

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik
der Technischen Universität München

Analyse von Aminosäuren, Proteinen und Nitroderivaten in atmosphärischen Aerosolen und in Straßenstaub

Tobias Fehrenbach

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Naturwissenschaften** genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schuster
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 23.10.06 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.01.07 angenommen.

„Wissenschaftliche Genialität ist die Fähigkeit, sich überraschen zu lassen“ - Raymond Poincaré

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand in der Zeit von März 2003 bis Oktober 2006 am Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München.

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Wasserchemie und Chemischen Balneologie bearbeiten zu können, recht herzlich bedanken. Die Bereitstellung technischer und finanzieller Mittel, sein hohes Interesse an den wissenschaftlichen Ergebnissen und die gewährten Freiheiten ermöglichten mir eine kontinuierliche und erfolgreiche Bearbeitung des Projektes.

Bei Herrn Dr. Ulrich Pöschl möchte ich mich ebenfalls für die Bereitstellung technischer und finanzieller Mittel und die fachliche Unterstützung durch wertvolle Anregungen und Diskussionen bedanken. Er ermöglichte mir die Teilnahme an internationalen Fachtagungen und sorgte stets für ein angenehmes, motivierendes Gruppen- und Arbeitsklima.

Bei Herrn PD Dr. Michael Weller möchte ich mich für die allgemeinen stets humorvollen Dialoge und den fachlichen Diskussionen bedanken, aus denen ich in jeglicher Hinsicht sehr viel Wissen für meine weitere Zukunft ziehen konnte und die mir stets in angenehmer Erinnerung bleiben werden.

Herrn Dr. Andreas Held möchte ich vor allem für das schnelle und genaue Korrekturlesen dieser Arbeit jenseits des atlantischen Ozeans und für die fachliche Unterstützung danken.

Weiterhin danke ich Ramona Leube für ihre sehr freundliche und gute Zusammenarbeit, ihre wertvolle und sehr zuverlässige Laborarbeit und Dokumentation sehr herzlich. Ich wünsche ihr für die weitere berufliche Zukunft viel Erfolg.

Außerdem möchte ich mich bei Ulrike McKeon, Armin Messerer, Susanna Mahler, Swati Bhowmik, Christoph Adelhelm, Thomas Franze, Christian Schauer, Axel Zerrath und Dieter Rothe, den „IWC-on-Jazz-Tour“-Teilnehmern Andreas Held, Philipp Stolper, Susanne Fabel, Anne Wolter, Katrin Kloth, Caroline Peskoller, Christian Cervino, Michael Seidel und Stefan

Preißer sowie allen anderen Arbeitskollegen am Institut für Wasserchemie für die gute und kollegiale Zusammenarbeit und positive Stimmung in der Aerosol-Forschungsgruppe, der Espresso-Ecke, im IWC-Team und bei zahlreichen Freizeitaktivitäten bedanken.

Veronika Ehmke, Tobias Roßteuscher, Sandro Pagano, Gabriele Holzer, Natalie Sigmund, Höpke Andresen und Sebastian Marx, die mich im Rahmen ihrer Praktika tatkräftig unterstützt haben, danke ich für ihre Mithilfe.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern und Familie für ihre Unterstützung und Motivation während meines Studiums und meiner Promotion bedanken. Ihr seid mir stets ein wichtiger Rückhalt gewesen.

Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit entstand folgende Veröffentlichung:

Y. K. GRUIJTHUIJSEN, I. GRIESHUBER, A. STÖCKLINGER, U. TISCHLER, T. FEHRENBACH, M. G. WELLER, L. VOGEL, S. VIETHS, U. PÖSCHL, A. DUSCHL. Nitration Enhances the Allergenic Potential of Proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2006**, 141, 265-275.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	GRUNDLAGEN	5
2.1	Atmosphärisches Aerosol	5
2.1.1	Allgemeines.....	5
2.1.2	Kohlenstoffhaltige Aerosolkomponenten	6
2.1.3	Cellulose und Lignin	6
2.1.4	Huminstoffartige Substanzen (HULIS).....	7
2.1.5	Proteine.....	8
2.1.5.1	Quellen.....	8
2.1.5.2	Primäre biologische Aerosolpartikel.....	8
2.1.5.3	Allergene	9
2.1.5.4	Proteinbestimmung und -gehalt.....	10
2.1.6	Wechselwirkungen mit verkehrsbedingten Emissionen	12
2.1.7	Gesundheitseffekte	13
2.2	Aminosäureanalytik.....	14
2.2.1	Historische Bedeutung	14
2.2.2	Eigenschaften von Aminosäuren	15
2.2.3	Ionenaustausch(IC)- und <i>Reversed Phase</i> (RP)-Chromatographie	18
2.2.3.1	Vorsäulenderivatisierung	19
2.2.3.2	Nachsäulenderivatisierung	22
2.2.4	Andere Analysemethoden	23
2.2.5	Proteinhydrolyse.....	24
2.2.5.1	Saure Proteinhydrolyse	25
2.2.5.2	Bestimmung von Cystein und Methionin.....	28
2.2.5.3	Bestimmung von Tryptophan.....	29

2.2.5.4	Hydrolysekinetik	30
2.2.6	Anwendungen	32
2.2.6.1	Proteinidentifizierung	33
2.2.6.2	Proteinquantifizierung	37
2.3	Proteinquantifizierung.....	38
2.3.1	Trockengewichtsbestimmung	38
2.3.2	Stickstoffbestimmung nach <i>KJELDAHL</i>	39
2.3.3	Kolorimetrische Quantifizierungstests.....	41
2.3.4	Fluoreszenzmethoden	43
2.3.5	UV-Methode	45
2.3.6	Massenspektrometrische Methoden	48
2.4	Proteinnitrierung	51
2.4.1	<i>in vivo</i> -Proteinnitrierung	51
2.4.2	Nitroproteinanalytik.....	53
2.4.2.1	Immunanalytische Methoden	53
2.4.2.2	Massenspektrometrische Methoden	53
2.4.2.3	UV/VIS-spektrophotometrische Bestimmung	54
2.4.3	3-Nitrotyrosinanalytik	55
2.4.3.1	Artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin.....	55
2.4.3.2	Proteinhydrolyse.....	55
2.4.3.3	HPLC-Analytik	56
2.4.3.4	GC-Analytik	57
2.5	Immunaффinitätschromatographie (IAC).....	58
2.5.1	Anreicherung und Elution	59
2.5.2	Immobilisierung von Antikörpern.....	59
2.5.3	Trägermaterialien	60
2.5.4	Weak Affinity Chromatography	62
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	63
3.1	Aminosäure- und Proteinanalytik.....	63
3.1.1	NBD-F-Vorsäulenderivatisierung	63
3.1.1.1	Durchführung.....	63
3.1.1.2	HPLC-Analyse von Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin ...	66
3.1.1.3	HPLC-Analyse von proteinogenen Aminosäuren	69
3.1.2	OPA/MPA-Vorsäulenderivatisierung	79
3.1.2.1	Durchführung.....	79
3.1.2.2	HPLC-Analyse von proteinogenen Aminosäuren	80

3.1.3	HPLC-Methodenvergleich	88
3.1.4	Mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse.....	90
3.1.4.1	Mikrowellensystem	90
3.1.4.2	Standardprotein-Charakterisierung.....	92
3.1.4.3	Berechnung der Proteinwiederfindungen.....	95
3.1.4.4	Hydrolyseoptimierung und -methoden	97
3.1.4.5	Empfindlichkeit der Proteinhydrolyse.....	97
3.1.4.6	Hydrolysen in 4.7 M HCl.....	100
3.1.4.7	Hydrolysen in 6 M HCl, 10 % TFA, 0.1 % Phenol	107
3.1.4.8	Hydrolysen in 6 M HCl, 10 % TFA, 1 % Phenol, 3 mM Ascorbinsäure	116
3.1.5	BCA- und NanoOrange-Assay.....	123
3.1.6	Diskussion.....	125
3.2	Proteinbestimmung im atmosphärischen Aerosol.....	126
3.2.1	Terminologie	126
3.2.2	Proteinberechnung aus Aminosäuredaten.....	127
3.2.3	HPLC-Analyse.....	131
3.2.3.1	NBD-F-Vorsäulenderivatisierung	131
3.2.3.2	OPA-Vorsäulenderivatisierung.....	131
3.2.3.3	Methodenvergleich	134
3.2.4	Probenvorbereitung.....	135
3.2.4.1	Extraktion	135
3.2.4.2	Größenausschlusschromatographie	136
3.2.4.3	Proteinhydrolyse.....	137
3.2.4.4	Diskussion.....	145
3.2.5	Atmosphärischer Feinstaub Hohenpeißenberg.....	148
3.2.5.1	Überblick	148
3.2.5.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	149
3.2.5.3	WSP(>5 kDa)-Gehalt.....	150
3.2.5.4	Aminosäurezusammensetzung.....	153
3.2.6	Atmosphärischer Feinstaub München-Großhadern	157
3.2.6.1	Übersicht	157
3.2.6.2	TAA _{TP} -Gehalt.....	158
3.2.6.3	TP- und WSP-Gehalt.....	159
3.2.6.4	Aminosäurezusammensetzung.....	161
3.2.7	Vergleich von BCA- und NanoOrange-Assay	161
3.2.8	Diskussion.....	163

3.3	Nitrotyrosin- und Nitroproteinanalytik	165
3.3.1	Allergenes Potential von Nitroproteinen.....	165
3.3.2	Spektrophotometrische Charakterisierung	165
3.3.3	Enzymimmunoassays.....	166
3.3.3.1	Einseitiger nichtkompetitiver und Sandwich-Immunoassay	166
3.3.3.2	Indirekter kompetitiver Immunoassay	168
3.3.4	Anionenaustauschextraktion.....	171
3.3.5	Immunaффinitätschromatographie (IAC)	173
3.3.5.1	Kopplungseffizienz	173
3.3.5.2	Experimentelle Kapazitätsbestimmung	173
3.3.5.3	Chromatographische Eigenschaften	175
3.3.6	NBD-F-HPLC-Analytik	178
3.3.6.1	Allgemeines.....	178
3.3.6.2	Proteinhydrolyse.....	178
3.3.6.3	Atmosphärische Feinstaubproben	181
3.3.6.4	Straßenstaubproben.....	182
3.3.7	Diskussion.....	187
4	ZUSAMMENFASSUNG	189
5	EXPERIMENTELLER TEIL	195
5.1	Geräte	195
5.1.1	Dionex-HPLC-System	195
5.1.2	Shimadzu-HPLC-System.....	195
5.1.3	Aminosäureanalytik	195
5.1.4	Proteinanalytik.....	196
5.1.5	Aффinitätschromatographie.....	196
5.1.6	Sonstige Geräte	197
5.2	Chemikalien.....	198
5.3	Puffer und Reagenzien.....	200
5.3.1	Vorsäulenderivatisierung	200
5.3.2	HPLC-Analytik.....	201
5.3.3	Extraktion	201
5.3.4	Enzymimmunoassays.....	201
5.3.5	3-Nitrotyrosin-Anreicherung.....	202
5.4	Aminosäure- und Proteinanalytik.....	203
5.4.1	Kalibrierung	203

5.4.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	204
5.4.3	Herstellung von Aminosäurestandardlösungen.....	206
5.4.4	NBD-F-Derivatisierung	207
5.4.5	OPA/MPA-Derivatisierung	207
5.4.6	BCA-Assay	209
5.4.7	NanoOrange-Assay.....	209
5.5	PM2.5-Probenahme.....	210
5.6	Extraktion.....	210
5.6.1	PM2.5-Glasfaserfilter (1/8) (EM1).....	210
5.6.2	PM2.5-Glasfaserfilter (EM2)	211
5.6.3	PM2.5-Glasfaserfilterhydrolysat (EM3)	211
5.6.4	Straßenstaub (EM4).....	212
5.7	Grössenausschlusschromatographie.....	212
5.8	Proteinhydrolysen	213
5.8.1	Allgemeines.....	213
5.8.2	Hydrolysen nach Methode HM1-HM4.....	214
5.8.2.1	BSA und Nitro-(7.4)-BSA	214
5.8.2.2	Straßenstaubproben.....	214
5.8.3	Hydrolysen nach Methode HM6	215
5.8.3.1	BSA.....	215
5.8.3.2	PM2.5-Extrakte.....	215
5.8.3.3	Standardaddition von BSA in PM2.5-Matrix (A)	216
5.8.4	Hydrolysen nach Methode HM7-HM9.....	217
5.8.4.1	BSA.....	217
5.8.4.2	PM2.5-Extrakte.....	217
5.8.4.3	PM2.5-Filter.....	218
5.8.4.4	Hydrolysekinetik von BSA in Feinstaubmatrix (B)	218
5.8.4.5	Standardaddition von BSA in PM2.5-Matrix (C)	219
5.9	Nitroproteinanalytik	220
5.9.1	Synthese von Nitroproteinen	220
5.9.1.1	Nitro-(7.4)-BSA.....	220
5.9.1.2	Nitro-(4.6)-Ovalbumin	221
5.9.1.3	Nitro-(3.4)-Bet v 1	221
5.9.1.4	Spektrophotometrische Nitrotyrosinbestimmung.....	221
5.9.2	Enzymimmunoassays.....	222
5.9.2.1	Einseitiger nichtkompetitiver Immunoassay	222
5.9.2.2	Sandwich-Immunoassay.....	223

5.9.2.3	Kompetitiver Immunoassay.....	224
5.9.3	AG1-X8-Anreicherung	224
5.9.4	Immunaффinitätschromatographie (IAC)	225
5.9.4.1	Allgemeines	225
5.9.4.2	Immobilisierung von γ -Globulin	225
5.9.4.3	Immobilisierung von pAk Oxis 24312.....	226
5.9.4.4	Kapazitätsbestimmung	226
5.9.4.5	Chromatographie.....	227
6	DATEN _____	229
6.1	Proteinhydrolyse.....	229
6.2	Hohenpeissenberg (MOHP)	232
6.3	München-Grosshadern (IWC)	238
6.4	Zugspitze (SCAVEX)	243
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS _____	245
8	LITERATURVERZEICHNIS _____	249

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Das öffentliche Interesse in Bezug auf das Thema Feinstaub liegt vor allem in den mit den feinen Partikeln assoziierten Gesundheitsgefahren begründet. Im letzten Jahr wurde in den Medien in einer Flut von Zeitungsartikeln, Magazin- und Fernsehbeiträgen das Thema der tödlichen Gefahr durch Feinstaub und Maßnahmen wie der Einführung von Dieselrußfiltern, Fahrverboten und Maut in Großstädten zur Einhaltung des verschärften Feinstaub-Immissionsgrenzwertes diskutiert. Der Grenzwert gilt in der Bundesrepublik Deutschland seit Beginn des Jahres 2005. Demnach darf eine atmosphärische Feinstaubkonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Tages-Mittelwert) nicht mehr als 35-mal pro Jahr überschritten werden. Stuttgart hatte bereits 3½ Monate nach Einführung - also Mitte März 2005 - als erste deutsche Stadt diesen Grenzwert überschritten. Die Hauptverursacher von anthropogenem Feinstaub sind die Industrie und der Straßenverkehr mit Primäremissionen von 56.7 und 34.8 kt pro Jahr. Der verkehrsbedingte Emissionswert liegt allerdings deutlich höher, denn der angegebene Wert bezieht sich ausschließlich auf Partikel, die aus Verbrennungsprozessen stammen. Die Feinstaubemissionen durch Abrieb von Reifen- und Bremsbelägen betragen weitere 7 bzw. 5.5-8.5 kt pro Jahr.^[1] Die Landwirtschaft und Privathaushalte gelten als weitere wichtige Emittenten. Die gesundheitlichen Wirkungen von Feinstaub sind in zahlreichen Studien dokumentiert worden. In einer epidemiologischen Studie von KÜNZL^[2] zum Beispiel wurden rund 40 000 Todesfälle, 2 500 neue Fälle chronischer Bronchitis, 290 000 Episoden von kindlicher Bronchitis und über 500 000 Asthmaanfänge pro Jahr in Frankreich, der Schweiz und Österreich auf die vorherrschende Luftverschmutzung zurückgeführt. Rund 20 000 Todesfälle werden verkehrsbedingten Emissionen - also auch Feinstaub - zugeschrieben. Weitere epidemiologische Studien zeigen eindeutige Assoziationen zwischen Belastungen durch thorakalen (PM10) und alveolengängigen Feinstaub (PM2.5) und verschiedenen Gesundheitsfaktoren wie der Gesamtmortalität, Mortalität durch Herz-Kreislaufkrankungen, Atemwegserkrankungen und Lungenkrebs.^[1,3,4] Die Häufigkeit allergischer Atemwegserkrankungen wie die allergische Rhinitis und das Asthma bronchiale steigt seit Jahren vor allem in den Industrieländern weltweit an.^[5-7] Diese Beobachtung wird mit dem westlichen Lebensstil und Lebensumständen in Verbindung gebracht.

Die Hygiene-Hypothese zum Beispiel geht davon aus, dass aufgrund verbesserter hygienischer Bedingungen das Immunsystem nicht mehr ausreichend trainiert wird und daher bei Kontakt mit Allergenen zunehmend zu Überreaktionen neigt. Diese Theorie würde die Beobachtung, dass unter der ländlichen Bevölkerung im Gegensatz zu Menschen, die in Großstädten wohnen, Allergien weniger verbreitet sind, erklären. Offenbar können eine Reihe von weiteren Faktoren wie z. B. eine erhöhte Wahrnehmung, psychosoziale Faktoren, eine genetische Prädisposition als auch eine höhere Allergenexposition und Luftverunreinigungen für die Zunahme von Allergien verantwortlich gemacht werden.^[8,9] Zu den diskutierten Luftverunreinigungen zählen neben Dieselruß- und Feinstaubpartikel auch Stickstoffdioxid und Ozon. Die letztgenannten Schadstoffe sind Spurengase, die während des Sommersmogs in der Atmosphäre in atemwegreizenden Konzentrationen vorkommen. Das Wort „Smog“ symbolisiert ursprünglich den winterlichen „London-Smog“, also die Beobachtung einer Dunstglocke im Winter über größeren Städten und industriellen Ballungsgebieten, die sich bildet, wenn sich die in der Luft enthaltenen Schadstoffe wie Schwefel- und Stickstoffoxide und Staub aus Hausbrand, Verkehrs- und Industrieabgasen bei einer Inversionswetterlage nicht verteilen können. Der sommerliche „Los-Angeles-Smog“ bildet sich hingegen aus Stickstoffoxiden und flüchtigen Kohlenwasserstoffen unter Einwirkung von Sonnenlicht während sommerlicher Schönwetterperioden. Wechselwirkungen von Feinstaubpartikeln, Stickstoffoxiden und Ozon mit biologischem Material (z. B. Blütenpollen), das sich in Kontakt mit der Atmosphäre befindet, können zu einer erhöhten Freisetzung von Proteinen und Allergenen führen bzw. ihr allergenes Potential aufgrund von chemisch-strukturellen Modifizierungen erhöhen. Die grundlegenden physikalischen und chemischen Mechanismen der beobachteten Gesundheitseffekte von Feinstaub und anderen Luftverunreinigungen sind allerdings nur unzureichend geklärt. Neben proteinhaltigem biologischem Material werden zahlreiche weitere toxische und krebs-erregende Substanzen in Feinstaubpartikeln für die beobachteten Gesundheitseffekte verantwortlich gemacht. Atmosphärischer Feinstaub besteht jedoch aus einer hohen Anzahl von anorganischen, organischen und makromolekularen bioorganischen Verbindungen wie Proteinen. Die chemische Analyse von Feinstaub ist daher sehr komplex, zumal die chemische Zusammensetzung sehr variabel ist und sich je nach Probenahmeort, Probenahmezeit und den vorherrschenden meteorologischen Bedingungen stark unterscheiden kann.

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung des Proteingehaltes von atmosphärischen Feinstaubpartikeln mit Hilfe von flüssigchromatographischen Methoden der Aminosäureanalytik. Es sollten sowohl Methoden der Vorsäulenderivatisierung und RP-Chromatographie als auch eine mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse entwickelt und hinsichtlich der Zielsetzung verifiziert werden. Die Anwendbarkeit der Methoden der Amino-

säureanalytik und Proteinhydrolyse für die allgemeine Proteinquantifizierung und -identifizierung sollte zunächst anhand von Standardproteinanalysen demonstriert werden. Im Anschluss sollten Standardadditionsexperimente in atmosphärischer Feinstaubmatrix durchgeführt werden, um die optimalen Bedingungen der Proteinhydrolyse zu finden. Es sollten Aussagen über die Aminosäurezusammensetzung und die mögliche Herkunft atmosphärischer Proteine getroffen werden. Die Tauglichkeit von Proteinbestimmungstests wie der BCA- und NanoOrange-Assay für eine schnelle und effiziente Proteinquantifizierung in atmosphärischen Aerosolpartikeln sollte anhand eines Vergleichs mit Ergebnissen der Aminosäureanalytik untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Entwicklung von Methoden zur Anreicherung von 3-Nitrotyrosin aus Proteinhydrolysaten von Straßenstaub- und atmosphärischen Aerosolproben mittels Anionenaustausch- und Immunaффinitätschromatographie und dessen gas- und flüssigchromatographische Bestimmung nach Vorsäulenderivatisierung. Die Methode sollte zur Validierung von immunanalytischen Verfahren, die bereits von *FRANZE*^[10-13] zur Bestimmung von Nitroproteinen in Umweltproben angewendet wurden, herangezogen werden. Es sollten außerdem Aussagen über die vorhandenen Mengen des Analyten getroffen werden.

