schnellen und einfachen Labor-Routine-Methode zur Detektion der Folatversorgung und somit zur Risikoerkennung und Begrenzung in der Bevölkerung.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht so eine einfache Routinemethode zu entwickeln und diese mit schon bestehenden und oft verwendeten Fällungsmethoden zu vergleichen. Die Methodenentwicklung beschränkte sich auf das Humanplasma als Probensubstanz, dessen Plasmaproteine durch die Enzyme Pankreatin oder Protease, abgebaut wurden, mit dem Ziel der Freisetzung von proteingebundenen Folaten. Zur Optimierung dieser Methode wurde eine bekannte Menge an 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure (5-MTHF) hinzugefügt, um das Ausmaß des Verlustes während der enzymatischen Inkubation des Plasmas bei 37°C zu beschreiben. Die spezifische 5-MTHF-Messung erfolgte durch HPLC/ESI-MS. Eine vorherige Aufreinigung der 5-MTHF erfolgte über die Festphasenextraktion (SPE).

Zum Vergleich wurden Fällungen mit Trichloressigsäure (TCA), Acetonitril (ACN), Ethanol (70%) und meta-Phosphorsäure (50%) durchgeführt. Bis auf die meta-Phosphorsäure-Fällungsmethode zeigten sich alle der durchgeführten Versuche, mit eingeschlossen der zu optimierenden enzymatischen Methode als ungeeignet für eine zuverlässige Folatbestimmung im Plasma.

## 7 SUMMARY

The vitamin folic acid, in form of its different metabolites, is essential for various biochemical functions based on transfer of 1-carbon-groups in DNA- and amino acid synthesis. Even in industrial countries severe malabsorption symptoms are common. Folic acid is mostly known as the critical vitamin in pregnancy, during which a raised intake is recommended. Such an intake is very often not possible to cover with food alone. Therefore a supplementation is necessary even before pregnancy to avoid some typical embryonal damages like spina bifida.

In case of malabsorption, many dangerous symptoms like occlusive vascular disease, megaloblastic anemia, different types of cancer and birth defects were characterized. The occurrence of these symptoms is even more common, if a certain genetic background exists.

Therefore a specific and quick laboratory analysis for detection of folic acid body concentrations is necessary to minimize the risk of late damages.

In this thesis it was tried to find such a routine method and to compare it with well known and often accomplished precipitation methods.

The method development has used human plasma as test substrate for the enzymes pancreatin and protease, which were compared in the efficacy of digesting plasma protein and further release of protein-bound folates.

For method optimization a known amount of 5-methyl-tetrahydro folic acid (5-MTHF) is added to the samples, to describe the amount of folate degradation during the enzymatic incubation (37°C). The specific 5-MTHF detection was done with HPLC/ESI-MS.

Before measurement a specific 5-MTHF clean-up step with solid phase extraction (SPE) was performed.

Precipitation methods with TCA (10%), ACN, ethanol (70%) and meta-phosphoric acid (50%) were compared with the enzymatic method to be optimized.

Any trials except the precipitation with meta-phosphoric acid (50%), proved to be unreliable as methods for detection of folates.

## 8 LITERATUR

- ARCOT, J.; SHRESTHA, A. K.; GUSANOV, U. (2002): Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions; *Food Control* 13:245-252
- ARCOT, J.; SHRESTHA, A. (2005): Folate: methods of analysis; *Trends in food Science & Technology* 16:253-266
- BAGGOTT, J. E. (2000): Hydrolysis of 5,10-methenyltetrahydrofolate to 5-formyltetrahydrofolate at pH 2.5 to 4.5; *Biochemistry* 39:14647-14653
- BAGLEY, P. J.; SELHUB, J. (2000): Analysis of Folate Form Distribution by Affinity Followed by Reversed-Phase Chromatography with Electrochemical Detection; *Clinical Chemistry* 46:3 404-411
- BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. (1999a): Folate Metabolism and Requirements; *J. Nutr.* 129:779-782
- BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. (1999b): Polymorphisms of Methylene tetrahydrofolate Reductase and Other Enzymes: Metabolic Significance, Risks and Impact on Folate Requirement; *J. Nutr.* 129:919-922
- BÄSSLER, K.-H.; GOLLY, I.; LOEW, D.; PIETRZIK, K. (2002): *Vitamin-Lexikon; Für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler* Pp. 122-162. Urban & Fischer Verlag, München
- CAMMAN, K. (2001): *Instrumentelle analytische Chemie; Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung* Kap. Pp. 5:62-74; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