2 GRUNDLAGEN

2.1 ATMOSPHERISCHES AEROSOL

2.1.1 Allgemeines

Atmosphärische Aerosole sind kolloide Systeme luftgetragener fester und flüssiger Partikel (Schwebstoffe) mit Größen im Nanometer- und Mikrometerbereich. Sie entstehen aus einer breiten Vielfalt natürlicher und anthropogener Quellen. Primäre Aerosolpartikel werden direkt von ihrer Quelle in kondensierter Form emittiert. Sie entstehen durch unvollständige Verbrennung von Biomasse und fossilen Brennstoffen z.B. bei Waldbränden, in Kraftfahrzeugen und Kraft- und Fernheizwerken und bei Vulkanausbrüchen. Abriebprozesse von Reifen- und Bremsbelägen, die Degradation und biogene Freisetzung von biologischem Material (Pflanzenbruchstücke, Mikroorganismen, Pollen etc.) und die windgetriebene oder verkehrsbedingte Aufwirbelung von Straßen-, Boden- oder Mineralstaub tragen ebenfalls zu einem Eintrag von Partikeln in die Atmosphäre bei.^[14] Sekundäre Aerosolpartikel hingegen werden durch chemische Reaktion und Gas-Partikel-Konversion aus gasförmigen (volatilen) Vorläufersubstanzen in der Atmosphäre gebildet.^[15,16] Luftgetragene Partikel unterliegen in der Atmosphäre der Alterung und ändern ihre Eigenschaften hinsichtlich Größe, Struktur und Zusammensetzung durch chemische und physikalische Wechselwirkungen (z. B. chemische Reaktionen mit reaktiven Spurengasen und Koagulation). Partikel werden durch Niederschläge aus der Atmosphäre ausgetragen oder sedimentieren ab einer kritischen Größe (feuchte und trockene Deposition).^[15] Systeme von Staubpartikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser $<10 \mu\text{m}$ werden als Feinstaub (PM10) bezeichnet. Feinstaub ist für den Menschen von besonderer Bedeutung, denn dessen Partikel besitzen eine hohe atmosphärische Verweildauer und können bis in die Lunge vordringen.^[17]

2.1.2 Kohlenstoffhaltige Aerosolkomponenten

Die chemischen Hauptkomponenten atmosphärischer Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) in städtischer und ländlicher kontinentaler Luft sind anorganische Salze (Ammonium, Nitrat und Sulfat) und kohlenstoffhaltige Komponenten (TC), die sich aus organischen Verbindungen (OC) und elementarem Kohlenstoff (EC) zusammensetzen (TC = OC + EC). Eine typische urbane Aerosolprobe enthält z.B. 8 % Ammonium, 6 % Nitrat, 28 % Sulfat, 9 % EC, 31 % OC und 18 % nicht näher charakterisierte Komponenten.^[18]

Organische kohlenstoffhaltige Verbindungen tragen je nach Probenahmeort, -zeit und meteorologischen Bedingungen rund 20-50 % zu der gesamten Partikelmasse (PM_{2.5}) bei und bilden meist nach Sulfat oder Nitrat die zweitgrößte Fraktion im atmosphärischen Aerosol.^[19] Eine Unterteilung des OC wird nach operationellen Gesichtspunkten anhand der Löslichkeit in organischem und wässrigem Extraktionsmittel getroffen - z.B. wasserlöslicher (WSOC) und wasserunlöslicher Kohlenstoff (WINSOC). Die Probenahme und Analytik der Verbindungen des OC ist jedoch aufgrund der Heterogenität (Struktur, physikochemische Parameter) und Variabilität (zeitlich, örtlich) seiner Zusammensetzung sehr komplex. Bis dato wurde nur ein geringer Anteil organischer Verbindungen identifiziert. *ROGGE* et al.^[20] konnten nach organischer Extraktion städtischer atmosphärischer Partikel (PM < 2.1 μm) nur rund 12-18 % des OC mit gaschromatographischen Methoden auflösen und entsprechenden Einzelverbindungen zuordnen. *ZAPPOLI* et al.^[21] untersuchten den WSOC eines städtischen, ländlichen und Hintergrund-Aerosols (PM < 1.5 μm) und fanden bezogen auf die OC-Fraktion einen WSOC-Anteil von 52-84 %. Nach Schätzungen der Autoren tragen wasserlösliche Biopolymere einen Anteil von rund 21-55 % zur WSOC- und 10-29 % zur OC-Fraktion bei (2-11 % bezogen auf die Gesamtpartikelmasse). Ein beträchtlicher Anteil der organischen Fraktion ist weder in organischem noch in wässrigem Lösungsmittel extrahierbar. Diese Eigenschaft ist offensichtlich auf schwerlösliche bioorganische Komponenten wie Cellulose und Lignin zurückzuführen.^[19,21,22]

Als weitere makromolekulare Verbindungen sind aufgrund ihres biogenen Ursprungs und ihrer natürlichen Häufigkeit neben Cellulose und Lignin auch Huminmaterial (*humic-like substances* (HULIS) sowie terrestrische und aquatische Huminstoffe) und Proteine in atmosphärischen Partikeln prinzipiell zu erwarten.

2.1.3 Cellulose und Lignin

Cellulose ist die häufigste organische Substanz in der Natur, die in einer Menge von bis zu 10^{11} t pro Jahr biosynthetisiert wird.^[23] Pflanzliche Zellwände bestehen bezogen auf ihr

Trockengewicht bis zu 50 % aus Cellulose. Es ist ein lineares Polysaccharid, das aus β 1 \rightarrow 4-verknüpften Glucose-Monomeren aufgebaut ist. In unfraktioniertem urbanem Aerosol wurde von *PUXBAUM* et al.^[22,24] ein Cellulosegehalt von rund 8 % bezogen auf OC und 2 % bezogen auf die Gesamtpartikelmasse ermittelt. Es ist zu 16 % Bestandteil der unlöslichen organischen Fraktion. Das Monomere der Cellulose, die Glucose, wird ebenfalls im atmosphärischen Aerosol gefunden und gilt als Indikator biogenen organischen Kohlenstoffs.^[25]

Lignin ist ein weiteres sehr häufig auftretendes Biopolymer. Sein Anteil in Holz beträgt rund 30 %. Seine Struktur besteht aus einem polymeren phenylpropanoiden System, das je nach Herkunft des Holzes aus den Phenolen *p*-Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol aufgebaut ist.^[23] Bei der Biomasseverbrennung entstehen zahlreiche niedermolekulare Oxidations- und Pyrolyseprodukte von Lignin mit aromatischen Guajacyl- und Syringylstrukturen, die in atmosphärischen Partikeln gefunden werden.^[26] Ein partikulärer Eintrag von Cellulose und Lignin in die Atmosphäre ist als unverbranntes organisches Material bei der Biomasseverbrennung möglich.^[25]

2.1.4 Huminstoffartige Substanzen (HULIS)

Huminstoffartige Substanzen (HULIS) sind offensichtlich primärer und sekundärer Herkunft.^[18] Bei der Biomasseverbrennung entstehen sie über direkte Kondensation von hochmolekularen Verbrennungsprodukten von Lignin und durch Polymerisation von niedermolekularen Verbrennungsprodukten in Reaktionen mit atmosphärischen OH-Radikalen.^[18,21,27,28] Ein weiterer Mechanismus von *LIMBECK* et al.^[29] beschreibt die sekundäre Bildung von HULIS durch heterogene Reaktionen von Isopren und Terpenen, die von der Vegetation emittiert werden, auf der Oberfläche von sauren Partikeln.

HULIS sind den terrestrischen und aquatischen Huminstoffen (Humin- und Fulvinsäuren) in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich.^[30,31] Strukturell sind HULIS ungesättigter, polyacider Natur (Polycarbonsäuren). Sie weisen phenolische und partiell oxidierte, Chinon-ähnliche Strukturen auf, die über aliphatische Brücken verbunden sind. Außerdem enthalten sie isolierte Hydroxy-, Methoxy-, Aldehyd- und Ketogruppen.^[18,30,32-34] Das mittlere Molekulargewicht von atmosphärischen HULIS wurde von *KISS* et al.^[35] auf 215-345 Da mit Hilfe von LC-MS- und osmometrischen Methoden geschätzt, während *ZAPPOLI* et al.^[21] von 3 000 Da als oberem Grenzwert ausgehen. Das Molekulargewicht der HULIS ist offensichtlich eine Eigenschaft, in der sich HULIS von aquatischen und terrestrischen Huminstoffen, die eine sehr heterogene Molekulargewichtsverteilung (0.5-20 kDa) zeigen, unterscheiden.

Der atmosphärische Eintrag von terrestrischen und aquatischen Huminstoffen ist durch Aufwirbelung von Bodestaub und Erdpartikeln und durch das Zerplatzen von feinen Tröpfchen auf Wasseroberflächen (*bubble bursting*) denkbar.

2.1.5 Proteine

Proteine sind Biopolymere, die aus Aminosäuren aufgebaut sind und organischen Stickstoff enthalten. Sie kommen als wasserlösliche Proteine oder Glycoproteine und hydrophobe Membranproteine im Cytosol, den Zellmembranen und der extrazellulären Matrix von lebender Materie vor. In der Atmosphäre sind sie freie oder gebundene Bestandteile des Bioaerosols. Sie beeinflussen die Hygroskopizität organischer Partikel und verändern ihre Eigenschaften, die für Klima- und Gesundheitseffekte relevant sind. Nach trockener oder feuchter Deposition sind Proteine eine wertvolle Stickstoffquelle für terrestrische und aquatische Ökosysteme (Stickstoffzyklus).^[36-40]

2.1.5.1 Quellen

Vegetation und Gewässersysteme stellen bedeutende natürliche Quellen für Proteine im atmosphärischen Aerosol dar. Die Freisetzung von proteinhaltigem organischem Material ist eng mit der tages- und jahreszeitlich variierenden biologischen Aktivität und meteorologischen Bedingungen dieser Umweltkompartimente verknüpft. Im Frühjahr zur Blütezeit wird eine hohe Anzahl von Blütenpollen von der Vegetation emittiert, während im Herbst pflanzliche Abbauprodukte in der Natur dominieren.^[41] (Regen-)Wälder setzen eine hohe Anzahl von Pilzsporen - vor allem in der Nacht - frei.^[42,43] *Bubble bursting*-Prozesse auf Wasseroberflächen von Ozeanen und Binnengewässern sind für den Eintrag von Bakterien und Phytoplankton verantwortlich.^[44-46] Zu den zahlreichen anthropogenen Quellen gehören landwirtschaftliche, industrielle und kommunale Prozesse wie z.B. die Tierhaltung (Fütterung, Trockenkot und Einstreu), der Ackerbau, die Textilherstellung, die Lagerung von Abfällen auf Deponien und Kompostieranlagen, Kläranlagen und der Straßenverkehr.^[14,47-49]

2.1.5.2 Primäre biologische Aerosolpartikel

Bioaerosole, die auch primäre biologische Aerosolpartikel (PBAP) genannt werden, sind luftgetragene Partikel, die lebensfähige biogene Organismen oder von lebender Materie abgeleitete nicht-lebensfähige Bestandteile und zelluläre Fragmente enthalten. Zu den PBAP gehören Viren ($d = 0.01-0.5 \mu\text{m}$), Bakterien ($d = 0.4-2 \mu\text{m}$), Protozoen ($d \geq 4 \mu\text{m}$), Algen, Pilzsporen ($d \geq 1 \mu\text{m}$), Pollen ($d > 5-100 \mu\text{m}$), zelluläre Fragmente von Pflanzen (Laub) und Insekten, menschliche und tierische Epithelzellen und Hautschuppen ($d = 1 \mu\text{m}$).^[14,47]

PUXBAUM et al.^[22] ermittelten anhand des Cellulosegehaltes von Aerosolpartikeln die Konzentration von Pflanzenbruchstücken auf $0.75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in der Atmosphäre. *BAUER* et al.^[50] fanden durchschnittlich $12\,000$ Bakterien/ m^3 und 730 Pilzsporen/ m^3 , dies entspricht den Autoren zufolge knapp 6 % des OC des atmosphärischen Aerosols (PM = 2.1-10 μm). Der Beitrag von Pollen- und Pilzfragmenten zum OC und zur Gesamtpartikelmasse (PM_{2.5}) wurde von *WOMILOJU* et al.^[51] mit Hilfe der Analyse von biochemischen Markersubstanzen auf 12-22 % bzw. 4-11 % geschätzt.

Die atmosphärischen Konzentrationen von Gräser- und Birkenpollen können jeweils Werte bis zu $4\,000$ - $5\,000$ Pollen/ m^3 erreichen.^[52] Pollen von Kieferngewächsen erreichen sogar eine Anzahl von bis zu $8\,000$ pro m^3 . Der Proteingehalt von Pollen ist hochvariabel und beträgt 2.5-61 %.^[53] In Gräserpollen sind nach *SCHÄPPI* et al.^[54] durchschnittlich 0.32 ng wasserlösliches Protein pro Pollen enthalten. Dies entspricht $1.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($0.32 \text{ ng} \times 5\,000/\text{m}^3$) luftgetragendem in Gräserpollen gebundenem Protein. Der Beitrag von Bakterien zu der gesamten Proteinfracht ist nach der folgenden Abschätzung um vier Größenordnungen geringer als der von Pollen. Planktonische Bakterien enthalten nach *ZUBKOV* et al.^[55] rund 24 fg Protein pro Zelle. Die entsprechende Proteinkonzentration, die auf Bakterien zurückzuführen wäre, liegt dann bei nur $0.3 \text{ ng}/\text{m}^3$ ($24 \text{ fg} \times 12\,000 \text{ Zellen}/\text{m}^3$). Der Proteingehalt von marinen Makro- und Mikroalgen wurde von *BARBARINO*^[56] auf 4-16 % Protein ermittelt.

2.1.5.3 Allergene

PBAPs unterliegen zahlreichen physikalischen und chemischen Wechselwirkungen mit atmosphärischen Luftschadstoffen, die sie morphologisch und chemisch verändern.^[57,58] Wechselwirkungen von Pollenkörnern und atmosphärischen organischen Partikeln führen zu einer Präaktivierung des Pollenkorns. Allergene Proteine werden durch eine Keimung oder einem Aufplatzen von Körnern bei hoher Luftfeuchte oder elektrischen Entladungen (Gewitter) freigesetzt. Proteine liegen daher auch in freier, auf feinen Stärke- oder Rußpartikeln (PM < 1 μm) in adsorbierter Form im atmosphärischen Aerosol vor.^[41,59,60]

Die Hauptquellen für luftgetragene Allergene sind Pollen, Schimmelpilzsporen und Myzelien.^[41,52] In Straßenstaub und atmosphärischen Partikeln werden allerdings auch zahlreiche Allergene anderen Ursprungs wie Zedernholz, Katzenhaare, Hausstaubmilben und Latex gefunden.^[48,49]

In der lungengängigen Aerosolfraktion (PM < 7.2 μm) sind von *SCHÄPPI* et al.^[61] mittlere Konzentrationen des Hauptallergens der Birke Bet v 1 von $0.2 \text{ ng}/\text{m}^3$ bestimmt worden. An Tagen nach leichtem Regenfall betrug die Konzentration sogar $1.2 \text{ ng}/\text{m}^3$. Ein äquivalentes Bild ergab sich für Gräserpollenallergene mit einer maximalen Konzentration von $14 \text{ ng}/\text{m}^3$.^[54,62]

Der Allergengehalt in atmosphärischen Partikeln scheint im Vergleich zum Gesamtprotein-gehalt gering zu sein. Das Hauptallergen der Birke Bet v 1 und des Lischgrases Phl p 5 repräsentieren nach *SCHÄPPI* et al.^[62] nur 70 bzw. 50 ppm der gesamten Proteinfraction. Nach *MIGUEL* et al.^[49] besitzen nur 0.5-1 % der Proteine von Allergen-enthaltenden Organismen allergenes Potential (siehe auch *Abschnitt 2.1.5.2*).

2.1.5.4 Proteinbestimmung und -gehalt

Der Proteingehalt atmosphärischer Aerosolpartikel unterschiedlicher Herkunft und Größenfraktionen wurde in verschiedenen Studien veröffentlicht. Die ermittelten Protein-konzentrationen liegen im Bereich von 0.1-0.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (*Tabelle 2.1*). Von *ANKILOV*^[63], *MIGUEL*^[49] und *BORESON* et al.^[64] wurden auch deutlich höhere Werte bis zu 5.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ gemessen. Dies entspricht einem Proteinanteil von 1-14 % der atmosphärischen Gesamt-partikelmasse. In einer Studie von *BORESON* et al.^[64] konnte der Gesamtproteingehalt mit dem OC-Gehalt und der Gesamtmasse grober Partikel ($d = 2.5-10 \mu\text{m}$) korreliert werden. Eine signifikante Korrelation in feinen Partikeln (PM_{2.5}) wurde nicht beobachtet. *ZHANG* et al.^[38] bestimmten die Beiträge von freien (FAC) und proteingebundenen Aminosäuren und anderen organischen Aminoverbindungen (CAC) zum wasserlöslichen organischen Gesamtstickstoffgehalt (WSON) von Feinstaub (PM_{2.5}) in Nordkalifornien. Der Anteil betrug 8.5-71 % des WSON. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in den Studien auf unterschiedlichste Weise. Die Partikel wurden auf Teflon-^[36,38,64], AfA-KhA-^[65], Glasfaser-^[10,49,62] und Quarzfaserfilter^[10,49] gesammelt. Proteine wurden in Wasser, einer Lösung aus Borsäure und Kaliumhydroxid oder neutralem Phosphat- bzw. PBS-Puffer bei 0-4 °C bzw. RT für 1-12 h mittels Rühren, Schütteln oder Ultraschall extrahiert. Als Additive wurden EDTA, Azid und Proteaseinhibitoren eingesetzt.^[49] Das Protein wurde direkt im Extrakt oder nach Größenfraktionierung (SEC, Dialyse) mit kommerziell erhältlichen Proteinquantifi-zierungstests wie dem BCA-, Bradford- oder NanoOrange-Assay meist als BSA-Äquivalent-konzentration bestimmt. Der nach diesen Methoden ermittelte Proteingehalt wird als Suggorawert für die gesamte biologische Materie angesehen.^[64]

Tabelle 2.1: Proteinkonzentrationen in atmosphärischen Partikeln.

Probe	Ort	Protein- konzentration [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Protein/PM [%]	Methode	Referenz
PM2.5	Davis, CA, USA	$0.25 \pm 0.09^{(5)}$ (0.12-0.39)	-	AAA ⁽⁹⁾	[36]
PM2.5	Davis, CA, USA	$0.29^{(4)(5)}$	3.3 (1.6-4)	AAA	[38]
TSP ⁽⁸⁾	Sibirien, RUS	$0.39 \pm 0.21^{(5)}$ (0.17-0.69)	-	Bradford	[65]
TSP	Sibirien, RUS	<0.10 - $1.10^{(5)}$ <0.25 - $4.0^{(1)}$	-	Bradford	[63]
PM ⁽²⁾	Bay of Bengal, Indien	0.06 - $0.14^{(3)}$	-	-	[44]
TSP	Zürich, CH	$0.54^{(5)}$	~2	Bradford	[62]
TSP	Los Angeles, CA, USA	1.5 - $5.8^{(6)}$	2.2-5.0	BCA	[49]
TSP	Long Beach, CA, USA	0.6 - $5.8^{(6)}$	1.1-4.9	BCA	[49]
TSP/ PM10	Rubidoux, CA, USA	1.7 - $4.3^{(6)}$ / 2.1 - $3.9^{(6)}$	1.7 - 4.0 / 2.2 - 8.2	BCA	[49]
PM2.5	München, D	$0.45 \pm 0.32^{(7)}$	1.9 ± 1.3	BCA	[10]
PM2.5	München, D	$0.37 \pm 0.11^{(7)}$	3.1 ± 1.0	BCA	[10]
PM2.5	Hoher Peißenberg, D	$0.44 \pm 0.25^{(7)}$	4.0 ± 1.4	BCA	[10]
PM2.5	Zugspitze, D	$0.15 \pm 0.25^{(7)}$	3.7 ± 2.9	BCA	[10]
PM2.5	Phoenix, AZ, USA	0.4-3.2	-	NanoOrange	[64]

(1) - in 500-7 000 m Höhe; (2) - keine Information über PM-Fraktion (Sekundärliteratur); (3) - unter Annahme eines durchschnittlichen MW von 120 g/mol; (4) - FAC+CAC; (5) - keine Proteingrößenfraktionierung; (6) - nach Dialyse (Cut-Off = 3500 Da); (7) - nach SEC (Cut-Off = 5 000 Da); (8) - nichtgrößenfraktionierte Aerosolpartikel - *total suspended particulates*; (9) - Aminosäureanalytik.

ZHANG et al.^[36] wendeten außerdem die Aminosäureanalytik an. Standardadditionsexperimente mit Proteinen wurden zur Bestimmung von Proteinverlusten während der Probenvorbereitung mit Ausnahme von FRANZE^[10] nicht veröffentlicht. Der Autor untersuchte die Proteinadsorption auf Glasfaser- und Quarzfaserfilter unter Bedingungen der Extraktion mit PBS-Azid-Puffer (pH = 7.4). Die BSA-Wiederfindung auf beiden Filtermaterialien war vergleichbar und betrug lediglich 8-63 % in Abhängigkeit der eingesetzten BSA-Menge.

Desweiteren wurde von ZHANG et al.^[38] die Effizienz der angewendeten Ultraschall-Extraktionsmethode durch wiederholte Extraktion eines mit Feinstaub belegten Teflonfilters untersucht. Die Proteinquantifizierungstests wurden hinsichtlich Kreuzreaktivitäten zu Feinstaubmatrixkomponenten nur wenig charakterisiert. FRANZE hat den BRADFORD-Assay und den BCA-Assay für eine Proteinbestimmung in Feinstaub näher untersucht. Die Kalibriergeraden des erstgenannten Tests zeigten jedoch eine deutliche Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Eine Anwendbarkeit für Feinstaubproben wurde daher aufgrund des variierenden Salzgehaltes ausgeschlossen. Außerdem wurden Kreuzreaktivitäten des BCA-Assays hinsichtlich Huminsäuren, die den atmosphärischen HULIS strukturell sehr ähnlich sind, von 23-43 % ermittelt.^[10] Aminosäuren und Proteine wurden außerdem in Straßenstaub^[13,48,49], Nebel^[36,37], Tau^[66] und Niederschlag^[67-69] gefunden und bestimmt.

2.1.6 Wechselwirkungen mit verkehrsbedingten Emissionen

Primäre verkehrsbedingte Schadstoffe wie leichtflüchtige Kohlenwasserstoffe (VOC), Stickoxide ($\text{NO}_x = \text{NO} + \text{NO}_2$) und Kohlenstoffmonoxid (CO) führen bei intensiver Sonneneinstrahlung zu erhöhten Konzentrationen von NO_2 , O_3 und anderen Photooxidantien. Im erweiterten Sinne zählen zu den Photooxidantien reaktive Sauerstoff(ROS)- und Stickstoff(RNS)-Verbindungen wie O_2H , O_3 , NO_x , organische Nitrate (z.B. Peroxyacetylnitrat (PAN)) sowie N_2O_5 , NO_3 , HNO_3 und HNO_2 , die aus NO_x , O_3 , H_2O und OH-Radikalen entstehen. Diese sekundären Schadstoffe sind Komponenten des photochemischen Smogs (Sommersmog).^[17,70] Photooxidantien besitzen ausgeprägte oxidierende Eigenschaften und sind in der Lage, luftgetragene, (bio-)organische Verbindungen wie z.B. Phenole, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) und Proteine zu nitrieren.^[11,13,71-73] Phenole reagieren mit hoher Regioselektivität in Gasphasenreaktionen mit NO_2 - und OH-Radikalen zu *o*-Nitrophenol und mit NO_3 und NO_2 zu *o*- und *p*-Nitrophenol.^[71,72] OH-Radikale und NO_3 oxidieren in diesem Fall Phenolmoleküle unter Abstraktion eines Wasserstoffatoms zu einem Phenoxyradikal, das anschließend NO_2 addiert. Atmosphärische NO_3 -Radikale entstehen unter Sommer-Smog-Bedingungen aus NO_2 und O_3 . OH-Radikale übernehmen wichtige Reinigungsfunktionen in der Atmosphäre und sind allgegenwärtig. Nitrierungen von Phenolen durch HNO_2 und HNO_3 , die sich in der Atmosphäre aus NO bzw. NO_2 mit OH-Radikalen oder aus NO_2 bzw. N_2O_5 durch Addition von H_2O bei hoher Luftfeuchtigkeit bilden, sind in der Flüssigphase hinreichend bekannt. FRANZE et al.^[10,11,13] untersuchten den Einfluss von O_3 und H_2O -Dampf auf die NO_2 -Nitrierungseffizienz von BSA und Proteinen aus Birkenpollenextrakt. Die Proteinnitrierung wurde durch Präsenz von O_3 und H_2O deutlich beschleunigt (Bildung von NO_3 und HNO_3). Nitrierungsgrade bis zu 10 % wurden nach 2-

wöchiger Begasung dieser Proteine mit schadstoffbelasteter Außenluft (Sommersmog-Bedingungen) beobachtet. Peroxyacetylnitrat (PAN) führt in der Flüssigphase zu einer Hydroxylierung und Nitrierung aromatischer Aminosäuren in freier und in BSA-gebundener Form. LIN et al.^[74] haben Peroxynitrit, das als reaktive Stickstoffverbindung in biologischen Systemen bekannt ist, als reaktives Intermediat von PAN vorgeschlagen. PAN besitzt ähnliche oxidierende Eigenschaften wie Peroxynitrit. Als weitere reaktive atmosphärische Nitrierungsspezies kann Nitrylchlorid (NO_2Cl), das durch heterogene Reaktion von N_2O_5 mit NaCl in Aerosolpartikeln enthalten ist, fungieren.^[75,76] NO_2Cl photolytisiert unter Einwirkung von Sonnenlicht zu NO_2 und Cl-Radikalen oder zerfällt heterolytisch zu Chloridanion und Nitrylkation. Diese Spezies addieren NO_2 nach Mechanismen der radikalischen bzw. elektrophilen Substitution an Phenole.^[72,75] Die Mechanismen der *in vivo*-Proteinnitrierung werden in *Abschnitt 2.4.1* genauer erläutert.

2.1.7 Gesundheitseffekte

Es ist bekannt, dass posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen, Hydroxylierungen und Phosphorylierungen im Allgemeinen die IgE-Reaktivität und das allergene Potential von Allergenen verändern und die Entwicklung von Autoimmunantworten - bei Veränderungen körpereigener Proteine - fördern.^[77-79]

Komponenten des photochemischen Smogs (NO_2 , O_3), feine Aerosolpartikel und pflanzliche Allergene können Entzündungsreaktionen in den Atemwegen induzieren, allergische Reaktionen sowohl der Früh- als auch der Spätphase verstärken und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen minimieren.^[6,7,80-82] Als Ursache werden synergetische Effekte von Luftschadstoffen und luftgetragenen Allergenen diskutiert. GRUIJTHUIJSEN et al.^[83] konnten in Tiermodellstudien mit dem Lebensmittelallergen Ovalbumin und dem Birkenpollenallergen Bet v 1, die im Rahmen dieser Arbeit am Institut für Wasserchemie der TU München nitriert wurden, zeigen, dass die *in vitro*-Proteinnitrierung das allergene Potential der Proteine verstärkt. Es wird angenommen, dass luftgetragene, durch Photooxidantien nitrierte Proteine nach Deposition in der Lunge zu einer Allergensensibilisierung bzw. allergischen Reaktion führen.^[13,83] Außerdem können körpereigene Proteine des Epitheliums der unteren Atemwege durch eingeatmete exogene RNS modifiziert werden. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung von Lungengewebe z. B. bei Kindern, verhindert die Regeneration des Gewebes bei einer bestehenden Lungenerkrankung und führt unter Umständen sogar zum Zelltod.^[84] Im Verlauf von entzündlichen Atemwegserkrankungen werden außerdem ROS und RNS *in vivo* generiert, die zu einem Fortbestand bzw. zu einer Verstärkung bereits bestehender allergischer Entzündungen führt.^[85]

2.2 AMINOSÄUREANALYTIK

2.2.1 Historische Bedeutung

Die ersten chromatographischen Trennungen von Aminosäuregemischen gehen auf Arbeiten von *MARTIN* und *SYNGE* in den Jahren 1941 und 1944 zurück.^[86,87] Zur damaligen Zeit wurden die neuen Techniken der Papier- und Verteilungschromatographie erstmalig angewendet. Die säulenchromatographische Analyse von N-Acetyl-Aminosäuren erfolgte mit Kieselgel als stationäre Phase. Die Trennung war jedoch aufgrund eines ausgeprägten *peak tailings* unzureichend. In darauffolgenden Experimenten zur Aufklärung der von *SYNGE* 1945 veröffentlichten Aminosäurezusammensetzung von Gramacidin S, einem cyclischen Decapeptid, wurde Kartoffelstärke als Träger verwendet und nichtderivatisierte Aminosäuren getrennt.^[88,89] Im Jahre 1952 erhielten *MARTIN* und *SYNGE* den Nobelpreis für ihre Entwicklung der Verteilungschromatographie. In den Jahren 1944-1953 arbeitete *SANGER* an der Aufklärung der Primärstruktur von Insulin, das aus 51 Aminosäuren aufgebaut ist. Außerdem führte er die Umsetzung von Peptiden mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol (DNP-Methode) zur Bestimmung N-terminaler Aminosäuren ein.^[90-93] 1958 erhielt er schließlich den Chemie-Nobelpreis für seine Arbeiten, die von signifikanter Bedeutung für die biochemische Wissenschaft waren.

Zur gleichen Zeit nahmen sich *STEIN* und *MOORE* die Arbeiten von *SYNGE* als Grundlage für die Entwicklung des ersten Aminosäureanalysators. Sie entwickelten einen automatischen Fraktionensammler und optimierten die Quantifizierung von Aminosäuren mit Mitteln der Ninhydrin-Reaktion.^[94,95] 1951 berichteten sie von der Anwendung des sulfonierten Polystyrolharzes Dowex-50 als stationärer Phase, so dass zahlreiche Nachteile der Stärke als Träger behoben werden konnten.^[96] Im Verlauf ihrer Arbeiten zur Aufklärung der Primärsequenz der Ribonuklease (124 Aminosäuren) wurden weitere technische Optimierungen vorgenommen.^[97,98] Die Analyse einer komplexen physiologischen Probe dauerte zu dieser Zeit rund 2 Tage. Schließlich wurden die ersten Aminosäureanalysatoren 1958 durch Beckman Instruments (Division Spinco) vertrieben.^[99] Die Analysezeit wurde durch weitere Verbesserungen auf 11 h reduziert. Heutzutage benötigt die ionenchromatographische Trennung mit kommerziell erhältlichen Aminosäureanalysatoren weniger als 2,5 h. 1972 erhielten *STEIN* und *MOORE* den Chemie-Nobelpreis „für ihren Beitrag zum Verständnis der Verbindung von chemischer Struktur und katalytischer Aktivität des aktiven Zentrums des Enzyms Ribonuklease“.^[100] Die Entwicklung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und *reversed phase*(RP)-Chromatographie schließlich führte zu einer signifikanten Beschleunigung der Proteinsequenzierung in den 70er Jahren und zur Etablierung der Vorsäulenderivatisierung in der Aminosäureanalytik.^[101,102]

2.2.2 Eigenschaften von Aminosäuren

Aminosäuren erfüllen im lebenden Organismus unterschiedlichste Funktionen. Sie dienen als Bausteine von Proteinen, Peptiden und anderen Naturstoffen wie z. B. Coenzymen und Antibiotika und sind als Signalstoffe und Zwischenprodukte im Metabolismus von großer Bedeutung. Unter den proteinogenen Aminosäuren versteht man ausschließlich die 20 Aminosäuren, die im genetischen Code enthalten sind und daher während der ribosomalen Proteinbiosynthese als Bausteine für Proteine berücksichtigt werden (*Abbildung 2.1*). Nach der RNA-Translation unterliegen sie zahlreichen Prozessen, den sogenannten post-translationalen Modifikationen, die sie hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften verändern. Die proteinogenen Aminosäuren besitzen mit Ausnahme von Glycin mindestens ein chirales Zentrum, das α -C-Atom, so dass zwei enantiomere Formen existieren. In der Natur kommt überwiegend die L-Form vor. Die Seitenketten von Isoleucin und Threonin enthalten ein weiteres Chiralitätszentrum. Aminosäuren sind polare Moleküle und besitzen mindestens zwei ionisierbare Gruppen. Am isoelektrischen Punkt liegen sie mit einer Nettoladung von null in zwitterionischer Form vor. Die Amino- und Carboxylgruppen sind also in geladenem Zustand. Aufgrund ihres ionischen Charakters werden Aminosäuren mittels Ionenchromatographie (IC) leicht getrennt. Die hohe Polarität jedoch erschwert die Trennung freier Aminosäuren mit Mitteln der RP-Chromatographie. Die Vorsäulen-derivatisierung ermöglicht aufgrund der Umsetzung mit hydrophoben Fluorophoren eine RP-Trennung und gleichzeitig eine empfindliche Fluoreszenz- oder UV-Detektion. Eine empfindliche UV/VIS-Detektion unmodifizierter Aminosäuren ist aufgrund der Abwesenheit von chromophoren Struktureinheiten mit hohen Extinktionskoeffizienten nicht gegeben. Das Molekulargewicht proteinogener Aminosäuren beträgt 75-204 g/mol (*Tabelle 2.2*).

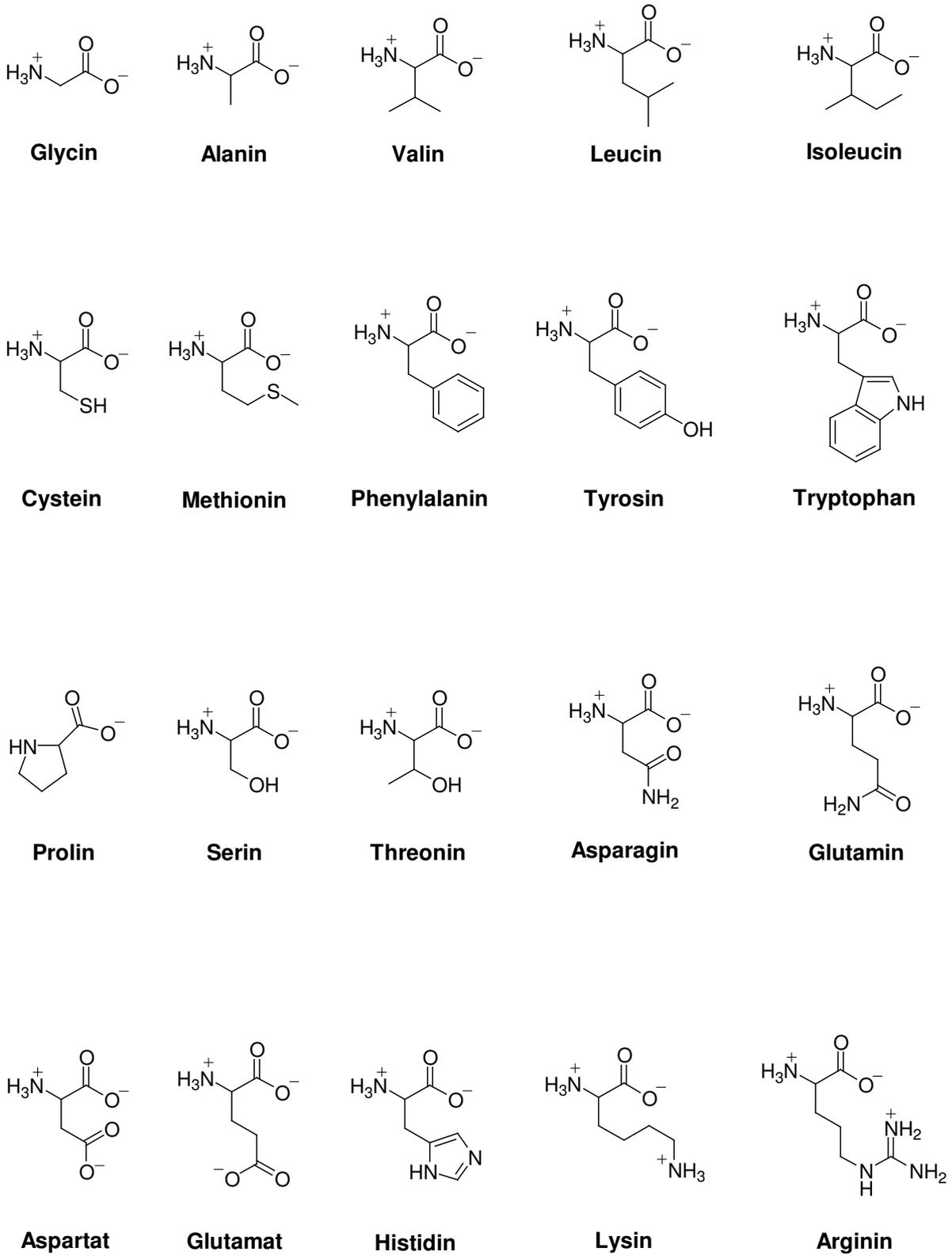


Abbildung 2.1: Strukturformeln der 20 proteinogenen Aminosäuren aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Polarität.

Tabelle 2.2: Übersicht der 20 proteinogenen Aminosäuren mit Drei- und Ein-Buchstabensymbolen, Summenformeln und ihrem Molekulargewicht in freiem und gebundenem Zustand.

AA	Buchstaben-Symbole		Summenformel ⁽¹⁾	Molekulargewicht ⁽¹⁾	
				frei	gebunden
[Da]					
unpolar, aliphatisch					
Glycin	Gly	G	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	57.05
Alanin	Ala	A	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09	71.08
Valin	Val	V	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	99.13
Leucin	Leu	L	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	113.16
Isoleucin	Ile	I	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	113.16
unpolar, schwefelhaltig					
Cystein	Cys	C	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.15	103.14
Methionin	Met	M	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21	131.19
unpolar, aromatisch					
Phenylalanin	Phe	F	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19	147.18
polar, aromatisch					
Tyrosin	Tyr	Y	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.19	163.18
Tryptophan	Trp	W	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.23	186.21
polar, cyclisch					
Prolin	Pro	P	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13	97.12
polar, neutral					
Serin	Ser	S	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09	87.08
Threonin	Thr	T	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12	101.10
Asparagin	Asn	N	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.12	114.10
Glutamin	Gln	Q	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.15	128.13
polar, sauer					
Aspartat	Asp	D	C ₄ H ₇ NO ₄	133.10	115.09
Glutamat	Glu	E	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13	129.12
polar, basisch					
Histidin	His	H	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.16	137.14
Lysin	Lys	K	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19	128.17
Arginin	Arg	R	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.20	156.19

(1) - in neutralem Ladungszustand

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nichtproteinogenen Aminosäuren Ornithin, 3-Nitrotyrosin, Norvalin, Norleucin und α -Methyltyrosin in die Methoden der Aminosäureanalytik integriert (Abbildung 2.2 und Tabelle 2.3).

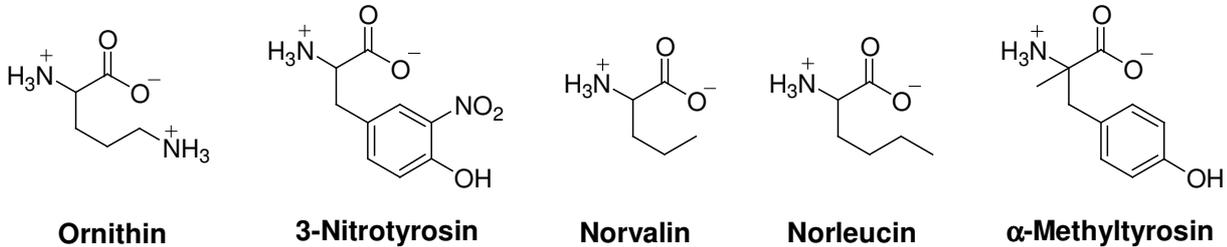


Abbildung 2.2: Strukturformeln analysierter bzw. als Hydrolyse- oder Derivatisierungsstandard eingesetzter nichtproteinogener Aminosäuren.

Norvalin, Norleucin und α -Methyltyrosin sind als Hydrolyse- bzw. Derivatisierungsstandards verwendet worden.

Tabelle 2.3: Übersicht analysierter bzw. als Hydrolyse- oder Derivatisierungsstandard eingesetzter nichtproteinogener Aminosäuren mit Abkürzungen, Summenformeln und ihrem Molekulargewicht in freiem und gebundenem Zustand.

AA	Abkürzung	Summenformel ⁽¹⁾	Molekulargewicht ⁽¹⁾	
			frei	gebunden
			[Da]	
Ornithin	Orn	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132.16	114.14
3-Nitrotyrosin	Ntyr	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₅	226.19	208.17
Norvalin	Nval	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	-
Norleucin	Nleu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	-
α -Methyltyrosin	Mtyr	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	195.22	-

(1) - in neutralem Ladungszustand

2.2.3 Ionenaustausch(IC)- und *Reversed Phase*(RP)-Chromatographie

Die klassische Methode zur Trennung von Aminosäuregemischen ist die Ionenaustausch(IC)-Chromatographie unter Anwendung von Kationenaustauschersäulen mit nachfolgender Ninhydrinderivatisierung. Sie erfolgt meist mit einem Natriumcitrat-Puffer, ist sehr robust und weniger störanfällig als RP-HPLC-Trennungen. IC-Säulen besitzen eine hohe

Lebensdauer und ermöglichen die Trennung von ca. 40 Aminosäuren. Ein Vorteil der Methode ist die Eliminierung von Matrixeffekten während der Derivatisierungsreaktion, da Matrixkomponenten von den Analyten zuvor abgetrennt werden. Zur Durchführung der Nachsäulenderivatisierung wird jedoch ein *online*-Reaktor benötigt, der aufgrund seines Totvolumens die Auflösung verschlechtert und ein höheres Basislinienrauschen verursacht. Die RP-Chromatographie unter Anwendung der Vorsäulenderivatisierung ermöglicht die Trennung von ca. 20 Aminosäuren. Die Analysezeiten sind deutlich kürzer als die der Ionenchromatographie. Ein Nachteil der Vorsäulenderivatisierung jedoch ist, dass die Matrix vor der Reaktion nicht abgetrennt wird und daher stets mit Matrixinterferenzen zu rechnen ist. Die Entscheidung für eine bestimmte Trennungsmethode ist überwiegend von der Anzahl der zu trennenden Aminosäuren und der zu analysierenden Proben abhängig. Die Wahl des Derivatisierungsreagenzes wird hingegen von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Zum einen sind die Empfindlichkeit und die Möglichkeit der Umsetzung von primären und sekundären Aminen mit dem Reagenz wichtige Auswahlkriterien. Sowohl die Stabilität des Reagenzes und der Derivate als auch der Einfluss der Matrix unter den Bedingungen der Trennung und Derivatisierung müssen bedacht werden. Im Falle der Proteinquantifizierung und -identifizierung muss die Kompatibilität der Derivatisierung mit den Reagenzien der Proteinhydrolyse in Erwägung gezogen und experimentell verifiziert werden. Außerdem kann das Reagenz und Nebenprodukte, die bei der Derivatisierungsreaktion entstehen, bei den entsprechenden Anregungs- und Detektionswellenlängen ebenfalls absorptive oder fluoreszierende Eigenschaften besitzen, die zu einer Störung der Analyse führen. Zur Kontrolle einer quantitativen Derivatisierung der Aminosäuren ist die Untersuchung der Reaktionskinetik und der pH-Abhängigkeit sinnvoll. Einen guten Überblick über die Methoden der allgemeinen Aminosäureanalytik geben die Übersichtsartikel von *OHKURA*^[103], *FOUNTOULAKIS*^[102], *WALKER*^[104] und *HUSEK*^[105].

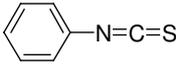
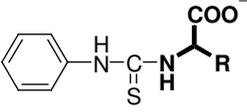
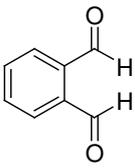
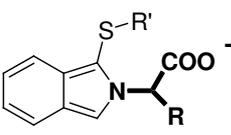
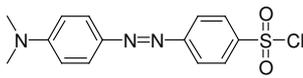
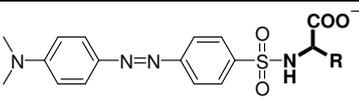
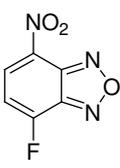
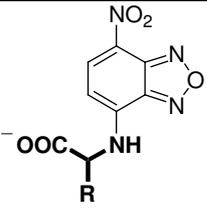
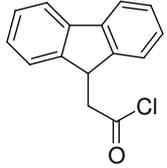
2.2.3.1 Vorsäulenderivatisierung

Für die Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren werden als Reagenzien u. a. Phenylisothiocyanat (PITC), *o*-Phthaldialdehyd (OPA), 4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonyl-chlorid (DABS-Cl), 4-Fluoro-7-nitro-benzoxadiazol (NBD-F) und 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (Fmoc-Cl) eingesetzt (*Tabelle 2.4*).

Die Analytik von primären und sekundären Aminosäuren als Phenylthiocarbamyl(PTC)-Derivate und deren Trennung mit der RP-HPLC gehen auf Arbeiten von *HEINRIKSON* et al.^[101] zurück. Die Überführung in die stabilen Derivate erfolgt mit PITC in einem Gemisch aus Alkohol, Wasser und Triethylamin bei RT für ca. 20 min.^[106,107] Die Detektion erfolgt im UV-Bereich bei 254 nm und ist relativ unempfindlich im Vergleich zu den Fluoreszenz-

methoden.^[104] PITC wird auch für die *EDMAN*-Sequenzierung von Peptiden verwendet (Abschnitt 2.2.6.1).

Tabelle 2.4: Reagenzien für die Vorsäulenderivatisierung.

Reagenz	Struktur (Reagenz)	Struktur (Derivat)	$\lambda_{An}/\lambda_{De}$ [nm]	Empfindlichkeit [pmol]
PITC			-/254	10-40 ^[107]
OPA			330/460	0.05 ^[108,109] 0.2-1.1 ^[110]
DABS-Cl			-/436	0.5 ^[111]
NBD-F			470/530	0.01-0.1 ^[112,113]
FMOC-Cl			266/305	0.03 ^[114] 0.1-0.2 ^[115]

OPA bildet mit primären Aminen und Thiolen wie 2-Mercaptoethanol, 3-Mercaptopropion- säure (MPA) und N-Acetyl-L-Cystein (NAC) fluorezierende thiol-substituierte Isoindolde- rivate. Die Derivatisierung wird in Borat-Puffer (pH = 9.5) bei RT in 1-2 min durchgeführt.^[108- 110,116] Mit Mitteln der RP-Chromatographie können 25 OPA-Aminosäurederivate innerhalb von 35 min getrennt werden. Die Fluoreszenz wird bei 330-340 nm angeregt, die Detektion erfolgt je nach verwendetem Thiol und HPLC-Eluenten bei 420-460 nm. Die Deriva- tisierungen von Aminosäuren mit OPA/MPA und OPA/NAC wurden von *MOLNÁR-PERL* hinsichtlich Fluoreszenz-Response und Retentionseigenschaften auf sechs verschiedenen HPLC-Säulen charakterisiert.^[117,118] Außerdem wurden in zwei weiteren Publikationen dieser Arbeitsgruppe Optimierungen der Derivatisierung und Stabilitätsstudien der Derivate veröffentlicht.^[119,120] Demnach sind ein Verhältnis der in der Reaktionslösung vorhandenen

Stoffmengen von OPA zu Aminosäuren von größer als 20 und der Stoffmengen von Thiol zu OPA von 3 sowie eine Reaktionszeit von mind. 7 min für eine quantitative Umsetzung zu empfehlen. Die Instabilität von Aminosäuren wie Glycin, γ -Aminobuttersäure, β -Alanin, Histidin, Lysin und Ornithin, die CH_2 -Wasserstoffatome in der α -Position zu einer Amino-Gruppe besitzen, ist auf die Anlagerung von weiteren OPA-Molekülen zurückzuführen. Zur Stabilisierung von Lysin während der Umsetzung wird von JONES et al.^[109] Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt.