- CHATZIMICHALAKIS, P. F.; SAMANIDOU, V. F.; VERPOORTE, R.; PAPADOYANNIS, I. N. (2004): Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction; *J. Sep. Sci.* 27:1181-1188
- CHEN, L.; EITENMILLER, R. R. (2007a): Single Laboratory Method Performance Evaluation for the Analysis of Total Food Folate by Trienzyme Extraction and Microplate Assay; *Jorunal of Food Science* 72:C243-C247
- CHEN, L.; EITENMILLER, R. R. (2007b): Optimization of the Trienzyme Extraction f or the Microbiological Assay of Folate in Vegetables; *J. Agric. Food Chem.* 55:3884-3888
- D\_A\_CH (2001): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr; Frankfurt/Main: Umschau/Braus
- DEVI, R.; ARCOT, J.; SOTHEESWARAN, S.; ALI, S. (2008): Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method; *Food Chemistry* 106:1100-1104
- De SOUZA, S.; EITENMILLER, R. (1990): Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay; *J. Micronutr. Analy.* 7:37-57
- DOHERTY, R. F.; BEECHER, G. F. (2003): A Method for the Analysis of Natural and Synthetic Folate in Foods; *J. Agric. Food Chem.* 51:354-361
- DUEKER, S. R. et al. (2000): Determination of Blood Folate Using Acid Extraction and Internally Standardized Gas Chromatography-Mass Spectrometry Detection; *Analytical Biochemistry* 283:266-275

- FAZILI, Z.; PFEIFFER, C. M.; ZHANG, M.; JAIN, R. (2005): Erythrocyte Folate Extraction and Quantitative Determination by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Comparison of Results with Microbiologic Assay; *Clinical Chemistry* 51:12 2318-2325
- FINGLAS, P. M.; FURE, U.; SOUTHGATE, D. T. (1993): First BCR-intercomparison on the determination of folates in food; *Food Chemistry* 46:199-213
- FOWLER, B. (1998): Genetic defects of folate and cobalamin metabolism; *Eur J Pediatr* 157 [Suppl 2]:S60-S66
- FREISLEBEN, A.; SCHIEBERLE, P.; RYCHLIK, M. (2003a): Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Anal Bioanal Chem* 376:149-156
- FREISLEBEN, A.; SCHIEBERLE, P.; RYCHLIK, M. (2003b): Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Analytical Biochemistry* 315:247-255
- FRITZ, J. S. (1999): *Analytical Solid-Phase Extraction* Pp. 2, 63-66. John Wiley & Sons, New York
- GARBIS, S. D.; MELSE-BOONSTRA, A.; WEST, C. E.; van BREEMEN, R. B. (2001): Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* 73:5358-5364
- GREGORY, J. F. (2001): Case Study: Folate Bioavailability; *J. Nutr.* 131: 1376S-1382S

- GROSSOWICZ, N. et al. (1962): Microbiologic Determination of Folic Acid Derivatives in Blood; *Blood* 20:609-616
- GUJSKA, E.; KUNCEWICZ, A. (2005): Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods; *Eur Food Res Technol* 221:208-213
- GUNTER, E. W. et al. (1996): Results of an international round robin for serum and whole-blood folate; *Clin. Chem.* 42:1689-94
- HAN, J.-Y.; TYLER, R. T. (2003): Determination of Folate Concentrations in Pulses by a Microbiological Method Employing Trienzyme Extraction; *J. Agric. Food Chem.* 51:5315-5318
- HANSEN, S. I.; HOLM, J., LYNGBYE J. (1978): Cooperative binding of folate to a protein isolated from cow`s whey; *Biochem. Biophys. Acta* 535:309-318
- HART, D. J. et al. (2002): Determination of 5-Methyltetrahydrofolate (<sup>13</sup>C-Labeled and Unlabeled) in Human Plasma and Urine by Combined Liquid Chromatography Mass Spectrometry; *Analytical Biochemistry* 305:206-213
- HOLM, J; HANSEN, S. I.; LYNGBYE, J. (1979): High and low affinity binding of folate in human serum; *Acta Physiol. Scand.* 105:A64-A65
- HORNE, D. W. (2001): High-performance liquid chromatographic measurement of 5,10-methylenetetrahydrofolate in liver; *Anal. Biochem.* 297:154-159
- HYUN, T. H.; TAMURA, T. (2005): Trienzyme Extraction in Combination with Microbiologic Assay in Food Folate Analysis: An Updated Review; *Exp Biol Med* 230:444-454

- IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. K. (2003): Determination of folate contents in some Australian vegetables; *Journal of Food Composition and Analysis* 16:37-48
- JOHNSTON, K. E.; DIRIENZO, D. B.; TAMURA, T. (2001): Folate Content of Dairy Products Measured by Microbiological Assay with Trienzyme Treatment; *Journal of Food Science* 67:817-820
- JOHNSTON, K. E.; LOFGREN, P. A.; TAMURA, T. (2002): Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method; *Food Research International* 35:565-569
- KANEKAR, P. P.; NILEGAONKAR, S. S.; SARNAIK, S. S.; KELKAR, A. S. (2002): Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India; *Bioresource Technology* 85:87-93
- KARILUOTO, M. S.; VAHTERISTO, L. T.; PIIRONEN, V. I. (2001): Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high- performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye; *J Sci Food Agric* 81:938-942
- KOHASHI, M. I.; SOTOBAYASHI, H.; IWAI, K. (1986): Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection; *Journal of Chromatography*, 382:303-307
- KONINGS, E. J. M. et al. (2001): Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods; *Am J Clin Nutr* 73:765-76
- KOK, R. M. et al. (2004): 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to

folate absorption and metabolism; *Analytical Biochemistry* 326:129-138

LIM, H.-S.; MACKEY A. D.; TAMURA, T.; WONG, S. C.; PICCIANO M. F. (1998):  
Measurable human milk folate is increased by treatment with  $\alpha$ -amylase and  
protease in addition to folate conjugase; *Food Chemistry*, Vol. 63, No. 3, pp.  
401-407

LIN, Y.; DUEKER, S. R.; JONES, A. D.; CLIFFORD, A. J. (2002): A Parallel  
Processing Solid Phase Extraction Protocol for the Determination of Whole  
Blood Folate; *Analytical Biochemistry* 301:14-20

LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. E.; HEINRICH, P. C. (2007): *Biochemie &  
Pathobiochemie* Pp 707-709; 586-588. Springer Medizin Verlag, Heidelberg

LUCOCK, M. (2000): Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and  
Role in Disease Processes; *Molecular Genetics and Metabolism* 71:121-138

LUQUE-GARCIA, J.; NEUBERT, T. A. (2007): Sample preparation for serum/plasma  
profiling and biomarker identification by mass spectrometry; *Journal of  
Chromatography A*, 1153:259-276

MARTIN, J. I.; LANDEN, W. O. Jr.; SOLIMAN, A.-G.M.; EITENMILLER, R. R.  
(1990): Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination  
in foods; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73:805-808

NDAW, S. et al. (2001): Determination of folates in foods by high-performance liquid  
chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-  
methyltetrahydrofolates; *Journal of Chromatography A* 928:77-90

- NELSON, B. C.; DALLUGE, J. J.; MARGOLIS, S. A. (2001): Preliminary application of liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in human plasma; *Journal of Chromatography B* 765:141-150
- NELSON, B. C.; PFEIFFER, C. M.; MARGOLIS, S. A.; NELSON, C. P. (2003): Affinity extraction combined with stable isotope dilution LC/MS for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma; *Analytical Biochemistry* 313:117-127
- NELSON, B. C.; PFEIFFER, C. M.; MARGOLIS, S. A.; NELSON, C. P. (2004): Solid phase extraction-electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum; *Analytical Biochemistry* 325:41-51
- NELSON, B. C.; SATTERFIELD, M. B.; SNIEGOSKI, L. T.; WELCH, M. J. (2005): Simultaneous Quantification of Homocysteine and Folate in Human Serum or Plasma Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* 77:3586-3593
- O'BROIN, S.; KELLEHER, B. (1992): Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells; *J Clin Pathol* 45:344-7
- PATRING, J. D. M.; JASTREBOVA, J. A. (2007): Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity; *Journal of Chromatography A*, 1143:72-82
- PAWLOSKY, R. J.; FLANAGAN, V. P.; PFEIFFER, C. M. (2001): Determination of 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Human Serum by Stable-Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; *Analytical Biochemistry* 298:299-305