Sekundäre Amine können mit OPA nicht bestimmt werden. UMAGAT^[110] und NEMATI et al.^[116] beschreiben die kombinierte Derivatisierung mit OPA und NBD-Cl zur simultanen Detektion primärer und sekundärer Amine. In einer Studie von SCHWARZ et al.^[121] wird eine kombinierte OPA/FMOC-Cl-Vorsäulenderivatisierung und RP-HPLC-Trennung als Alternative zu der klassischen ionenchromatographischen Ninhydrin-Methode vorgeschlagen.

Eine empfindliche UV-Detektion von primären und sekundären Aminen wird durch das DABS-Chromophor ermöglicht.^[111,122] Die Derivatisierung von Aminosäuren gelingt mit DABS-Cl in Natriumcarbonat-Puffer (pH = 8.0) bei 70 °C innerhalb von 10 min. DABS-Cl wird für eine quantitative Umsetzung in Acetonitril in einem 4fachen Überschuss zu den Aminosäuren vorgelegt. Das Hydrolyseprodukt von DABS-Cl besitzt ebenfalls eine Absorption bei 436 nm und stört die Trennung. Ein im Vergleich zu der OPA-Derivatisierung großer Vorteil der Methode ist die wochenlange Stabilität der DBS-Derivate.

Substituierte 2,1,3-Benzoxadiazole (Benzofurazane) besitzen ausgezeichnete Fluoreszenzeigenschaften und reagieren je nach Substituent mit einer Reihe von Nukleophilen wie Aminen, Thiolen und Carbonsäuren.^[123-126] 4-Fluoro-7-nitro-benzoxadiazol (NBD-F) wurde von IMAI und WATANABE eingeführt und wird für die Fluoreszenzmarkierung von primären und sekundären Aminosäuren verwendet.^[112,113,127,128] Die Derivatisierung erfolgt in Borat-Puffer bei pH = 8.0-9.5 mit einem Anteil an organischem Lösungsmittel wie Ethanol, Methanol oder Acetonitril bei 60 °C in 1-3 min. Sekundäre Amine zeigen eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit und -temperatur. NBD-F ist selbst nicht fluoreszent, sein Hydrolyseprodukt NBD-OH jedoch interferiert bei der Anregungs- und Detektionswellenlänge der NBD-Aminosäuren und stört die Trennung.^[110,128] Vorteile sind die unter Lichtausschluss hohe Stabilität der Derivate und die hohe Empfindlichkeit.

Die Derivatisierung von Aminosäuren mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(FMOC)-chlorid erlaubt einen empfindlichen Nachweis von primären und sekundären Aminosäuren im mittleren fmol-Bereich.^[115] Die Reaktion wird ebenfalls in Borat-Puffer (pH = 8.0) bei RT durchgeführt, die Derivatisierungszeit beträgt rund 1 min.^[114] Die Anregung erfolgt in der Regel bei 266 nm, die Detektion bei 305 nm.^[121] FMOC-Cl und sein Hydrolyseprodukt FMOC-OH sind jedoch selbst fluoreszent und stören die Trennung. Das Derivatisierungsreagenz kann durch organische Extraktion oder durch Reaktion mit 1-Adamantylamin oder Hydroxylamin eliminiert werden.

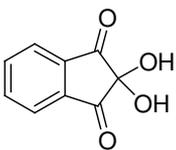
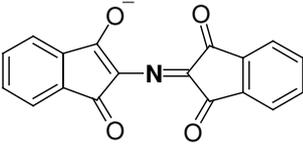
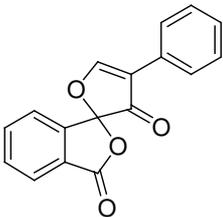
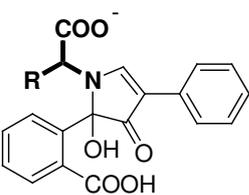
Ein weiteres Problem ist die Quantifizierung von Histidin und Tyrosin aufgrund ihrer Mono- und Disubstitution. *BANK et al.*^[115] beschreiben eine Derivatisierungsmethode in Borat-Puffer (pH = 11.4) und einer Reaktionszeit von 40 min, die diese Probleme teilweise behebt. Zusätzlich kann das Basislinienrauschen durch eine Detektion bei 630 nm deutlich reduziert werden. Die Aminosäurederivate sind bis zu 48 h stabil.

MIYANO et al.^[129] untersuchten den Einfluss von Metallionen auf die Derivatisierung von Aminosäuren mit NBD-F, OPA, 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (DNS-Cl) und Fluorescamin. NBD-F erwies sich als das gegenüber Cu^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen empfindlichste Reagenz. Die Reaktion mit Histidin und Aspartat wird erheblich unterdrückt. OPA ist mit Ausnahme der Umsetzung von Histidin das zuverlässigste der untersuchten Reagenzien. Die Addition eines 10fachen Überschusses an EDTA relativ zu in der Probe anwesenden Metallionen zu der Derivatisierungslösung eliminiert die Matrixeffekte.

2.2.3.2 Nachsäulenderivatisierung

Das aus historischer Sicht bedeutendste Reagenz für die quantitative Detektion von Aminosäuren nach ionenchromatographischer Trennung ist Ninhydrin (*Tabelle 2.5*).^{[95] [130]}

Tabelle 2.5: Reagenzien für die Nachsäulenderivatisierung

Reagenz	Struktur (Reagenz)	Struktur (Derivat)	$\lambda_{\text{An}}/\lambda_{\text{De}}$ [nm]	NWG [pmol]
Ninhydrin			-/570 -/440	50 ^[131]
Fluorescamin			390/475	20 ^[132]
OPA	siehe <i>Tabelle 2.4</i>		330/460	1-10 ^[102,104]

Zuvor hat es sich bereits zur qualitativen Detektion von Aminosäuren in der Papierchromatographie bewährt. Alle primären Amine bilden das gleiche blauviolette Derivat, das sogenannte Ruhemanns Violett, das lediglich das Stickstoffatom der Aminosäure enthält. Es besitzt ein Absorptionsmaximum bei 440 nm. Sekundäre Amine reagieren zu einem anderen Ninhydrinderivat, das bei 570 nm am empfindlichsten detektiert wird. Ninhydrin

absorbiert bei diesen Wellenlängen nicht, kann daher ohne Probleme für die Nachsäulenderivatisierung verwendet werden. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Robustheit und Reproduzierbarkeit aus. Nachteil der Methode ist seine geringe Empfindlichkeit.

Fluorescamin wurde als Reagenz für die Nachsäulenderivatisierung entwickelt, um einen gegenüber Ninhydrin empfindlicheren Nachweis von Aminosäuren zu erreichen.^[132] Es reagiert nur mit primären Aminen und ist nicht fluoreszent. Die Derivatisierung erfolgt in Borat-Puffer (pH = 9-10) bei RT und ist unmittelbar vollständig. Ein Problem ist, dass Fluorescamin in Wasser schnell hydrolysiert und daher der Derivatisierungspuffer und Fluorescamin in organischem Lösungsmittel nach der Säule separat zu dem IC-Eluenten dosiert werden müssen.^[133] Dies schränkt seinen Einsatz in der Aminosäureanalytik entscheidend ein, zudem ist seine Empfindlichkeit nicht signifikant besser als der von Ninhydrin.

Ein weiteres Reagenz für die Nachsäulenderivatisierung ist OPA, dessen Eigenschaften bereits in *Abschnitt 2.2.3.1* näher beschrieben wurde. Sekundäre Amine wie Prolin und Hydroxyprolin werden durch Oxidation mit Natriumhypochlorit oder Chloramin-T in die Aminosäurebestimmung einbezogen.^[134] *BENSON* et al.^[133] haben OPA, Fluorescamin und Ninhydrin in einer experimentellen Studie miteinander verglichen. Der entscheidende Vorteil von OPA ist seine hohe Stabilität in Wasser und eine rund 10fache höhere Empfindlichkeit gegenüber Fluorescamin und Ninhydrin.

2.2.4 Andere Analysemethoden

Die Anionenaustauschchromatographie mit gepulster elektrochemischer Detektion (HPAEC-PAD) ermöglicht eine direkte Detektion von Aminosäuren ohne Vor- oder Nachsäulenderivatisierung. Diese Technik wurde erstmals 1983 von *POLTA* und *JOHNSON* beschrieben.^[135] *JANDIK* et al.^[136,137] entwickelten die Methode unter Verwendung der integrierenden gepulsten Amperometrie (IPAD) weiter. Die erreichbaren Nachweisgrenzen liegen im Bereich von 7-145 nM für proteinogene Aminosäuren.^[10]

Aminosäureanalytik wird ebenfalls mit gaschromatographischen Techniken betrieben. Vorteile sind die deutlich höhere Auflösung und kürzere Analysezeiten im Vergleich zu den IC- und RP-Methoden. Aminosäuren sind schwerflüchtige, bei hohen Temperaturen instabile Verbindungen und müssen daher in leichtflüchtige Verbindungen - meist in ihre N-Acyl-Aminosäurealkylester - überführt werden.^[138-141] Derivatisierungsmethoden für die GC-MS-Analyse werden in *Abschnitt 2.4.3.4* am Beispiel der Nitrotyrosinanalytik erläutert. Eine hohe Selektivität wird in Abhängigkeit der Derivatisierungsreagenzien durch die Verwendung unterschiedlicher Detektoren wie des Flammenionisations- (FID), des Elektroneneinfang-

(ECD), des Stickstoff-Phosphor- (NPD) und des massenselektiven (MS) Detektors gewährleistet.

Aminosäuren können außerdem in nichtderivatisierter Form flüssigchromatographisch getrennt werden. Langkettige perfluorierte Alkylcarbonsäuren wie z. B. Nonafluorpentan- und Tridecafluorheptansäure werden als flüchtige Ionenpaarreagenzien eingesetzt, um eine Retention nichtderivatisierter Aminosäuren mit einer akzeptablen Auflösung auf hydrophoben stationären Phasen zu erreichen. Als Trennphasen wurden in Studien der Arbeitsgruppe von *DREUX*^[142,143] kommerzielle C8- und C18-RP-Säulen und poröse Graphitsäulen (PGC) getestet. PGCs besitzen eine höhere Hydrophobizität als die klassischen RP-Materialien und aufgrund des graphitischen π -Elektronensystems eine verbesserte Selektivität gegenüber Analyten mit konjugierten Struktureinheiten. Die LC-Systeme der genannten Studien wurden mit einem evaporativen Lichtstreuungs(ELSD)-Detektor und einem API-MS-Gerät gekoppelt. Die MS-Detektion der Aminosäuren erfolgt im positiven Ionisierungsmodus mit höherer Empfindlichkeit als im negativen Ionisierungsmodus. Die Nachweisgrenzen liegen bei der LC-ELSD- und LC-API-MS-Methode bei 0.03 bzw. 0.06-0.26 nmol. In einer Studie von *PETRITIS et al.*^[144] wurden sieben Detektoren zum Nachweis von nichtderivatisierten Aminosäuren getestet.

Die Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren wurde auch in Kombination mit der LC-ESI-MS-Analyse angewendet. OPA/MPA-Aminosäurederivate besitzen im negativen ESI-Modus eine zur Fluoreszenz-Response vergleichbaren Ionisierungsausbeute. Nach *VAN EIJK et al.*^[145] wird eine Empfindlichkeit im unteren pmol-Bereich erzielt. Die RP-LC-Analyse erfolgt mit einem flüchtigen Ammoniumacetat-Puffer mit einem Anteil an organischem Lösungsmittel. Nicht-flüchtige Komponenten der Derivatisierungslösung werden vor Eintritt in die Ionierungsquelle mit einer entsprechenden Fluidikschaltung entfernt. *GARTENMANN et al.*^[146] modifizierten Aminosäuren mit FMOC-Cl vor ihrer RP-chromatographischen Trennung und Analyse im ESI-MS. Die Empfindlichkeit konnte auf diese Weise um einen Faktor 100 auf 100-500 pmol gegenüber den nichtderivatisierten Aminosäuren gesteigert werden. FMOC-Aminosäuren besitzen außerdem gute Retentionseigenschaften, so dass eine empfindliche Analyse der proteinogenen Aminosäuren mit guter Trennleistung möglich ist.

2.2.5 Proteinhydrolyse

Proteine werden unter sauren, alkalischen oder enzymatischen Bedingungen in Aminosäuren gespalten.^[102]

2.2.5.1 Saure Proteinhydrolyse

Die konventionelle Proteinhydrolyse verwendet 6 M Salzsäure als Hydrolysemedium und wird bei 110° C im Vakuum für 20 bis 24 h meist in Flüssigphase durchgeführt (*Tabelle 2.6* und *Tabelle 2.7*).^[102,147]

Tabelle 2.6: Bedingungen der sauren Proteinhydrolyse..

Hydrolysemedium	Hydrolysebedingungen ⁽⁷⁾	Aminosäuren ⁽⁹⁾	Referenz
Konventionelle Proteinhydrolyse			
6 M HCl	105° C 20, 36, 70 h	Asx ⁽¹⁾ , Cys ⁽²⁾ , Lys ⁽¹⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Thr ⁽¹⁾	[148]
6 M HCl	105° C 20, 70, 140 h	Asx ⁽¹⁾ , Cys ⁽²⁾ , Glx ⁽¹⁾ , Lys ⁽¹⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Thr ⁽¹⁾	[149]
6 M HCl	110° C 22, 70 h	Arg ⁽¹⁾ , Asx ⁽¹⁾ , Cys ⁽³⁾ , Glx ⁽¹⁾ , Pro ⁽¹⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Thr ⁽¹⁾ , Tyr ⁽¹⁾	[150]
6 M HCl	110° C 22, 70 h	(4)	[151]
6 M HCl	110° C 20-140 h	Cys ⁽⁵⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Thr ⁽¹⁾	[152]
6 M HCl	110° C 24-141 h	Cys ⁽¹⁾⁽³⁾ , Met ⁽¹⁾⁽³⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Thr ⁽¹⁾	[153]
Proteinhydrolyse in Salzsäure mit Additiven			
6 M HCl, 1 % 2-Mercaptoethanol, 3 % Phenol	145° C 4 h	Trp ⁽¹¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Tyr ⁽¹¹⁾ , Cys ⁽¹⁰⁾	[154]
6 M HCl, 0.4 % 2-Mercaptoethanol	110° C 24 h	Trp ⁽¹¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Tyr ⁽¹¹⁾ , Cys ⁽¹⁰⁾	[155]
6 M HCl, 3 % (w/v) Phenol	166° C 25 min	Trp ⁽¹¹⁾ , Tyr ⁽¹¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Cys ⁽¹⁰⁾	[156]

(1) - Extrapolation gegen t = 0; (2) - Schwefelbestimmung; (3) - nach Oxidation mit Perameisensäure als Methioninsulfon bzw. Cysteinsäure; (4) - alle proteinogenen Aminosäuren (Met⁽³⁾, Cys⁽³⁾) mittels Hydrolysekinetik mit Ausnahme von Trp; (5) - als S-Carboxymethylcystein; (6) - siehe *Tabelle 2.7*; (7) - Flüssigphasenhydrolyse meist unter Vakuum bzw. Schutzgas; (8) - siehe *Tabelle 2.7*; (9) - i.d.R. wurden in der zitierten Literatur alle proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Trp bestimmt, Besonderheiten in der Bestimmung individueller Aminosäuren sind vermerkt; (10) - keine Bestimmung möglich; (11) - höhere Stabilität.

Der Vorteil der Gasphasenhydrolyse besteht in einer höheren Empfindlichkeit aufgrund der Reduzierung von Kontaminationen.^[111] Ein Einfluss auf die individuelle Stabilität oder Hydrolyseeigenschaften der Aminosäuren ist nicht gegeben.^[167] Die Säureamidfunktionen von Asparagin und Glutamin werden unter den Bedingungen der konventionellen Proteinhydrolyse vollständig in die entsprechenden Carbonsäuren überführt.

Tabelle 2.7: Bedingungen der sauren Proteinhydrolyse.

Hydrolysemedium	Hydrolysebedingungen ⁽⁷⁾	Bemerkungen ⁽⁹⁾	Referenz
Proteinhydrolyse in Salzsäure/organischer Säure			
12 M HCl TFA (2:1)	166 °C 25, 50 min	Ile, Leu, Val, Met ⁽¹⁰⁾ , Cys ⁽¹⁰⁾	[157]
7 M HCl 10 % TFA 0.1 % Phenol	158 °C 25, 45 min ⁽⁸⁾	Ile, Leu, Val, Met ⁽¹⁰⁾ , Cys ⁽¹⁰⁾	[158]
12 M HCl Propionsäure (1:1)	130 °C 2 h	Harz-gebundene Peptide	[159]
4 M HCl 9 M Propionsäure	110 °C 24 h	Dityrosin	[160]
12 M HCl TFA (2:1) 5 % (v/v) Thioglycolsäure	166 °C 25, 50, 75 min	Trp ⁽¹¹⁾⁽¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Thr ⁽¹⁾ , Cys ⁽⁵⁾	[161]
24 % HCl 60 µM Thioglycolsäure (5:1)	150 °C 10, 30 min (Mikrowelle)	Trp ⁽¹¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Ser ⁽¹⁾ , Cys ⁽³⁾	[162]
Proteinhydrolyse in Sulfonsäuren			
4 M Methansulfonsäure	160 °C 45 min	Trp ⁽¹¹⁾ , Tyr ⁽¹¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Cys ⁽¹¹⁾	[163]
4 M Methansulfonsäure 0.2 % 3-(2-Aminoethyl)- indol	110 °C 24 h	Trp ⁽¹¹⁾	[164]
4 M Methansulfonsäure 0.2 % 3-(2-Aminoethyl)- indol	155 °C 4 min (Mikrowelle)	Trp ⁽¹¹⁾ , Ser, Thr	[164]
4 M Methansulfonsäure 0.2 % 3-(2-Aminoethyl)- indol	115 °C 22 h	Trp ⁽¹¹⁾ , Tyr ⁽¹¹⁾ , Met ⁽¹¹⁾ , Cystin ⁽⁶⁾ , Cys ⁽⁵⁾	[165]
3 M <i>p</i> - Toluolsulfonsäure 0.2 % 3-(2-Aminoethyl)- indol	110 °C 22, 48, 72 h	Trp ⁽¹¹⁾ , Ser ⁽¹¹⁾ , Thr ⁽¹¹⁾	[166]

(1) - Extrapolation gegen $t = 0$; (2) - Schwefelbestimmung; (3) - nach Oxidation mit Perameisensäure als Methioninsulfon bzw. Cysteinsäure; (4) - alle proteinogenen Aminosäuren (Met⁽³⁾, Cys⁽³⁾) mittels Hydrolysekinetik mit Ausnahme von Trp; (5) - als S-Carboxymethylcystein; (6) - als Cysteinsulfat nach DTT-Reduktion und Oxidation mit Tetrathionat; (7) - Flüssigphasenhydrolyse meist unter Vakuum bzw. Schutzgas; (8) - Gasphasenhydrolyse; (9) - i.d.R. wurden in der zitierten Literatur alle proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Trp bestimmt, Besonderheiten in der Bestimmung individueller Aminosäuren sind vermerkt; (10) - keine Bestimmung möglich; (11) - höhere Stabilität.

Ihre Detektion erfolgt daher gemeinsam mit Aspartat und Glutamat (Asp + Asn = Asx, Glu + Gln = Glx). Tryptophan wird aufgrund seiner säureempfindlichen Indoleinheit

vollständig zerstört, für seine Bestimmung müssen Additive in das Hydrolysemedium zugeben oder andere Methoden angewendet werden (*Abschnitt 2.2.5.3*). Serin, Threonin und Tyrosin zählen zu den säurelabilen Aminosäuren. Durch Extrapolation von Hydrolysekinetikdaten kann ihr Gehalt in der untersuchten Probe ermittelt werden (*Abschnitt 2.2.5.4*). Die Säurelabilität von Tyrosin ist z. T. auf Kontaminationen in der Salzsäure zurückzuführen, die zur Bildung von 3-Chlor- und 3-Brom-tyrosin führen, daher empfiehlt sich stets eine Destillation der Salzsäure vor der Hydrolyse. Die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin aus dem Protein erfolgt in der Regel sehr langsam, vor allem wenn diese in hydrophoben Proteinbereichen als Ile-Ile, Val-Val und Ile-Val gebunden vorliegen. Diese werden bei einer Hydrolysedauer von 24 h systematisch unterbestimmt. Die vollständige Freisetzung ist vom Protein abhängig und erfordert verlängerte Hydrolysezeiten von über 72 h. Methionin und Cystein sind sehr oxidationsanfällig und müssen vor der Hydrolyse quantitativ in stabilere Verbindungen durch Oxidation bzw. Alkylierung überführt werden (*Abschnitt 2.2.5.2*).

Als Hydrolysemedium werden neben reiner halbkonzentrierter Salzsäure sowohl ein Gemisch aus Salz- und organischer Säure als auch reine Sulfonsäuren verwendet. Der Anteil an organischer Säure bewirkt, dass hydrophobe Proteinbereiche leichter zugänglich sind und eine Spaltung hydrophober Peptidbindungen schneller erfolgt. Dies verkürzt in Verbindung mit einer höheren Hydrolysetemperatur die Hydrolysezeit. *TSUGITA et al.*^[157] testeten den Einfluss von Ameisen-, Essig-, Trifluoressig- und Propionsäure auf die Freisetzung von hydrophoben Dipeptiden und (Lipo-)proteinen. Die Aminosäurewiederfindungen inkl. der hydrophoben Aminosäuren bei Hydrolyse in einer 2:1-Lösung aus HCl und TFA (166° C, 25 min) sind vergleichbar mit denen der konventionellen Methode (110° C, >24 h). Eine signifikante Verbesserung der Wiederfindungen der säurelabilen Aminosäuren wurde jedoch nicht beobachtet.^[159]

Methansulfon- und *p*-Toluolsulfonsäure sind starke, nicht-oxidierende Säuren und werden ebenfalls als Hydrolysemedium in der Proteinhydrolyse angewendet. Der wesentliche Vorteil besteht in der erhöhten Stabilität der säurelabilen Aminosäuren Tryptophan, Methionin und Cystein.^[163,164] *SIMPSON et al.*^[165] beschreibt eine Methode in Methansulfonsäure, die 3-(2-Aminoethyl)indol enthält, und die Bestimmung der kompletten Aminosäurezusammensetzung aus einem einzigen Hydrolysat ermöglicht. Ein Nachteil der Sulfonsäuren jedoch ist ihre Schwerflüchtigkeit. Vor der chromatographischen Analyse muss stets der pH-Wert eingestellt und das Hydrolysat verdünnt werden. Daher ist die Empfindlichkeit bei Verwendung von Sulfonsäuren niedriger, da große Mengen an Protein benötigt werden.

In der Proteinhydrolyse werden zahlreiche Additive eingesetzt. Phenol, das in Salzsäure bis zu einem Anteil von 4 % löslich ist, wird zur Stabilisierung von Tyrosin verwendet.^[158,168] In einer Studie von *MURAMOTO et al.*^[156] wurden bei Zusatz von 3 % Phenol sogar Tryptophan

und Methionin in hohen Ausbeuten wiedergewonnen. 2-Mercaptoethanol stabilisiert diese Aminosäuren in salzsaurer Lösung ebenso wie Thioglycolsäure.^[154,155,161,162] Diese Methoden stellen daher eine Alternative zu der Hydrolyse in Methansulfonsäure dar. Der Einsatz von Indolderivaten wird zudem auch zur Bestimmung von Tryptophan herangezogen.

Eine Verkürzung der Hydrolysezeit der konventionellen Proteinhydrolyse kann neben einer höheren Hydrolysetemperatur oder eines anderen Hydrolysemediums durch die Verwendung einer Mikrowelle erreicht werden. *KROLL* et al.^[169] führten die mikrowelleninduzierte Hydrolyse von Myoglobin (15 mg) in 6 M HCl in der Flüssigphase bei 130 °C (2.5-3 bar) durch und reduzierte die Hydrolysezeit auf 120 min. *JOERGENSEN* et al.^[162] hydrolysierten Standardproteine (20-50 mg) in 6 M HCl bei 150 °C (3-4.5 bar) für 30 min. Die erzielten Ergebnisse sind mit denen der konventionellen Methode vergleichbar.^[162,164,169,170] Die Verwendung von Sulfonsäuren als Hydrolysemedium ist ebenfalls möglich, so konnten *PECAVAR* et al.^[171] eine Reduzierung der Hydrolysezeit auf 15 min mit *p*-Toluolsulfonsäure erreichen. Die Wiederfindungen inkl. der säurelabilen Aminosäuren Tryptophan, Serin, Threonin und der hydrophoben Aminosäuren des hydrolysierten Pentapeptids beliefen sich auf Werte >90 %.

Die Proteinhydrolyse ist in der Regel der arbeitsaufwendigste Probenvorbereitungsschritt der Analytik proteingebundener Aminosäuren. Sie ist sehr anfällig für systematische Fehler. Zur Korrektur von Probenverlusten wird daher ein interner Standard (z.B. Norleucin) zu der Hydrolyselösung addiert.^[172] In einer Studie von *GARDNER* et al.^[173] erhöht ein Hydrolysestandard sowohl die Präzision als auch die Genauigkeit der Aminosäureanalyse deutlich. Fehler, die während der Vor- bzw. Nachsäulenderivatisierung auftreten, können so ebenfalls korrigiert werden. Die Stabilitäten proteinogener Aminosäuren sind abhängig von der Matrixbeschaffenheit der Realprobe und den Hydrolysebedingungen. Potentielle chemische Interaktionen sind die Maillard-Reaktion, Protein-Phenol-Wechselwirkungen, Metall-katalysierte Nebenreaktionen und radikalische Reaktionen.^[102,162,174-177] Die Aminosäurewiederfindung in der Realprobe kann daher von der eines reinen Standardproteins in Wasser variieren.

2.2.5.2 Bestimmung von Cystein und Methionin

Cystein und Methionin unterliegen in Salzsäure einer Zersetzung aufgrund von Nebenreaktionen. Methionin reagiert unter partieller Oxidation zu Methioninsulfoxid, das wiederum in salzsaurer Lösung nicht stabil ist.^[178,179] Sie werden daher in stabilere Derivate überführt. Beide Aminosäuren können durch Oxidation mit Perameisensäure zu Cysteinsäure bzw. Methioninsulfon umgesetzt werden. Diese Verbindungen sind in salzsaurer Lösung stabil.^[147,150,151,162,179,180] Eine Stabilisierung von Tyrosin, Phenylalanin und Histidin, die unter diesen Bedingungen ebenfalls oxidiert werden, wird durch eine Phenol-Zugabe erreicht.^[162]

Als weiteres Mittel der quantitativen Oxidation von Cystein zu Cysteinsäure steht der Einsatz von 0.2 % Natriumazid als Hydrolyseadditiv in Salzsäure zur Verfügung.^[181] Cystein kann außerdem in das stabile S-Carboxymethylderivat mit Iodessigsäure umgesetzt werden (Abbildung 2.3).^[152,165] Eine Methode der parallelen Bestimmung von Cystein und Cystin beschreibt SIMPSON et al.^[165]. Nach Alkylierung der freien Thiolgruppen von Cysteinen mit Iodessigsäure zu S-Carboxymethylcystein und Hydrolyse erfolgt die Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion mit DTT. Anschließend werden die freigewordenen Cysteine mit Natriumtetrathionat zu Cysteinsulfat oxidiert und bestimmt.

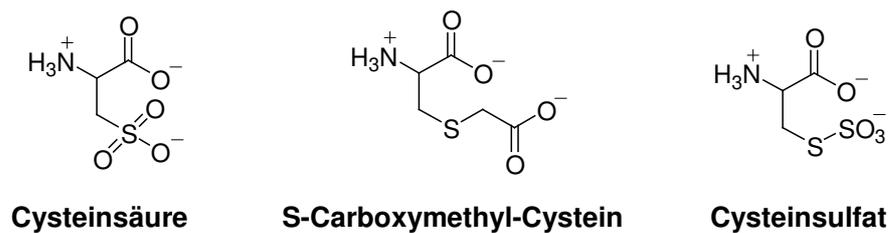


Abbildung 2.3: Nachweis von Cystein nach Oxidation mit Perameisensäure als Cysteinsäure und nach Alkylierung mit Iodessigsäure als S-Carboxymethyl-Cystein und Cystin nach Reduktion mit DTT und Oxidation mit Tetrathionat als Cysteinsulfat nach SIMPSON^[165].

2.2.5.3 Bestimmung von Tryptophan

Die Tryptophanbestimmung kann im Rahmen einer Aminosäureanalytik, die die Proteinidentifizierung als Ziel hat, von entscheidendem Vorteil sein. Eine Quantifizierung sogenannter *low abundance*-Aminosäuren, zu denen Tryptophan gehört, führt bei einem Datenbankabgleich in der Regel zu einer eindeutigen Identifizierung des Proteins.^[164] Bei der konventionellen Proteinhydrolyse wird Tryptophan allerdings aufgrund der Anwesenheit von Restsauerstoff und Spuren oxidierter Chlorspezies im Hydrolysemedium vollständig zerstört. Durch Zusatz von β -Mercaptoethanol^[154,155], Phenol^[156], Thioglycolsäure^[161,162], 3-(2-Aminoethyl)-indol^[182] und anderer Additive als Radikalfänger wird Tryptophan signifikant stabilisiert und Wiederfindungen von 80-100 % sind möglich. Quantitative Wiederfindungen von 90-100 % von Tryptophan werden in Sulfonsäuren als Hydrolysemedium in Kombination mit Additiven erreicht.^[163,165,166,182] In Anwesenheit von Sacchariden entzieht sich Tryptophan selbst unter Anwesenheit von Radikalfängern der Analyse.^[155,182] In diesem Fall eignet sich die alkalische Hydrolyse in 4.2 M NaOH bei 110 °C für 22 h bzw. 16 h.^[183,184] Stärke, Lactose und Ascorbinsäure werden häufig als Antioxidantien eingesetzt. Die Wiederfindungen von Tryptophan sind nahezu quantitativ. Als Hydrolysemedien können auch wässrige Lösungen von Ba(OH)₂, LiOH und KOH verwendet werden. Nachteil der alkalischen Hydrolyse ist die Zerstörung von Serin, Threonin, Arginin und Cystein.^[102] Eine alternative Methode stellt die spektrophotometrische Bestimmung von proteingebundenem Tryptophan nach EDELHOCH^[185] dar. Sie beruht auf experimentellen

molaren Extinktionskoeffizienten von Modellsustanzen für Tryptophan, Tyrosin und Cystin in Proteinen bei 288 nm unter denaturierenden Bedingungen (*Gleichung 2.1*).

$$\varepsilon_{mol}(288) = 4815 \cdot \#Trp + 385 \cdot \#Tyr + 72.5 \cdot \#Cystin$$

Gleichung 2.1: Molarer Extinktionskoeffizient ε_{mol} eines denaturierten Proteins bei 288 nm in einer Lösung von 6 M Guanidin-HCl und 20 mM Phosphat-Puffer (pH = 6.5) nach EDELHOCH.^[185]. # = Aminosäureanzahl.

Die Anzahl von Tryptophan je Proteinmolekül kann durch eine Absorptionsmessung bei 288 nm präzise ermittelt werden, sofern der Tyrosin- und Cystingehalt als auch dessen Konzentration in Lösung bekannt ist. Andere spektrophotometrische Methoden der Tryptophanbestimmung mit und ohne chemischer Derivatisierung wurden von MOLNÁR-PERL^[182] zusammengefasst.

2.2.5.4 Hydrolysekinetik

Aminosäuren sind während der Proteinhydrolyse zwei zeitgleichen chemischen Prozessen unterworfen. Sie werden aus dem Protein freigesetzt und unterliegen einer Zersetzung durch das Hydrolysemedium. Der Nettoeffekt beider Prozesse spiegelt sich in der Aminosäurewiederfindung zum Zeitpunkt der Detektion wider. Die Entscheidung für den Endzeitpunkt einer Hydrolyse ist daher stets ein Kompromiß. Die Vorgänge der Hydrolyse lassen sich mit Hilfe des „Kompartimentmodells“ von ROBEL^[186] anschaulich beschreiben (*Abbildung 2.4*).



Abbildung 2.4: Kompartimentansatz zur Veranschaulichung des Hydrolyseprozesses.^[186] Hydrolyse und Abbaureaktion sind irreversibel, h und l stellen die Geschwindigkeitskonstante der Proteinhydrolyse bzw. der Aminosäurezersetzung dar.

In Zustand A liegen die individuellen Aminosäuren im Protein kovalent gebunden, in Zustand B in freier Form in der Hydrolyselösung vor. Hydrolysierte in Zustand B befindliche Aminosäuren werden durch unerwünschte Nebenreaktionen in Nebenprodukte zersetzt (Zustand C). Lediglich die freien Aminosäuren des Zustands B sind der Detektion und Quantifizierung zugänglich. Der Ansatz beruht auf der Annahme, dass die im proteingebundenen Aminosäuren nicht zerstört werden. Der zeitabhängige Konzentrationsverlauf der freien Aminosäuren ergibt sich demnach aus *Gleichung 2.2*.

$$B(t) = \frac{A(0) \cdot h}{h - l} (e^{-l \cdot t} - e^{-h \cdot t})$$

Gleichung 2.2: Zeitabhängiger Konzentrationsverlauf $B(t)$ einer freien Aminosäure (Zustand B). $A(0)$ beschreibt die ursprünglich proteingebundene Menge, h und l die Geschwindigkeitskonstanten der Aminosäurefrei- und der Aminosäurezerersetzung.^[186]

Mit Hilfe der Bestimmung von $B(t)$ zu verschiedenen Hydrolysezeitpunkten t_H (Hydrolysekinetik) und einer Regression der experimentellen Daten nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate kann der ursprüngliche Gehalt $A(0)$ und die Geschwindigkeitskonstanten h und l einer Aminosäure abgeschätzt werden. DARRAGH et al.^[151] nannten eine Doppelbestimmung von Aminosäurewiederfindungen zu zehn Hydrolysezeitpunkten t_H ausreichend für eine genaue Berechnung. Histidin, Tyrosin, Alanin und Phenylalanin lassen sich nach dieser Studie in 6 M HCl sehr schnell aus Lysozym freisetzen, Isoleucin, Valin und Cysteinsäure hingegen nur sehr langsam. Cysteinsäure, Serin, Threonin, Phenylalanin und Glutamat zählen zu den säureinstabilsten Aminosäuren, während Histidin, Lysin und Alanin zu den säurestabilsten gehören. Es lassen sich zwei Grenzfälle aus *Gleichung 2.2* formulieren. Der erste Grenzfall gilt für hydrolyseresistente Aminosäuren (*Tabelle 2.8*).

Tabelle 2.8: Extrapolation ($t \rightarrow \infty$) der Wiederfindungen $B(t)$ hydrolyseresistenter Aminosäuren. Hydrolysekinetikprofil: Exponentiell gegen den asymptotischen Grenzwert $B(\infty) = A(0)$ ansteigende Wiederfindungen.

Kinetik	Aminosäuren	Referenz
1. Exponentielle Freisetzung $A(t) = A(0)e^{-h \cdot t}$		
2. Keine Zersetzung $l \approx 0, C(t) \approx 0$	Ile, Leu, Val	[187], [153], [186]
3. $B(t)$ -t-Geschwindigkeitsgesetz $B(t) = A(0) - A(t) = A(0)(1 - e^{-k \cdot t})$		

Es gilt die Annahme, dass keine Zersetzung freier Aminosäuren stattfindet. Durch Extrapolation der Hydrolysekinetikdaten mit $t \rightarrow \infty$ lassen sich Hydrolysekonstante h und $A(0)$ im Protein ermitteln. Der zweite Grenzfall kann durch Extrapolation mit $t \rightarrow 0$ der experimentellen Daten zur Abschätzung der Zersetzungskonstante l und $A(0)$ von säurelabilen Aminosäuren herangezogen werden (*Tabelle 2.9*). Es gilt die Annahme, dass die Freisetzung relativ zur Zersetzung sehr schnell erfolgt. Das Geschwindigkeitsgesetz der *Gleichung 2.2* geht in eine Kinetik 1. Ordnung über. In Veröffentlichungen von SMITH^[148,149], SIMPSON^[165] und TSUGITA^[158]

werden als Alternative zur Kinetik 1.Ordnung das Modell einer linearen $B(t)$ - t -Korrelation beschrieben. Die Wiederfindungen der säurelabilen Aminosäuren werden durch diesen Ansatz jedoch nur unzureichend korrigiert.^[188]

Tabelle 2.9: Extrapolation ($t \rightarrow 0$) der Wiederfindungen $B(t)$ säurelabiler Aminosäuren. Hydrolysekinetikprofil: Linear oder exponentiell abnehmende Wiederfindungen $B(t)$.

Kinetik	Aminosäuren	Referenz
1. Schnelle Freisetzung: $h \gg l$		
2. $B(0) = A(0)$	Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Arg,	[150], [186], [149], [148]
3. $B(t)$ - t -Geschwindigkeitsgesetze	Pro, Lys	
$B(t) = B(0) \cdot e^{-l \cdot t}$ (Kinetik 1.Ordnung)		
$B(t) = -l \cdot t + B(0)$ (Linear)		

Die Voraussetzung für die Anwendung der Grenzfälle zur Korrektur von Aminosäurewiederfindungen ist, dass sich $B(\infty)$ bzw. $B(0)$ dem tatsächlichen Gehalt $A(0)$ annähert. Es können jedoch bereits deutliche Verluste an freien Aminosäuren vor einer vollständigen quantitativen Freisetzung auftreten. Die Werte von $B(t)$ weichen in diesem Fall von $A(0)$ deutlich ab und eine Unterbestimmung durch die Näherungsverfahren ist das Resultat. In diesem Fall sollte auf die Methode von *ROBEL*^[186] und *DARRAGH*^[151] gemäß *Gleichung 2.2* zurückgegriffen werden.

Mit Hilfe des Kompartimentmodells der Proteinhydrolyse lassen sich zu einem definierten Hydrolysezeitpunkt t_H Korrekturfaktoren berechnen. Die Hydrolyse- und Zersetzungsraten der individuellen Aminosäuren sind allerdings von den Strukturmerkmalen des Proteins abhängig und daher von Protein zu Protein verschieden.^[187] Geschwindigkeitskonstanten, die auf alle Proteine anwendbar wären und nur von den Hydrolysebedingungen abhängig sind, gibt es nicht. Eine Alternative zu dem Verfahren der Hydrolysekinetik und Extrapolation von Aminosäuredaten stellt eine Methode nach *SIMPSON* et al.^[165] dar. In diesem Fall werden die Wiederfindungen von freien Aminosäuren unter Hydrolysebedingungen als Korrekturfaktoren für proteingebundene Aminosäuren herangezogen.

2.2.6 Anwendungen

Die Hauptanwendungen der Aminosäureanalytik sind die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen als auch die Analyse von freien Aminosäuren. Sie wird zu diesem Zweck in der Proteomforschung, in der Entwicklung und Produktion von Biopharmazeutika in der pharmazeutischen Industrie, in der Überwachung von Fermentationsprozessen in der Lebens-

mittelanalytik und in der diagnostischen Medizin eingesetzt.^[102,104,160,189] Sie eignet sich außerdem für die Bestimmung von zahlreichen posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, Methylierungen und Glycosylierungen.^[137,190-192] Im Folgenden wird lediglich auf die Proteinidentifizierung und -quantifizierung eingegangen.

2.2.6.1 Proteinidentifizierung

In der Proteomforschung, die sich in zwei Teilgebiete aufteilt, stehen Proteine in Zellen, Geweben und biologischen Flüssigkeiten im Fokus des Interesses. In der Expressionsproteomforschung (*expression proteomics*) werden die biochemischen Bedingungen und Abhängigkeiten der Proteinexpression untersucht, während in der funktionalen Proteomforschung (*functional proteomics*) die biologischen Funktionen und Interaktionen von Pro-

Tabelle 2.10: Methoden der Proteinidentifizierung

Methode	Beschreibung
2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	Trennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und Molekulargewicht mittels isoelektrischer Fokussierung in der 1. und SDS-PAGE in der 2. Dimension, Vergleich mit in Datenbanken abgelegten Referenzgelen
Molekularmassenbestimmung	Bestimmung der Masse des isolierten, reinen Proteins mit MALDI- bzw. ESI-TOF-MS
Peptidmassenmapping	Enzymatischer Verdau des isolierten, reinen Proteins mit Trypsin, Generierung eines Massenspektrums der tryptischen Peptide mit MALDI- bzw. ESI-TOF-MS
MS/MS-Peptidsequenzierung	Enzymatischer Proteinverdau mit Trypsin, Generierung einer Aminosäuresequenz (6-8 AA) nach Selektion eines tryptischen Peptids und seiner kollisionsinduzierten Fragmentierung mittels MS/MS oder PSD-MALDI-MS; Analyse von Proteinmischungen generell möglich
EDMAN-Mikrosequenzierung	Isolierung des Proteins, Generierung einer N-terminalen bzw. nach enzymatischer oder chemischer Spaltung internen Aminosäuresequenz (12-15 bzw. 3-4 AA) eines Peptids mit der Methode nach EDMAN.
Aminosäureanalytik	Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung eines isolierten, reinen Proteins nach Hydrolyse und Vor- bzw. Nachsäulenderivatisierung kombiniert mit RP- bzw. Ionenchromatographie
Western Blotting	Identifizierung von Proteinen mittels Reaktion mit protein-spezifischen Antikörpern auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen

teinen im Vordergrund stehen.^[193,194] Grundlage für diese Forschungstätigkeiten ist die Kenntnis der Identität der an den entsprechenden biochemischen Prozessen beteiligten Proteine. Die Methoden der Proteinidentifizierung umfassen die Bestimmung von proteinspezifischen Merkmalen wie der Primärstruktur, der Aminosäurezusammensetzung, des isoelektrischen Punktes und des Molekulargewichtes eines Proteins (*Tabelle 2.10*). Proteine werden außerdem mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Auftrennung einer Proteinmischung erfolgt mit der 2D-Gelelektrophorese. 2 000 bis 3 000 Proteine werden so nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrem Molekulargewicht getrennt und liegen anschließend in einer Menge von 100 ng bis einigen µg vor. Ein Vergleich mit Referenzgelen liefert bereits in diesem Stadium der Expressionsanalyse zusätzliche Anhaltspunkte für eine erfolgreiche Identitätsbestimmung.^[193-195] MS-basierte Verfahren unter Anwendung von *Time-of-flight*(TOF), Triple-Quadrupol(TQ)-, Quadrupol-TOF(Q-TOF)- und Ion Trap(IT)-Massenspektrometern gehören zu den modernen Methoden der Proteinidentifizierung.^[196] Die Masse des intakten Proteins lässt sich mittels MALDI- bzw. ESI-MS-Analyse bis zu einer Mindestmenge von ca. 100 ng bestimmen. Das Peptidmassenmapping von Proteinen, die zuvor mit Endopeptidasen (Trypsin) sequenzspezifisch verdaut werden, wird ebenfalls mittels MALDI- bzw. ESI-TOF-MS durchgeführt. Hierbei werden proteinspezifische Peptidmassenprofile mit hoher Auflösung erzeugt und mit über das Internet zugänglicher Software und Suchmaschinen mit Sequenzdatenbanken verglichen.^[193,194,196]

Enzymatisch verdaute Peptide lassen sich zudem mit MS/MS-Systemen leicht sequenzieren. Peptide werden im ersten Massenspektrometer selektiert und in einer Kollisionskammer durch Kollision mit einem Inertgas fragmentiert. Man erhält somit ein sequenzspezifisches Massenspektrum aus Peptidfragmenten, das mithilfe von Computeralgorithmen interpretiert und mit Sequenzdatenbanken abgeglichen wird. Für eine eindeutige Proteinidentifizierung ist meist eine Sequenz aus 6-8 Aminosäuren eines Peptids ausreichend. Die gängigste Methode zur Bestimmung einer Aminosäuresequenz ist die Methode nach *EDMAN* (*Abbildung 2.5*).^[197]

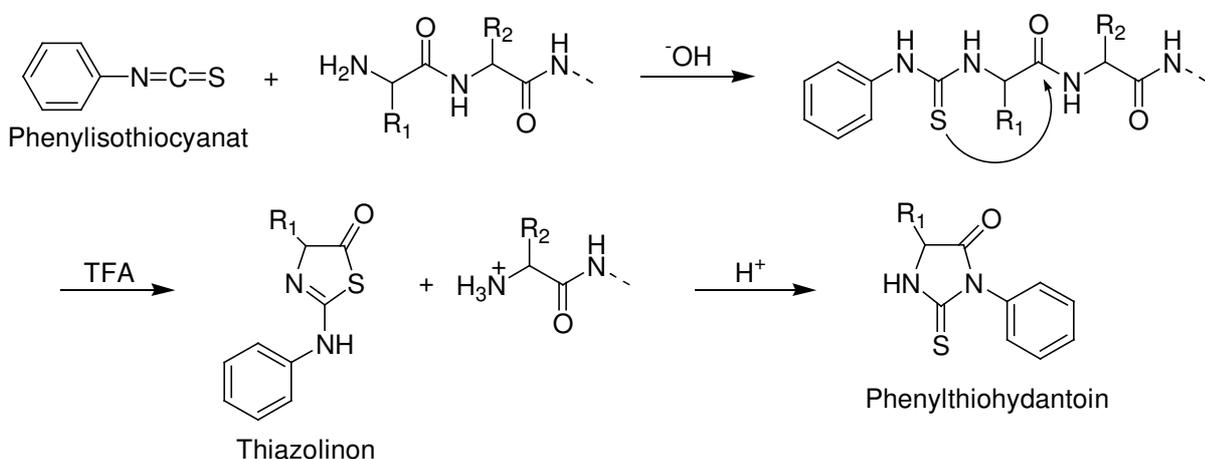


Abbildung 2.5: N-terminale EDMAN-Sequenzierung von Peptiden

Phenylisothiocyanat (PITC) addiert unter alkalischen Bedingungen an die N-terminale Aminosäure von Peptiden bzw. Proteinen unter Bildung des entsprechenden Phenylthioharnstoffderivates, das unter Einwirkung von TFA zu dem Thiazolinonderivat cyclisiert und von dem Peptid selektiv abspaltet. Das Phenylthiohydantoinderivat wird nach Extraktion des Thiazolinonderivates mit organischem Lösungsmittel aus diesem mit wässriger Säure gewonnen und chromatographisch identifiziert und quantifiziert. Der *EDMAN*-Abbau kann für die Endgruppenbestimmung von Proteinen und für die vollständige Sequenzierung von Peptiden mit bis zu 40-60 Aminosäuren herangezogen werden.^[197] Proteine mit posttranslational modifizierter N-terminaler Aminosäure entziehen sich jedoch der Sequenzanalyse und müssen zuvor chemisch bzw. enzymatisch zu Peptiden gespalten werden. Die Bestimmung einer N-terminalen Mikrosequenz von 12-15 Aminosäuren ist im Allgemeinen für eine eindeutige Zuordnung mithilfe von Sequenzdatenbanken ausreichend. Für die Identifizierung von Proteinen aus Mikroorganismen mit relativ kleinem Proteom genügt sogar eine Anzahl von 4-6 Aminosäuren.^[194,198,199] Die *EDMAN*-Sequenzierung ist im Vergleich zu den MS/MS-Methoden relativ zeitaufwendig, kann aber unter Umständen auf die Endgruppenbestimmung von Proteinen beschränkt werden, so dass der enzymatische Verdau als Probenvorbereitung entfällt.