- PAWLOSKY, R. J.; HERTRAMPF, E.; FLANAGAN, V. P.; THOMAS, P. M. (2003): Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile; *Journal of Food Composition and Analysis* 16:281-286
- PIETRZIK, K.; GOLLY, I.; LOEW, D. (2008): *Handbuch Vitamine; Für Prophylaxe, Therapie und Beratung* Pp. 82-127. Elsevier GmbH, München
- PFEIFFER, C. M.; GREGORY, J. F. (1996): Enzymatic deconjugation of erythrocyte polyglutamyl folates during preparation for folate assay: investigation with reversed-phase liquid chromatography; *Clinical Chemistry* 42:1847-1854
- PFEIFFER, C. M.; ROGERS, L. M.; GREGORY, J. F. (1997): Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography; *J. Agric. Food Chem.* 45, 407-413
- PFEIFFER, C. M. et al (2004): Determination of Folate Vitamers in Human Serum by Stable-Isotope-Dilution Tandem Mass Spectrometry and Comparison with Radioassay and Microbiologic Assay; *Clinical Chemistry* 50:2 423-432
- POOLE, C. F. (2003): New trends in solid-phase extraction; *Trends in Analytical Chemistry* 22:362-373
- PRIETO, S. P.; GRANDE, B. C.; FALCON, S. G.; GANDARA, J. S. (2006): Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages; *Food Control* 17:900-904
- QUINLIVAN, E. P.; HANSON, A. D.; GREGORY, J. F. (2006): The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples; *Analytical Biochemistry* 348:163-184

- RADER, J. I.; WEAVER, C. M.; ANGYAL, G. (1998): Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folate in enriched cereal-grain products; *Food Chemistry* 62:451-465
- RADER, J. I.; WEAVER, C. M.; ANGYAL, G. (2000): Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification; *Food Chemistry* 70:275-289
- RUGGERI, S. et al. (1999): Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A* 855:237-245
- SANTHOSH-KUMAR, C. R.; DEUTSCH, J. C.; HASSELL, K. K. L.; KOLHOUSE, N. M.; KOLHOUSE, J. F. (1989): Quantitation of red cell folates by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry utilizing a folate internal standard; *Anal Biochem* 224:1-9
- SELHUB, J. (1999): Homocysteine Metabolism; *Ann. Rev. Nutr.* 19:217-46
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. (2000): Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*; *Food Chemistry* 71:545-552
- SIGMA (1999): SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE – Enzymatic Assay of PROTEASE, Casein as a Substrate; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
- STEIJNS, L. S. W.; BRAAMS-WIATROWSKA, J. K.; LUITING H.-J.; van der WEIDE, J. (1996): Evaluation of nonisotopic binding assays for measuring vitamin B12 and folate in serum; *Clinica Chimica Acta* 248:135-141

- STOKES, P.; WEBB, K. (1999): Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. I; *Journal of Chromatography A* 864:59-67
- STRALSJÖ, L.; ARKBAGE, K.; WITTHÖFT, C.; JÄGERSTAD, M. (2002): Evaluation of a radioprotein-binding assay (RPBA) for folate analysis in berries and milk; *Food Chemistry* 79:525-534
- SWEENEY, M. R. M.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. (2003): Measurements of subnanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum; *Journal of Chromatography B*, 788:187-191
- TABOR, H; WYNGARDEN, L. (1959): The enzymatic formation of formimino-tetrahydrofolic acid, 5,10-methenyltetrahydrofolic acid, and 10-formyltetrahydrofolic acid in the metabolism of formiminoglutamic acid; *J. Biol. Chem.* 234:1830-1846
- TAMURA, T.; MIZUNO, Y.; JOHNSTON, K. E.; JACOB, R. A. (1997): Food Folate Assay with Protease,  $\alpha$ -Amylase, and Folate Conjugase Treatments; *J. Agric. Food Chem.* 45:135-139
- TAMURA, T. (1998): Determination of food folate; *J. Nutr. Biochem.* 9:285-293
- TAMURA, T.; PICCIANO, M. F. (2006): Folate and human reproduction; *Am J Clin Nutr* 83:993-1016
- THEWS, G.; MUTSCHLER, E.; VAUPEL, P. (1999): *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen* P. 125. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- UNGER, K. (2008): Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode (SPE) für Folsäuremetaboliten aus biologischen Proben zur Vorbereitung für die

massenspektrometrische Analyse (LC-ESI-qTOF). Universität Wien

VAHTERISTO, L. T.; OLLILAINEN, V.; PEKKA, E. K.; VARO, P. (1996):  
Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in  
food by high-performance liquid chromatography; *Journal of Agricultural and  
Food Chemistry* 44:477-482

WAXMAN, S.; SCHREIBER, C. (1973): Measurement of Serum Folate Levels and  
Serum Folic Acid-binding Protein by 3H-PGA Radioassay; *Blood* 42:281-290

WEST SUITOR, C.; BAILEY, L. B. (2000): Dietary folate equivalents: Interpretation  
and application; *J Am Diet Assoc.* 100:88-94

WIGERTZ, K.; JAEGERSTAD, M. (1995): Comparison of a HPLC and radioprotein-  
binding assay for the determination of folates in milk and blood samples; *Food  
Chem.* 54:429-36

WITTENBERG, J. B.; NARONHA, J. M.; SILVERMAN M. (1962): Folic acid  
derivatives of the gas gland of *Physalia physalis* L.; *Journal of Biochemistry*  
85:9-15

WRIGHT, A. J. A.; FINGLAS, P. M.; SOUTHON, S. (1998): Erythrocyte folate  
analysis: a cause for concern?; *Clin. Chem.* 44:1886-91

WRIGHT, A. J. A.; FINGLAS, P. M.; SOUTHON, S. (2000): Erythrocyte folate  
analysis: saponin added during lysis of whole blood can increase apparent folate  
concentrations, depending on hemolysate pH; *Clin. Chem.* 46:1978-86

YAZYNINA, E.; JOHANSSON, M.; JÄGERSTAD, M.; JASTREBOVA J. (2008): Low  
folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients; *Food  
Chemistry* 111:236-24

# LEBENS LAUF



## *Persönliche Daten*

---

Name: Lola Basara  
Adresse: Kaiserebersdorferstr. 64/2/10, 1110 Wien  
Geburtsdaten: 19. 11. 1984 in Karlovac, Kroatien  
Familienstand: ledig  
Staatsbürgerschaft: Kroatien (Niederlassungsnachweis)

## *Ausbildung*

---

1991-1995 Volksschule; Börsegasse, 1010 Wien  
1995-1999 Unterstufe Gymnasium; Geringergasse, 1110 Wien  
1999-2003 Oberstufe Gymnasium; Geringergasse, 1110 Wien  
(Matura mit ausgezeichnetem Erfolg)

## *Hochschulstudium*

---

seit 2003 Studium: Ernährungswissenschaften  
seit 2005 Zweitstudium: Pharmazie

## *Berufserfahrung*

---

01.09.2006 - 30.09.2006 Ferialpraktikum bei Baxter AG (Prozessvalidierung)  
01.08.2007 – 30.09.2007 Ferialpraktikum bei Baxter AG (Prozessvalidierung)  
01.08.2008 – 30.09.2008 Ferialpraktikum bei Baxter AG (Prozessvalidierung)  
Sommersemester 2009 wissenschaftliche Universitätsmitarbeiterin  
(Tutorin bei Studentenübungen: Übungen zur Ernährung des Menschen II)  
02.06.2009 – 03.07.2009 Praktikum bei Uni Wien,  
Department für Ernährungswissenschaften,  
Abteilung Emerging Focus Nutrigenomics (Labor)