Ein Analyseschema für die Proteinidentifizierung mittels Aminosäureanalytik ist in *Abbildung 2.6* dargestellt. Es wird eine Proteinmenge von rund 0.25-1 µg benötigt.^[102,194] Die Probenvorbereitung umfasst im Gegensatz zu den MS-basierten Analysen den Transfer der mit 2D-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran. Aus dem Polyacrylamid würden während der Proteinhydrolyse ansonsten große Mengen Ammoniak freigesetzt werden und das Gelmaterial die Chromatographie nachteilig beeinflussen. Die Hydrolyse der Proteine wird auf der PVDF-Membran in der Gasphase durchgeführt. Die Extraktion der freien Aminosäuren von der Membran erfolgt mit einem relativ hohen Anteil an organischem Lösungsmittel, da die Aminosäurezusammensetzung aufgrund einer ungleichen Extraktion verfälscht werden könnte. Der Abgleich der experimentell ermittelten Zusammensetzung mit der SWISS-PROT-Protein- oder EMBL-Nukleotiddatenbank erfolgt mit dem Softwaretool *AACompldent*, die auf dem ExPASy-Server des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (<http://us.expasy.org/tools/aacompl/>) zugänglich ist.^[194,200] Die Voraussetzung für eine eindeutige Proteinidentifizierung mithilfe der Aminosäureanalytik ist die Isolierung des Proteins in reiner Form. Eine Verunreinigung durch im 2D-Gel komigrierende Proteine verfälscht das Ergebnis. Eine eindeutige Identifizierung des reinen Proteins wird bereits mit der Quantifizierung von 12 Aminosäuren erreicht, sofern die häufigsten Aminosäuren des Proteins enthalten sind.^[201] Als weitere Suchkriterien werden der isoelektrische Punkt und das Molekulargewicht des Proteins eingegeben, um die Sicherheit des Ergebnisses zu erhöhen.

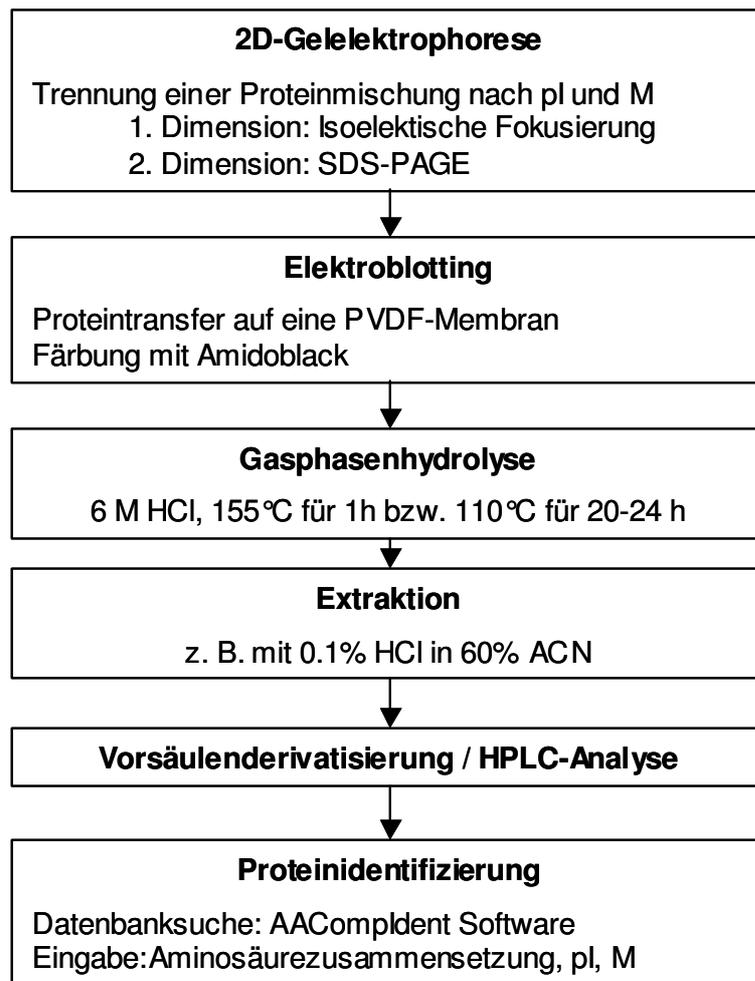


Abbildung 2.6: Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung für die Proteinidentifizierung.^[102]

FOUNTOULAKIS et al.^[201] wiesen mit dieser Methode insgesamt 110 von 150 Proteinen aus *Haemophilus influenzae* nach. Die Identität von 95 Proteinen wurde mittels MALDI-MS bestätigt. Weitere Veröffentlichungen demonstrieren die Anwendbarkeit der Aminosäureanalytik für die Proteinidentifizierung.^[102,195,202-205] Bei zweifelhaften Zuordnungen ist allerdings eine Verifizierung durch eine weitere Methode erforderlich. Eine nach WILKINS et al.^[206] optimierte Methode der *EDMAN*-Sequenzierung, der Generierung einer N-terminalen Mikrosequenz mit einer Länge von 3-4 Aminosäuren, führt in Kombination mit der Aminosäureanalytik bzw. MS-basierten Methoden zu einem stichhaltigeren Ergebnis.^[102,206,207] Die Aminosäureanalytik ist im Vergleich zu den MS-basierten Techniken sehr zeitaufwendig und wird wie die *EDMAN*-Sequenzierung routinemäßig selten eingesetzt. Die Stärke der Aminosäureanalytik ist vor allem in der Unabhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen zu sehen.

Die zuvor beschriebenen Methoden der Proteinidentifizierung beruhen auf der Annahme, dass die Primärstruktur von Proteinen des untersuchten Organismus bereits bekannt ist. Das Genom des Organismus sollte folglich bereits charakterisiert und in den Datenbanken verfügbar sein. Die *de novo*-Peptidsequenzierung erweist sich bei Anwendung von MS/MS-

Methoden hinsichtlich der Interpretation von Peptidfragmentspektren als problematisch.^[196] Die Zuordnung der beobachteten Ionen zu der γ - bzw. b -Ionenserie des betreffenden Peptids, mit deren Hilfe die Aminosäuresequenz bestimmt wird, erfordert MS/MS-Spektren mit sehr hoher Auflösung. Eine erfolgreiche Zuordnung bedarf der Kombination mehrerer Methoden z.B. der *EDMAN*-Sequenzierung und der MS-basierten Techniken oder der chemischen Modifizierung der tryptischen Peptide.

Eine andere Möglichkeit der Identifizierung von Proteinen von genetisch unzureichend charakterisierten Organismen stellt das Kreuzspezies-Proteinmatching unter Anwendung der Aminosäureanalytik dar.^[194,208] Die Basis hierfür bildet die vorhandene Konservierung der Aminosäurezusammensetzung und des Molekulargewichtes von Proteinen mit identischen biochemischen Funktionen verschiedener Spezies. Die experimentell bestimmte Aminosäurezusammensetzung und das Molekulargewicht des unbekanntes Proteins wird mit Datenbankeinträgen von Proteinen gut charakterisierter Spezies verglichen. In diesem Fall beweist die Aminosäureanalytik eine ausgeprägtere Nachweisstärke als das Peptidmassenmapping. Die beobachteten Massen tryptischer Peptide eines Proteins zeigen im Gegensatz zu der Aminosäurezusammensetzung eine höhere Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz.^[208]

2.2.6.2 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung von Peptiden und Proteinen erfolgt mittels Aminosäureanalytik mit zwei Methoden.^[102,189,209] Bei Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung und des Molekulargewichtes eines Proteins, die z.B. aus Nukleotidsequenz-Datenbanken bekannt sind, kann es über die im Proteinhydrolysat gefundene Aminosäurestoffmenge quantifiziert werden. Theoretisch genügt die Analyse einer säurestabilen Aminosäure. Für eine höhere Sicherheit und Präzision ist jedoch die Analyse von mehreren Aminosäuren erforderlich. Nach *SITTAMPALAM* et al.^[209] kommen hierfür Aspartat, Glutamat, Glycin, Alanin und Leucin in Frage. Arginin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin und Lysin können bei Durchführung der sauren Proteinhydrolyse in Erwägung gezogen werden, sofern diese durch Bestandteile der Lösung oder aufgrund ihrer Lage in hydrophoben Proteindomänen nicht signifikant beeinflusst werden. Threonin, Serin, Tyrosin, Methionin, Cystein und Tryptophan werden für eine Quantifizierung nicht empfohlen.

Wenn der Gehalt eines unbekanntes Proteins in reiner Lösung oder der Gesamtprotein-gehalt eines Proteingemisches ermittelt werden soll, ergibt sich die Proteinmenge aus der Summe der gefundenen Aminosäurestoffmengen. Diese Berechnungsmethode führt jedoch aufgrund der Unterbestimmung säurelabiler Aminosäuren zu einem artefaktbehafteten Ergebnis. Die Hydrolysekinetik und alternative Methoden zur Bestimmung säurelabiler Aminosäuren reduzieren dieses Problem, sind jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Als

weitere Möglichkeit bietet sich die Bestimmung einer Reihe von stabilen Aminosäuren und der Bezug auf ein Referenzprotein mit bekannter Aminosäurezusammensetzung an (*Abschnitt 3.2.2*).

Die Aminosäureanalytik wird häufig zur Kalibrierung der in *Abschnitt 0* beschriebenen kolorimetrischen und UV/VIS-spektrometrischen Methoden herangezogen.^[102,189,210,211] Der Extinktionskoeffizient eines Proteins wird über das Lambert-Beer'sche Gesetz aus der Steigung einer Geraden eines Absorption-Konzentration-Diagramms ermittelt, während die Proteinkonzentration der Lösung mit Hilfe der Aminosäureanalytik bestimmt wird.

2.3 PROTEINQUANTIFIZIERUNG

Proteine werden mit kolorimetrischen Tests, Fluoreszenz- und UV/VIS-basierten Methoden quantitativ bestimmt. Die Detektion beruht idealerweise auf einem für alle Proteine charakteristischen Strukturmerkmal wie der Peptidbindung. Proteine, die aus einer identischen Anzahl von Aminosäuren aufgebaut sind, könnten dann trotz unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzungen durch einen entsprechenden Test mit der gleichen Response einheitlich erfasst werden. Proteine sind jedoch hinsichtlich ihrer Größe (Molekulargewicht), strukturellen und chemischen Eigenschaften hochdiverse Makromoleküle. Aus diesem Grund würde selbst der ideale Proteinquantifizierungstest eine mehr oder weniger hohe Protein-zu-Protein-Variabilität aufweisen. Die Signalgebung realer Quantifizierungsmethoden ist bereits auf molekularer Ebene von der Aminosäurezusammensetzung abhängig. Dieser Sachverhalt ist eng mit der Frage verknüpft, inwieweit ein Kalibrierprotein unbekannte Proteine in isolierter Form bzw. in Proteingemischen repräsentiert. Die Angabe von Proteingehalten erfolgt daher meist mit Bezug auf das Kalibrierprotein als Äquivalentkonzentration ohne wirkliche Kenntnis des tatsächlichen Proteingehaltes. In diesem Zusammenhang müssen die Konsequenzen der methodischen Limitierungen von Referenzmethoden, auf denen eine Kalibrierung eines Proteinquantifizierungstests beruht, für die Ermittlung des wahren Proteingehaltes ebenfalls bedacht werden. Die Proteinkonzentrationen von Kalibrierlösungen basieren in der Regel auf gravimetrische Methoden, der Stickstoffbestimmung nach *KJELDAHL* oder der Aminosäureanalytik.

2.3.1 Trockengewichtsbestimmung

Eine quantitative Proteinanalytik basierend auf einer gravimetrischen Messung erfordert eine ausreichende Trocknung der Proteine, da diese stets einen undefinierten Gehalt an Wasser enthalten. Die gängigste Methode ist das Erhitzen des Proteins im Vakuum bzw. an der Luft bis eine Gewichtskonstanz erreicht ist. Die ideale Trocknungstemperatur liegt bei 110 °C.^{[212-}

^{216]} Das Hauptproblem der Trockengewichtsbestimmung ist die Frage nach dem Endzeitpunkt der Trocknung. Die Trocknungsdauer ist abhängig von der Proteinmenge und den enthaltenden Puffersalzen, sofern keine Dialyse gegen Wasser erfolgte. Für eine korrekte Analyse sollte idealerweise ein Puffersalz verwendet werden, das nicht hygroskopisch ist oder unter den Bedingungen der Trocknung vollständig flüchtig ist. *NOZAKI*^[215] erwägt daher die Verwendung von Natriumphosphat als nichthygroskopisches und Tris-Chlorid als flüchtiges Puffersystem. Messungen von Blindlösungen erhöhen in diesem Fall den experimentellen Aufwand. Eine Gewichtskonstanz kann bereits nach 24 h (BSA bei 102° C, *in vacuo*) erreicht sein, unter Umständen allerdings auch bis zu mehreren Tagen dauern.^[215,217] Es wird vermutet, dass stets ein individueller Restwassergehalt unabhängig von der angewandten Methode im Inneren des Proteins gebunden bleibt. Außerdem kann die Beständigkeit des Proteins gegenüber thermischer Zersetzung und Oxidation bei Trocknung an Luft ein Problem darstellen. So wurde von *HUNTER*^[212] eine Zersetzung von verschiedenen Albuminen bei Trocknung an Luft bei 125° C und von *BULL et al.*^[217] bereits bei 110° C im Vakuum beobachtet. Die Auswaage von besonders hygroskopischen Proteinen sollte unter trockener Atmosphäre erfolgen. Die Methode der Trockenbestimmung ist relativ unempfindlich, da Proteinmengen von mindestens 0.2-1.0 mg benötigt werden.^[215,218]

2.3.2 Stickstoffbestimmung nach *KJELDAHL*

Eine häufig angewendete Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes z. B. von Milchprodukten, Fleischwaren, Getreide und Bier in der Lebensmittelanalytik oder von Gewebeextrakten und Plasmaproteinen in der Biomedizin ist die Stickstoffbestimmung nach *KJELDAHL*.^[219-223] Die Umrechnung des Stickstoff- auf den Proteingehalt einer Probe erfolgt anhand der Beobachtung, dass zahlreiche Proteine Stickstoff zu 16 % enthalten. Für die Umrechnung wird in diesem Fall ein Faktor von 6.25 angewendet. Das Prinzip der Stickstoffbestimmung nach *KJELDAHL* ist in *Abbildung 2.7* dargestellt.

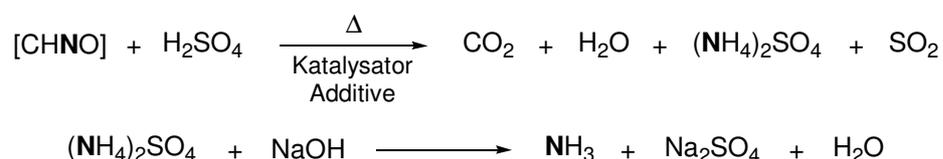


Abbildung 2.7: Aufschluß und Neutralisation bei der Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL.

Organische Verbindungen werden in konz. Schwefelsäure in Anwesenheit von Katalysatoren und Additiven durch Erhitzen aufgeschlossen und der Kohlenstoff und Wasserstoff zu CO₂ und H₂O umgesetzt. Der in der Probe enthaltene Stickstoff liegt anschließend in Form von

Ammoniumsulfat in Lösung vor. Traditionell wird Quecksilberoxid als Katalysator verwendet. Dieses ist jedoch toxisch und bindet im nachfolgenden Neutralisationsschritt ohne Zusatz von Thiosulfaten, Sulfiden oder Zink Ammoniak, so dass eine Unterbestimmung resultiert.^[222] Als Alternative haben sich Kupfersulfat und die Mischkatalysatoren $\text{TiO}_2/\text{CuSO}_4$ und CuSO_4/Se bewährt.^[224] Als Additive werden meist Natrium- und Kaliumsulfat zur Erhöhung der Siedetemperatur und Wasserstoffperoxid als weiteres Oxidationsmittel verwendet. Nach Aufschluß der Probe wird die saure Mischung neutralisiert, das entstandene Ammoniak über eine Wasserdampfdestillation quantitativ gewonnen und anschließend titrimetrisch bestimmt. Eine verkürzte Variante der *KJELDAHL*-Bestimmung verwendet das sog. Nessler-Reagenz (Quecksilber und Kaliumiodid in 10 % Natriumhydroxid-Lösung) als farbgebende Komponente, so dass eine Wasserdampfdestillation und Titration von Ammoniak entfallen. Das Nessler-Reagenz wird nach dem Aufschluß zugegeben.^[222,223,225] Die Quantifizierung des Ammoniaks erfolgt mit Hilfe einer Ammoniumsulfat-Standardlösung bei 400-500 nm in einem Photometer.

Das Analyseresultat ist von der Effizienz des Aufschlusses, der je nach Applikation und Probenbeschaffenheit der individuellen Optimierung bedarf, und von der Genauigkeit des Umrechnungsfaktors abhängig. Der Stickstoffgehalt von Proteinen kann je nach biologischer Quelle deutlich variieren und muss unter Umständen aus der Aminosäurezusammensetzung berechnet werden. Der Vorteil der *KJELDAHL*-Methode liegt in der experimentellen Unabhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen. Allerdings ist er deutlich unempfindlicher als andere Methoden, da stets eine Probenmenge im mg-Bereich benötigt wird.^[210,221] Da andere nieder- und makromolekulare N-haltige organische Verbindungen ebenfalls umgesetzt werden, sollten diese durch eine entsprechende Probenvorbereitung entfernt werden. Eine weitere Methode der Stickstoffbestimmung stellt die Dumas-Methode dar.^[219]

2.3.3 Kolorimetrische Quantifizierungstests

In *Tabelle 2.11* sind häufig angewendete kolorimetrische Quantifizierungsmethoden aufgelistet.^[131]

Tabelle 2.11: Übersicht kolorimetrischer Proteinquantifizierungstests.

Assay	Prinzip	Absorptionsmessung [nm]	NWG [µg/ml]
Biuret	Ausbildung eines blauen Cu ²⁺ -Protein-Komplexes in alkalischer Lösung	540-550	1-10
LOWRY	Kombination aus Biuret-Reaktion und Reduktion von Polymolybdat- und Polywolframatophosphaten (Folin-Ciocalteu-Reagenz) zu "Heteropolyblau-Verbindungen"	650-750	0.1-1
BCA	Kombination aus Biuret-Reaktion, Reduktion des Cu ²⁺ -Proteinkomplexes in alkalischer Lösung und Bildung eines Cu ⁺ -(BCA) ₂ -Komplexes	562	0.1-1
BRADFORD	Assoziation von Coomassie Blue G-250 und Protein in phosphorsaurer Lösung	595	0.05-0.5

Der Biuret-, *LOWRY*- und *BCA*-Assay basieren auf Wechselwirkungen von Protein oder Farbstoff mit Kupfer, der *BRADFORD*-Assay auf Wechselwirkungen zwischen Protein und Farbstoff (*Abbildung 2.8*).

Die Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen im Biuret-Assay erfolgt durch mindestens drei Peptidbindungen in alkalischer Lösung.^[226] Aminosäuren und Dipeptide komplexieren Kupfer(II)-Ionen nicht und ergeben daher kein Signal. Als Stabilisator der verwendeten Kupfer(II)-sulfat-Lösung wird Natrium/Kaliumtartrat eingesetzt. Der Komplex besitzt eine blauviolette Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 540-550 nm je nach Protein bzw. Proteingemisch. Die volle Farbentwicklung ist nach 30-minütiger Inkubation bei RT erreicht. Der Biuret-Assay zeigt relativ geringe Protein-zu-Protein-Variabilität, da nur die Peptidbindung und Tyrosin an der Komplexbildung beteiligt sind. Er ist daher relativ unempfindlich gegenüber Unterschieden in der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen.^[227] Ein großer Nachteil ist jedoch seine geringe Nachweisstärke und Kreuzreaktivität gegenüber reduzierenden Verbindungen wie primären Aminen (z.B. Tris-Puffer), Thiolen und Glucose und gegenüber Glycerol und Ammoniumsulfat. Detergenzien wie SDS hingegen sind weitestgehend kompatibel.^[131,226]

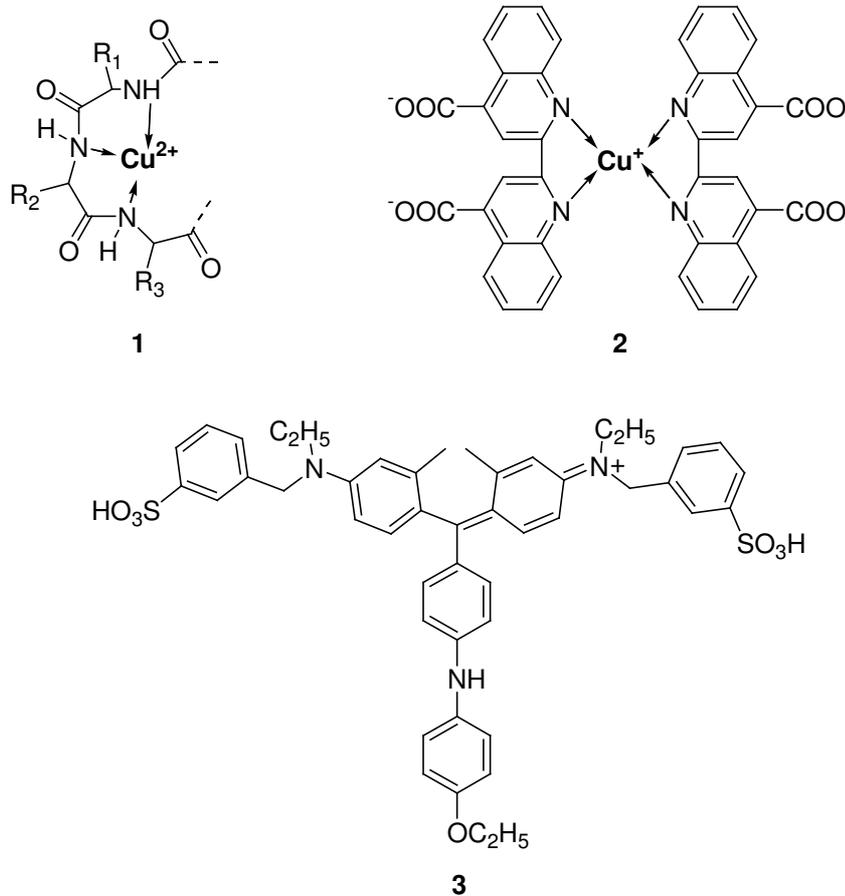


Abbildung 2.8: Farbgebende Kupfer-Komplexe der Biuret-Reaktion (1) und des BCA-Assays (2) bzw. der im BRADFORD-Assay eingesetzte Farbstoff Coomassie Blue G-250 (3).

Der *LOWRY*-Assay ist eine Kombination aus der Biuret-Reaktion und der Reduktion von Polymolybdat- und Polywolframatophosphorsäuren des *FOLIN-CIOCALTEU*-Reagenzes zu Heteropolyblau-Verbindungen.^[228-230] Diese Verbindungen besitzen ein breites Absorptionsmaximum im Bereich von 650-750 nm. Offenbar wirken vor allem Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung aber auch Cystein, Cystin, Histidin und Aspartat reduzierend.^[131] Das Cu^{2+} -Atom im Kupfer-Protein-Komplex wird ebenfalls zu Cu^+ reduziert, das dann wiederum reduzierend auf das *FOLIN-CIOCALTEU*-Reagenz wirkt.^[231] Die Farbentwicklung ist aufgrund einer Strukturumlagerung der Heteropolyblau-Verbindungen erst nach 30-minütiger Inkubation bei RT vollständig.^[228] Bei der Anwendung des *LOWRY*-Assays ist mit einer erhöhten Protein-zu-Protein-Variabilität zu rechnen. In der Durchführung ist er aufwendiger als die anderen kolorimetrischen Tests, seine Stärke liegt jedoch in einer niedrigeren Nachweisgrenze. Reduzierende und kupferchelatisierende Verbindungen wie Phenole, Thiolverbindungen, Harnsäure, Guanin und EDTA stören den Test. Der *LOWRY*-Assay wurde hinsichtlich der Bestimmung von Proteinen in Anwesenheit von kovalent-gebundenen Pflanzenphenolen modifiziert.^[232] Die Anwesenheit von Kaliumionen und nicht-

ionischen Detergenzien führt zur Fällung des *FOLIN-CIOCALTEU*-Reagenzes. Denaturierende Reagenzien wie Guanidin-HCl stören ebenfalls die Proteinbestimmung.^[231]

Eine wertvolle Alternative zum *LOWRY*-Assay stellt der *BCA*-Assay dar. Zu Beginn steht ebenfalls die Biuret-Reaktion in alkalischer Kupfer(II)-tetrat-Lösung. Die Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) in Anwesenheit von Bicinchoninsäure (BCA) führt zur Ausbildung des in *Abbildung 2.8* gezeigten violetten Cu^+ -(BCA)₂-Komplexes. Er besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Reduzierend wirken die Peptidbindung, Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan. Die Reaktion wird in der Regel bei 37° C für 60 min durchgeführt. Der *BCA*-Assay zeigt eine Protein-zu-Protein-Variabilität ähnlich dem *LOWRY*-Assay, ist aber gegenüber niedermolekularen Substanzen wie Detergenzien generell weniger störanfällig.^[231] Er ist jedoch aufgrund von erheblichen Interferenzen von Pflanzenphenolen zur Proteinbestimmung in Pflanzenextrakten nicht geeignet.^[233] Der *BCA*-Assay quantifiziert nichtglycosylierte Proteine nach *FOUNTOULAKIS* et al.^[234] zuverlässiger als der *BRADFORD*- und *LOWRY*-Assay. Glycoproteine werden mit allen drei Methoden mit BSA als Kalibrierprotein und der Aminosäureanalytik als Referenzmethode deutlich unpräziser bestimmt.

Der *BRADFORD*-Assay beruht auf ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und dem Farbstoff Coomassie Blue G-250 (*Abbildung 2.8*).^[235] In phosphorsaurer, ethanolischer Lösung liegt der Farbstoff in protonierter Form vor und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, bei Zugabe des Proteins verschiebt sich das Maximum zu 595 nm. Die Farbentwicklung ist nach 2 min vollständig. Die Verschiebung ist vermutlich auf eine Stabilisierung des Farbstoffes in seiner deprotonierten, anionischen Sulfonat-Form zurückzuführen. Die protonierten Aminogruppen von Arginin, Lysin und Histidin stabilisieren die Protein-Farbstoff-Interaktion über Ionenpaare mit den Sulfonatgruppen, während Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin für die hydrophoben Wechselwirkungen verantwortlich sind.^[131,227] Der *BRADFORD*-Assay besitzt gegenüber den kupferbasierten Assays eine höhere Sensitivität, ist in seiner Durchführung einfacher und schneller und toleriert vor allem reduzierende Verbindungen. Als Nachteile sind seine höhere Protein-zu-Protein-Variabilität und seine Störanfälligkeit gegenüber Detergenzien zu nennen.

2.3.4 Fluoreszenzmethoden

Es gibt zwei Arten von fluoreszenzbasierten Proteinbestimmungstests. Der erste Typ basiert auf einer kovalenten Bindung des Farbstoffes über die Aminogruppen von Proteinen. Das nicht umgesetzte Reagenz sollte selbst nicht fluoreszent sein. Aus diesem Grund kommen *o*-Phthaldialdehyd und Fluorescamin, deren Eigenschaften bereits in *Abschnitt 2.2.3* besprochen wurden, in Frage.^[132,133] Sie zeichnen sich durch eine bessere Nachweisstärke

und höheren dynamischen Bereich gegenüber den kolorimetrischen Assays aus. Der fluoreszenzbasierte Farbstoff 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA) ermöglicht ebenfalls einen empfindlichen Proteinnachweis mit hohem dynamischem Bereich von 0.1-150 µg/ml.^[236] Seine Umsetzung mit dem Protein erfolgt in Natriumborat-Puffer (pH = 9.3) in Anwesenheit von Cyaniden oder Thiolverbindungen für 90 min bei RT (Abbildung 2.9).

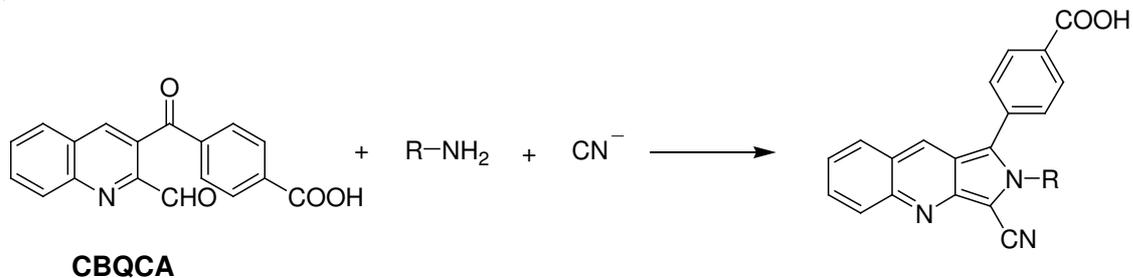


Abbildung 2.9: Fluorophor-Markierung von Proteinen mit 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA).

Die Fluoreszenz der Proteinderivate, die sich bei Zugabe von Triton X-100 erhöht, wird bei 480 nm angeregt und bei 530 nm detektiert. CBQCA ist selbst nicht fluoreszent. Der Test ist mit SDS und wie der OPA- und Fluorescamin-Assay mit Glycin-Puffer nicht kompatibel. Die Anwesenheit von Tween 20, Azid (0.1 %), Glycerol, 10 mM Tris- oder Ammonium-Puffer sowie DTT und 2-Mercaptoethanol bis zu einer Konzentration von 100 µM interferiert jedoch nicht. Der CBQCA-Assay ist der empfindlichere Test im Vergleich zur OPA- und Fluorescamin-Methode.^[236] Ein großer Nachteil dieser Methoden ist ihre hohe Protein-zu-Protein-Variabilität, da das Signal entsprechend der Stöchiometrie der Reaktion von der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins abhängig ist.

Der zweite Typ fluoreszenzbasierter Proteinquantifizierungstests beruht auf einer Fluoreszenzverstärkung durch eine nichtkovalente Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen von Farbstoff mit Detergenzien beschichteten Proteinen. Die verwendeten molekularen Fluoreszenzsonden besitzen eine Merocyanin-, Aminostyryl-/Cyanopyranyl- oder Hydroxystyryl-/Cyanopyranyl-Struktureinheit. Der Vorteil dieser Farbstoffe ist, dass sie mit Aminen oder Ammonium-Salzen kompatibel sind. HAUGLAND, JONES und SINGER^[237,238] haben 1997 eine Reihe von Merocyanin-Farbstoffe patentieren lassen, die die Markierung von Peptiden und Proteinen in Lösung, in Gelen oder immobilisiert auf Oberflächen ermöglichen. Merocyanine besitzen einen N-substituierten Stickstoffheterocyclus und eine elektronenschiebende Gruppe, die über eine (Poly-)alkylengruppe verbunden sind (Abbildung 2.10).

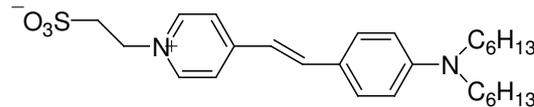


Abbildung 2.10: Strukturbeispiel eines Merocyanin-Fluoreszenzfarbstoffes für die Proteindetektion aus U.S.Patent 5616502 nach HAUGLAND et al.^[237].

Der NanoOrange-Assay verwendet einen dieser Farbstoffe und hat eine Nachweisgrenze im Bereich von 0.01-0.1 µg/ml. Die Umsetzung erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von Detergenzien bei 90°C für 10 min. Die Fluoreszenzanregung und -detektion wird bei 485 nm und 590 nm im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Die Protein-zu-Protein-Variabilität ist vergleichbar mit der des *LOWRY*-, *BCA*- und *BRADFORD*-Assays.^[238] Der Test ist empfindlicher gegenüber anorganischen Salzen als reduzierenden Substanzen, DNA und freien Aminosäuren. Er besitzt ein großes Potential für Anwendungen in der diagnostischen Medizin.^[239] Ein Nachteil des NanoOrange-Assays ist die Aggregation des Farbstoffes selbst in hochverdünnten Lösungen, die nichtlineare, sigmoidale Kalibrierkurven zur Folge hat. Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Aminostyryl-/Cyanopyranyl- oder Hydroxystyryl-/Cyanopyranyl-Struktureinheit hingegen besitzen diese Eigenschaft nicht. Die Empfindlichkeiten dieser Tests sind vergleichbar mit dem NanoOrange-Assay mit dem Vorteil linearer Kalibrierkurven.^[240,241]

2.3.5 UV-Methode

Proteinbestimmung bei 205 nm

Proteine zeigen im UV-Bereich ein breites Absorptionsmaximum bei 190 nm, das auf die Peptidbindung zurückzuführen ist.^[242,243] Die Absorptionsmessung bei dieser Wellenlänge sollte eine einheitliche Quantifizierung von Proteinen unabhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung mit hoher Empfindlichkeit ermöglichen. Die Messung im kurzwelligen UV-Bereich erfolgt jedoch meist nicht bei 190 nm sondern bei 205 oder 210 nm in der abfallenden Flanke des Absorptionsmaximums. Die hohe Endabsorption von Wasser und Puffersubstanzen führt zu einer erhöhten Messunsicherheit aufgrund des mit der Probenabsorption ansteigenden Einflusses von Streulichteffekten.^[243,244] Für eine reproduzierbare Analytik muss auf eine korrekte Wellenlängenkalibrierung und saubere Arbeitsweise geachtet werden. Die Absorptionsbestimmung von Blindlösungen, die alle in der Probe enthaltenden Puffersalze und Detergenzien enthalten, ist notwendig, da zu hohe Probenabsorptionen die dem Lambert-Beer'schen Gesetz zugrunde gelegte Linearität zwischen Absorption und Analytkonzentration aufheben.

Der Hauptbeitrag zur UV-Absorption bei 205 nm wird nach Studien von *SCOPES*^[245] und *GOLDFARB et al.*^[242] von der Peptidbindung mit einem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{mol} von 2400 bzw. 2 500-2 800 l/(mol·cm) geleistet. Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin besitzen molare Extinktionskoeffizienten ϵ_{mol} von 5200-20400 l/(mol·cm) (*Tabelle 2.12*).

Tabelle 2.12: Absorptionscharakteristika von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin.

Tryptophan										
λ_{max}	[nm]	196 ⁽⁶⁾	-	218 ⁽¹⁾	-	278 ⁽¹⁾	288 ⁽¹⁾			
λ_{min}	[nm]	-	205 ⁽²⁾	-	242 ⁽¹⁾	-	-			
ϵ_{mol}	[l/(mol·cm)]	20 000	20 400	33 500	1 930	5 500	4 550			
Tyrosin										
λ_{max}	[nm]	194 ⁽⁶⁾	-	223 ⁽¹⁾	-	275 ⁽¹⁾				
λ_{min}	[nm]	-	205 ⁽²⁾	-	245 ⁽¹⁾	-				
ϵ_{mol}	[l/(mol·cm)]	47 500	6 080	8 200	170	1 340				
Phenylalanin										
λ_{max}	[nm]	206 ⁽³⁾	-	242 ⁽¹⁾	247 ⁽¹⁾	252 ⁽¹⁾	258 ⁽¹⁾	260 ⁽¹⁾	263 ⁽¹⁾	267 ⁽¹⁾
λ_{min}	[nm]	-	236 ⁽¹⁾	-	-	-	-	-	-	-
ϵ_{mol}	[l/(mol·cm)]	8 500	63	81	115	154	195	144	152	92
Histidin										
λ_{max}	[nm]	-	-	212 ⁽³⁾						
λ_{min}	[nm]	198 ⁽⁶⁾	205 ⁽⁴⁾	-						
ϵ_{mol}	[l/(mol·cm)]	4 500	5 200 ⁽⁵⁾	5 700						

(1) - in 0.1 N HCl nach *BEAVEN et al.*^[246], (2) - bei pH \approx 6 bzw. 8 nach *SAIDEL et al.*^[247] und *GOLDFARB et al.*^[242], (3) - in 0.01 M HCl nach *SAIDEL et al.*^[247], (4) - kein Minimum^[244], (5) - pH \approx 8 nach *GOLDFARB et al.*^[242], (6) - bei pH \approx 5 nach *WETLAUFER et al.*^[244]

Es ist daher je nach Stoffmengenanteil dieser Aminosäuren mit einer signifikanten Protein- zu-Protein-Variabilität zu rechnen. Tryptophan und Tyrosin besitzen allerdings bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsminimum, so dass der Einfluss der Aminosäurezusammensetzung auf das Ergebnis experimentell möglichst gering gehalten wird. Cystein, Arginin, Methionin und Cystin besitzen molare Extinktionskoeffizienten ϵ_{mol} von 690-2200 l/(mol·cm) und tragen daher wie die verbleibenden proteinogenen Aminosäuren ($\epsilon_{\text{mol}} = 54$ -151 l/(mol·cm)) nur geringfügig zur Absorption bei.^[242,247]

Die Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{0.1\%(\text{w/v})}$ von einer Reihe von *SCOPES*^[245] und *GOLDFARB et al.*^[242] untersuchten reinen Proteinlösungen (1 mg/ml) liegen im Bereich von 29-36 l/(g·cm)

(Mittelwert: 31 l/(g·cm), pH = 7.0-8.0). Demnach kann aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Proteinkonzentration mit *Gleichung 2.3* abgeschätzt werden.

$$C = \frac{A_{205}}{31 \frac{l}{g \cdot cm} \cdot d}$$

Gleichung 2.3: Bestimmung der Konzentration C einer Proteinlösung nach Messung der Absorption A₂₀₅ bei 205 nm in einer Küvette mit der Schichtdicke d.

Die Formel berücksichtigt nicht die möglichen Abweichungen im Extinktionskoeffizienten aufgrund eines stark variierenden Gehaltes an Tryptophan und Tyrosin gegenüber den gemessenen Proteinen. Eine Methode, die auch auf *SCOPES* zurückgeht, berücksichtigt hingegen den Gehalt von Tryptophan und Tyrosin. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon^{0.1\%(w/v)}$ einer Lösung eines reinen Proteins bzw. einer Proteinmischung mit unbekanntem Gehalt kann nach *Gleichung 2.4* mit einer Präzision <2 % abgeschätzt werden.

$$\epsilon_{205}^{0.1\%(w/v)} = 27.0 + 120 \cdot \left(\frac{A_{280}}{A_{205}} \right)$$

Gleichung 2.4: Berechnung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{0.1\%(w/v)}$ [l/(g·cm)] nach experimenteller Ermittlung der Absorption A₂₈₀ und A₂₀₅ bei 280 und 205 nm (pH = 7.0).^[245]

Die Absorptionen von Tryptophan und Tyrosin werden durch die Absorptionsmessung bei 280 nm und der Annahme eines durchschnittlichen Tryptophan/Tyrosin-Verhältnisses berücksichtigt. Die Gleichung liefert kein genaues Ergebnis bei Proteinen mit hohen Stoffmengenanteilen an Histidin und Phenylalanin. Die beschriebenen Methoden stellen für reine Proteinlösungen in Abwesenheit von interferierenden niedermolekularen Substanzen und für Proben mit einem relativ hohen Proteingehalt wie in Serum und Zerebrospinalflüssigkeit gute Näherungsverfahren dar.^[248,249] Interferierende Substanzen sind u. a. Carbonsäuren, Pufferionen, Alkohole, aromatische Verbindungen und Hydrogencarbonat.

Proteinbestimmung bei 280 nm

Die UV-Absorption von Proteinen über 275 nm ist ausschließlich auf die chromophoren Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Cystin zurückzuführen (*Tabelle 2.12*).^[244,250] Cystin zeigt im Absorptionsspektrum in 0.1 N HCl bei 240 nm einen Wendepunkt mit einem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{mol} von 300 l/(mol·cm) bzw. in 0.1 N NaOH bei 249 nm ein Maximum ($\epsilon_{mol} = 340$ l/(mol·cm)). Sein Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($\epsilon_{mol} \approx 110$ l/(mol·cm)) beträgt 10 % und 2 % des Extinktionskoeffizienten von Tyrosin und Tryptophan.^[246] Die Absorption bei 280 nm von Proteinen mit einem geringen Cystingehalt wird daher ausschließlich von den aromatischen Aminosäuren dominiert. Bei Kenntnis der Anzahl dieser Aminosäuren

kann der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins nach *PACE* et al.^[250] nach *Gleichung 2.5* abgeschätzt werden.

$$\epsilon_{mol} = 5500 \cdot \#Trp + 1490 \cdot \#Tyr + 125 \cdot \#Cystin$$

Gleichung 2.5: Abschätzung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{mol} von Proteinen bei 280 nm nach Pace et al.^[250] # = Aminosäureanzahl.

Unter der Voraussetzung, dass das Protein mindestens ein Molekül Tryptophan enthält und Interferenzen von Matrix und Cofaktoren ausgeschlossen werden können, ist die Berechnung mit einer Abweichung von 3.2 % (N = 93) gegenüber experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten sehr zuverlässig. In biologischen Proben ist jedoch mit Interferenzen von Nucleinsäuren und Nucleotiden zu rechnen. Diese absorbieren bei einem pH-Wert von 7.0 in einem Wellenlängenbereich von 230-300 nm mit einem Maximum bei 260 nm. *GROVES* et al.^[251] entwickelten eine experimentelle Methode der Proteinbestimmung, die den Einfluss von Nucleinsäuren eliminiert. Die Absorption eines hinsichtlich pH-Wert und Ionenstärke definierten Puffers, der Proteine und Nucleinsäuren in einer unbekanntem Menge enthält, wird bei zwei Wellenlängen gemessen und ihre Differenz berechnet (Δ -Absorption). Die gewählten Wellenlängen entsprechen dabei einem Paar gleicher Absorption der reinen Nucleinsäuren auf beiden Seiten ihres Absorptionsminimums (224 und 233 nm, pH = 7.0, Hefenucleinsäuren) in dem gleichen Puffersystem. Für die Kalibrierung wird die Δ -Absorption eines geeigneten Referenzproteins herangezogen. Der dynamische Bereich der Methode umfasst 5-180 $\mu\text{g/ml}$ und ist spürbar abhängig von der Aminosäurezusammensetzung. Ein anderer Ansatz zur Eliminierung der Interferenz von Nucleinsäuren wurde von *WARBURG* et al.^[252] beschrieben. Das Verhältnis $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ der Lösung mit unbekanntem Gehalt an Protein und Nucleinsäuren wird aus dem experimentell bestimmten Verhältnis A_{280}/A_{260} ermittelt. Die Quantifizierung der Menge an Nucleinsäuren erfolgt anhand zuvor berechneter Werte von $\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$ einer Lösung mit bekanntem unterschiedlichem Gehalt an Nucleinsäuren relativ zu einer definierten Menge an Referenzprotein. Die Anwendung dieser Methode setzt die Kenntnis von ϵ_{280} und ϵ_{260} des reinen Referenzproteins und der Nucleinsäuren voraus. Der Vorteil der UV-spektrometrischen Bestimmung bei 280 nm liegt vor allem in der geringeren Störanfälligkeit gegenüber interferierenden Substanzen. Als Nachteile sind ihre geringere Empfindlichkeit und eine höhere Protein-zu-Protein-Variabilität zu nennen.^[248]

2.3.6 Massenspektrometrische Methoden

Massenspektrometrische Methoden der Proteinquantifizierung werden in der Proteomik im Rahmen der Proteinexpressionsanalyse biologischer Systeme angewendet.^[253] Sie er-

möglichen Aussagen über den Proteingehalt einer Probe relativ zu einer Referenzprobe und beruhen auf dem Prinzip der Stabilisotopenmarkierung. Sie unterscheiden sich in der Probenvorbereitung nur geringfügig. Proteine und tryptische Peptide einer Proteinmischung werden isotoopenmarkiert und mit nichtisotoopenmarkierten Proteinen und Peptiden der Referenzprobe in einem bekannten Verhältnis gemischt. Anschließend werden diese flüssigchromatographisch getrennt und im ESI-MS/MS selektiert, fragmentiert und detektiert. Entscheidend für die Quantifizierung ist, dass sowohl isotoopenmarkiertes als auch nichtisotoopenmarkiertes Peptid des zu bestimmenden Proteins zur gleichen Zeit in der ESI-Ionenquelle ionisiert werden, so dass unterschiedliche Ionensuppressionseffekte auf die Ionensignale beider Peptide ausgeschlossen werden können. Eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Ionensuppression sollte im Vorfeld der Analyse abgeklärt werden.^[254]

Die Anwendung von *in vivo*-Methoden der Stabilisotopenmarkierung von Proteinen beschränkt sich auf die Analyse von biologischen Systemen, die in isotoopenangereicherten Kulturmedien über ihren Metabolismus Isotope aufnehmen können. Bei diesem Verfahren wird u. a. ¹⁵N in Proteine einer Zellkultur eingeführt, mit den Proteinen einer Referenzzellkultur vereinigt und die Analyse durchgeführt. Der Vorteil der *in vivo*-Methode ist, dass alle Peptide eines Proteins unabhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung markiert werden. Geringe Unterschiede im Masse-zu-Ladungsverhältnis von markiertem und unmarkiertem Peptid erfordern allerdings hohe Massenauflösungen.

Bei den *in vitro*-Verfahren der Stabilisotopenmarkierung werden Thiol-, Amino- und Carboxylgruppen von Proteinen selektiv mit einem leichten oder schweren Isotoopenlabel versehen (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Auswahl von *in vitro*-Protein- und Peptidmarkierungsmethoden für die massenspektrometrische Proteinquantifizierung.

Methode	AA	M (Label) leicht/schwer [Da]	ΔM (Label, leicht/schwer) [Da]
ICAT	Cys	614/622	8
Methylester-peptide	Asp, Glu, C-Terminus	43/46	3
GIST	Lys, N-Terminus	43/46	3
MCAT	Lys	-/-	42

Bei Anwendung der *isotope-coded affinity tag*(ICAT)-Methode werden Proteine aus zwei Proben nach Reduktion der Disulfidbrücken mit dem d⁰- bzw. d⁸-ICAT-Reagenz an der Thiolgruppe von Cystein selektiv alkyliert.^[255] Das ICAT-Reagenz besitzt die in *Abbildung 2.11* gezeigte Struktur.

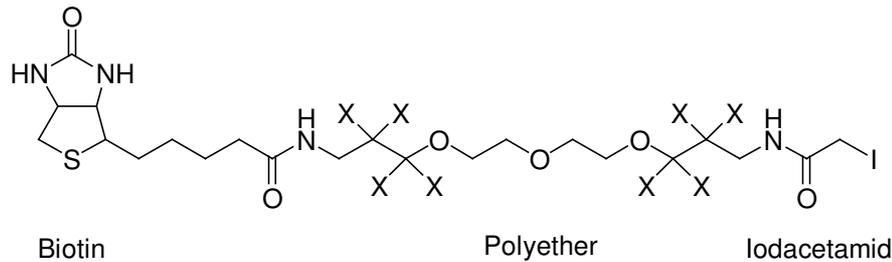


Abbildung 2.11: Struktur des ICAT-Reagenzes in seiner d^0 ($X = H$)- bzw. d^8 ($X = D$)-Form.

Die Struktureinheit des Iodacetamids fungiert in der Alkylierungsreaktion als Elektrophil, während die Differenzierung des Proteins in beiden Proben über das d^0 - bzw. d^8 -Isotopenlabel des Polyetherlinkers erreicht wird. Nach Vereinigung der Proben werden die in der Mischung enthaltenden Proteine tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide nach Anreicherung über eine Avidin-Biotin-Affinitätschromatographie massenspektrometrisch analysiert. Die relative Quantifizierung des Proteins wird anhand der Peakflächen- oder Peakhöhenverhältnisse des dem Protein entsprechenden d^0 - und d^8 -ICAT-Peptidpaares im Ionenchromatogramm durchgeführt.

Eine weitere Methode beschreibt die selektive Umsetzung der Carboxylgruppen von Aspartat, Glutamat und des C-Terminus tryptischer Peptide mit d^0 - und d^3 -Methanol zu den d^0 - bzw. d^3 -Methylesterderivaten.^[256] Neben der relativen Quantifizierung ermöglicht diese Methode eine Diskriminierung der y - von den b -Ionen von MS/MS-Spektren und erleichtert die *de novo*-Peptidsequenzierung. Im Gegensatz zu der ICAT-Methode sind auch Proteine, die kein Cystein enthalten, der Analyse zugänglich. Eine selektive Markierung von Peptiden ist auch an der freien primären Aminogruppe des N-Terminus durch Anwendung der *global internal standard strategy* (GIST)-Methode möglich. Peptide einer Proteinmischung werden mit N-Acetoxy- $[H_3]$ succinimid bzw. die der Referenzprobe mit N-Acetoxy- $[D_3]$ succinimid in einer Acylierungsreaktion umgesetzt. Jedes tryptische Peptid der Referenzprobe mit Argininseitenketten am C-Terminus besitzt daher eine um 42 Da höhere Masse. Eine 2fache Acylierung und eine Massenzunahme von 84 Da findet bei Anwesenheit von C-terminalen Lysinseitenketten statt.

Das *mass-coded abundance tag* (MCAT)-Verfahren stellt einen zur ICAT-Methode analogen Ansatz dar und wird auch für die *de novo*-Peptidsequenzierung angewendet.^[257] Tryptische Peptide einer Probe werden unter alkalischen Bedingungen einer Guanidierungsreaktion mit O-Methylharnstoff unterzogen (Abbildung 2.12).

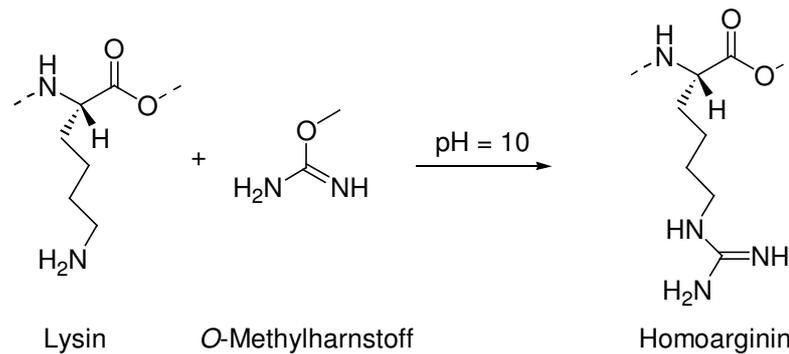


Abbildung 2.12: Guanidierung von Lysin zu Homoarginin (MCAT-Methode).

Lysin reagiert unter einer Massenzunahme von 42 Da zu Homoarginin. Im Fall der MS-Analyse ist jedoch mit einer höheren Ionenausbeute des Homoargininpeptids aufgrund einer im Vergleich zu Lysin höheren Gasphasenbasizität von Homoarginin auszugehen, die zu einem systematischen Fehler in der relativen Quantifizierung führt.

Die Proteinanalytik der vorgestellten Methoden wird in ESI-MS/MS-Systemen durchgeführt. Eine relative Quantifizierung ist aber auch mit Hilfe von MALDI-TOF-MS-Systemen an intakten Proteinen möglich. Hierfür werden vor der 2D-gelelektrophoretischen Trennung die in zwei Proben enthaltenden Proteine mit d^0 - bzw. d^3 -Acrylamid alkyliert.^[253,258] Die Proteinmischungen werden anschließend vereinigt, gelelektrophoretisch getrennt und der resultierende Spot eines Proteins im MALDI-MS gemessen.

2.4 PROTEINNITRIERUNG

2.4.1 *in vivo*-Proteinnitrierung

Reaktive Sauerstoff(ROS)- und Stickstoff(RNS)-Radikale spielen in biologischen Systemen eine wichtige Rolle in der Redoxregulation physiologischer Prozesse und in der Immunabwehr.^[259,260] In höheren Konzentrationen wirken diese jedoch cytotoxisch und verschieben die physiologischen Redoxsysteme der Zelle. Diesen Zustand nennt man oxidativen Stress. 3-Nitrotyrosin gilt als spezifische *in vivo*-Markersubstanz von RNS-Aktivitäten in zellulären Systemen und wird mit zahlreichen pathologischen Prozessen neurodegenerativer und inflammatorischer Krankheiten wie Asthma^[85,261], die rheumatoide Arthritis^[262] und die Alzheimerkrankheit^[263,264] in Verbindung gebracht. Einen Einstieg zu den Nitrotyrosin-assoziierten Krankheiten bieten die Übersichtsartikel von ISCHIROPOULOS^[265], GREENACRE^[266] und AULAK et al.^[267]

3-Nitrotyrosin bildet sich indirekt aus Peroxynitrit (ONOO^-), das aus Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (O_2^-) entsteht, durch Reaktion von Tyrosin mit aus Peroxynitrit abgeleiteten reaktiven sekundären Radikalen (NO_2 , OH und CO_3^-). Der Bildung sekundärer Radikale liegen drei unterschiedliche katalytische Zersetzungsmechanismen von Peroxynitrit zugrunde.^[260,261,265,268,269] Nach protonenkatalysierter Homolyse von Peroxynitrit entstehen aus Peroxysalpetriger Säure NO_2^- und OH -Radikale. In diesem Fall wird bevorzugt 3-Hydroxytyrosin gebildet, Tyrosin wird nur zu 10 % zu 3-Nitrotyrosin modifiziert. Bei Anwesenheit von CO_2 zerfällt Peroxynitrit über das instabile Intermediat 1-Carboxylato-2-nitrosodioxidan (ONOOCO_2^-) homolytisch in NO_2 und das sehr reaktive Carbonat-Radikal CO_3^- . Carbonat-Radikale besitzen ein höheres H-Abstraktionsvermögen relativ zu OH -Radikalen. Dies hat eine höhere Nitrierungsgeschwindigkeit und eine geringere Ausbeute von 3-Hydroxytyrosin zur Folge.^[270] Als dritte Variante wird die Übergangsmetallkatalysierte Zersetzung von Peroxynitrit beschrieben. Als Katalysatoren kommen Übergangsmetallkomplexe (Fe(III)/Mn(III) -Porphyrine), Hämproteine (Myeloperoxidase (MPO) und Hämoglobin) und Mangan- und Cu,Zn -Superoxid-Dismutasen in Frage.^[268] Im katalytischen Zyklus bilden sich aus Peroxynitrit offenbar NO_2 und Oxo-Metall-Komplexe, die durch H-Abstraktion Tyrosin zu Tyrosyl-Radikalen oxidieren. Tyrosylradikale vereinigen sich anschließend mit NO_2 zu 3-Nitrotyrosin. Die Hydroxylierung und Nitrierung von Tyrosin ist insbesondere in räumlicher Nähe von Cystein eine gegenüber der Thiol-Oxidation benachteiligte Reaktion. Cystein wird direkt aus Peroxynitrit mit hoher Geschwindigkeit zu den entsprechenden Disulfid-, Nitroso- und Nitrothiolderivaten umgewandelt. Die Tyrosinnitrierung ist nur in Anwesenheit von Übergangsmetallen und CO_2 und in exponierter Lage von Tyrosin im Protein begünstigt.^[271] Myelo- und Meerrettich-Peroxidase und Cu,Zn -Superoxid-Dismutase katalysieren außerdem die Nitrierung von Proteinen und aromatischen Verbindungen durch die Umsetzung von H_2O_2 und NO_2^- .^[272-274] Eine MPO-katalytische Bildung von hypochloriger Säure aus H_2O_2 und Cl^- in Makrophagen und Neutrophilen ist ebenfalls bekannt.^[275,276] Hypochlorige Säure (HOCl) reagiert mit Nitrat zu Nitrylchlorid (NO_2Cl), das in der Lage ist, Tyrosin zu 3-Chlor- und 3-Nitrotyrosin zu bilden. An dieser Stelle sei auf die hohe Ähnlichkeit der *in vivo*-Nitrierung mit den Nitrierungsprozessen in der Atmosphäre hinsichtlich der involvierten Radikalspezies und Mechanismen hingewiesen (*Abschnitt 2.1.6*).

Die *in vivo*-Proteinnitrierung führt zur Inaktivierung von Enzymfunktionen und interferiert mit der Signaltransduktion (Tyrosinphosphorylierung) der Zelle.^[265,266] Die Nitrogruppe verhindert den Zugang von Substraten durch sterische Hinderung in das aktive Zentrum. Durch Einführung der Nitrogruppe in der *o*-Position des Phenolringes von Tyrosin verändert sich zudem der pK_s -Wert von 10 auf 7.5. Nitrierte Tyrosylseitenketten können daher nicht mehr phosphoryliert werden. Nitrierte Proteine werden durch das Proteasom schneller abgebaut als nichtnitrierte Proteine.^[277] Die Nitrierung von körpereigenen Proteinen könnte daher den

Startschuß für ihren proteolytischen Abbau als zellulärer Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress darstellen.

2.4.2 Nitroproteinanalytik

Die Charakterisierung von nitrierten Proteinen und Peptiden erfolgt mittels immunanalytischer, massenspektrometrischer und spektrophotometrischer Methoden.

2.4.2.1 Immunanalytische Methoden

Zur Detektion von nitrierten Proteinen in biologischen Flüssigkeiten, Gewebehomogenaten und Umweltproben werden zahlreiche immunchemische Analysetechniken wie immunhistochemische Verfahren, die Western-Blotting-Analyse und Immunoassays angewendet.^[84,263,278-280] Es sind zahlreiche monoklonale und polyklonale Antikörper, die durch unterschiedliche Immunogene in zahlreichen Spezies hergestellt wurden, kommerziell erhältlich. Die Immunogene werden meist durch Nitrierung von Hämocyanin aus der Napfschnecke (KLH) oder BSA mit diversen Nitrierungsreagenzien wie Peroxynitrit oder Tetranitromethan erzeugt oder entsprechende Hapten-BSA/KLH-Konjugate synthetisiert. FRANZE^[11,12] charakterisierte sechs Antikörper hinsichtlich ihrer Affinität zu TNM-nitriertem BSA, 3-Nitrotyrosin und weiteren niedermolekularen Nitroverbindungen für eine entsprechende Bestimmung in Straßen- und atmosphärischen Feinstaubproben. Die Nitro-(14)-BSA-Nachweisgrenzen der entwickelten einseitigen und der Sandwich-Immunoassays liegen im Bereich von 0.04-0.96 bzw. 0.3-5.9 nmol/l.

2.4.2.2 Massenspektrometrische Methoden

Massenspektrometrische Methoden in der Nitroproteinanalytik werden zur Identifizierung der Zielproteine der *in vivo*-Nitrierung und der nitrierten Aminosäure angewendet. Es werden die in *Abschnitt 2.3.6* dargelegten Methoden der Proteomik angewendet.^[263,264,280,281] Die Selektivität der Proteinnitrierung wurde in zahlreichen *in vitro*-Modellstudien mit z. B. BSA, HSA oder Angiotensin untersucht und parallel die Leistungsfähigkeit der massenspektrometrischen Methoden näher unter die Lupe genommen.^[282-285] Die Reaktion von Proteinen mit TNM und Peroxynitrit *in vitro* setzt nahezu ausschließlich Tyrosin um. Phenylalanin und Tryptophan unterliegen nicht der Proteinnitrierung. GREIS^[285] beobachtete allerdings die Bildung von 3,5-Dinitrotyrosin, während SOKOLOVSKY^[286] eine partielle Oxidation von Cystein nachweisen konnte. In einer Studie von WILLARD et al.^[282] wurde die Zeitabhängigkeit der Myeloperoxidase-vermittelten *in vitro*-Nitrierung eines spezifischen Peptids in HSA demonstriert. Die Quantifizierung der Reaktion erfolgte relativ zu einem

ausgewählten nativen Referenzpeptid (NRP) aus HSA, das kein Tyrosin enthielt. Es wurde eine gute Korrelation der NRP-Methode mit der parallel durchgeführten Western-Blotting-Analyse beobachtet. *WALCHER* et al.^[283] untersuchten BSA nach Nitrierung mit TNM in flüssiger Phase und mit NO_2 und O_3 in der Gasphase relativ zu nichtnitriertem BSA mittels RP-LC-ESI-MS. Es wurden unter Annahme identischer Ionisierungsausbeuten des nitrierten und nichtnitrierten Peptids durch Vergleich der Peptidmassenspektren Nitrierungsgrade verschiedener Tyrosine bestimmt. Die Gasphasennitrierung erwies sich analog der Flüssigphasennitrierung als ein hochselektiver Prozess. Die Interpretation von Massenspektren nitrierter Peptide gestaltet sich gemäß einer Studie von *PETERSON* et al.^[284] aufgrund einer Reihe von Artefakten als schwierig. Die Nitrogruppen können bei dem laserinduzierten Ionisierungs- und Desorptionsprozess im MALDI-MS ein oder zwei Sauerstoffatome verlieren oder zum Amin reduziert werden. Das Fragmentierungsmuster zeigt außerdem eine Abhängigkeit von dem pH-Wert der Matrix. Diese Beobachtung ist auf eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Nitrophenol-Einheit zurückzuführen. Auch im Falle der ESI-MS-Analyse von tryptischen Nitropeptiden tritt eine geringere Signalintensität gegenüber der unnitrierten Spezies auf. Das Peptidmassenmapping ist daher nach *PETERSSON* et al. nur eingeschränkt geeignet, um *in vivo*-Nitroproteine zu identifizieren. Als alternative Methode eignet sich die Peptidsequenzierung und die Detektion des entsprechenden Immoniumions von 3-Nitrotyrosin im Precursorionen-Scanmodus. Eine Leistungssteigerung erfahren die ESI-MS und ESI-MS/MS-Methoden durch eine vorgeschaltete flüssigchromatographische Trennung der tryptischen Peptide.^[281,284] *NIKOV* et al.^[287] etablierten eine kombinierte Methode der spezifischen Isolation von Nitroproteinen mit einer massenspektrometrischen Bestimmung der Aminosäuresequenz und der Nitrierungsstelle. Nach Reduktion von 3-Nitrotyrosin zu 3-Aminotyrosin im Protein wird dieses biotinyliert und tryptisch verdaut. Die biotinylierten Peptide werden über eine Streptavidin-Affinitätssäule angereichert und im MS/MS-System analysiert.

2.4.2.3 UV/VIS-spektrophotometrische Bestimmung

Durch die Einführung der Nitrogruppe in Tyrosin erhöht sich der molare Extinktionskoeffizient bei 275 nm von 1 360 auf 4 000 l/(mol·cm) und ein zweites Absorptionsmaximum entsteht bei 428 nm ($\epsilon_{\text{mol}} = 4\,000$, pH = 8).^[279,286] Das Absorptionsspektrum ist pH-abhängig, so dass das Absorptionsmaximum bei 428 nm sich im Säuren zu 360 nm (pH = 3) verschiebt. Diese Eigenschaft ist auch bei Nitroproteinen zu beobachten und kann neben der Durchführung einer Proteinhydrolyse mit anschließender Aminosäureanalytik für die Bestimmung des Nitrotyrosingehaltes in Nitroproteinen eingesetzt werden.^[10]

2.4.3 3-Nitrotyrosinanalytik

2.4.3.1 Artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin

Die Analyse von freiem und proteingebundenem 3-Nitrotyrosin im Spurenbereich ist durch eine potentielle artifizielle Bildung des Analyten während der Probenahme, der Extraktion, der chemischen oder enzymatischen Proteinhydrolyse, der Vorsäulenderivatisierung und der Gefriertrocknung von Proteinen gefährdet.^[278,288] Es ist bekannt, dass endogenes Tyrosin säurekatalytisch mit Nitrit und Nitrat unter Bildung von 3-Nitrotyrosin reagiert. *FROST* et al.^[289] fanden nach Inkubation von 10 µg Tyrosin mit 10 µM Nitrit in 6 M HCl (pH = 3, 4 und 5) für 2 h bei RT einen Nitrierungsgrad von rund 1 %. Bei einem 8fachen Nitrat-zu-Tyrosin-Überschuss in einer Lösung von Trifluoressigsäureanhydrid und Trifluorethanol wurden sogar Nitrierungsgrade von 3 % beobachtet.^[290] Die artifizielle Bildung wird nach *SHIGENAGA* et al.^[291] durch Zusatz von 1 % Phenol verringert, sie wird aber nicht vollständig verhindert. Das Artefakt wird unter Umständen auch unter neutralen Bedingungen beobachtet.^[292] In zahlreichen MS-basierten Studien werden daher interne Isotopenstandards wie z.B. [2,3,5,6-²H]-, [¹³C₆]- oder [¹⁵N₁, ¹³C₉]-Tyrosin eingesetzt, um die exogene Bildung von 3-Nitrotyrosin zu überwachen.^[289,290,293] Eine andere Möglichkeit besteht in einer Abtrennung von 3-Nitrotyrosin von Matrixkomponenten vor kritischen Probenvorbereitungsschritten mittels Festphasenextraktion mit Aminopropyl-, C18-SPE- oder Polymerharz-Kartuschen, Anionenaustausch- oder RP-Chromatographie.^[10,294-296]

2.4.3.2 Proteinhydrolyse

MORTON et al.^[293] untersuchte die Stabilität von 10 µg 3-Nitrotyrosin unter den Bedingungen der konventionellen Proteinhydrolyse in 6 M HCl bei 110 °C für 20 h in Borosilikatglas-, Pyrex- und Eppendorf-Gefäßen unter Zusatz von Phenol.^[293] In den aus Polypropylen gefertigten Eppendorf-Gefäßen wurden hohe Wiederfindungen von 3-Nitrotyrosin unabhängig eines Phenolzusatzes erzielt. Bei Verwendung von Borosilikatglas wird der Analyt nur in Anwesenheit von Phenol mit guten Ausbeuten wiedergewonnen. Um eine artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin während der sauren Proteinhydrolyse zu verhindern, empfiehlt sich stets die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen mittels Größenausschlusschromatographie oder Dialyse und der Zusatz von Phenol in das Hydrolysemedium. Bei Anwendung der enzymatischen Proteinhydrolyse ist mit einer Kontamination der Probe mit 3-Nitrotyrosin aufgrund einer Autohydrolyse der Proteasen zu rechnen. Die basische Proteinhydrolyse generiert nach *FROST* et al.^[289] kein Artefakt.

2.4.3.3 HPLC-Analytik

In der Literatur sind flüssigchromatographische Analysen von 3-Nitrotyrosin mit verschiedensten Detektoren dokumentiert. Der Nachweis des Analyten mittels seiner nativen UV-Absorption ist wie für andere Aminosäuren eine sehr unempfindliche Methode. FRANZE^[297] ermittelte eine Nachweisgrenze von 0.1 µM (*on column*: 2 pmol) bei einer Absorptionswellenlänge von 220 nm. Die Trennung erfolgte auf einer C18-RP-Säule mit einem MeOH/Wasser-Eluenten mit TFA als Ionenpaarreagenz. Die Detektion bei 274 nm nach Chromatographie mit Phosphat-Puffer (pH = 3) ist mit einer Nachweisgrenze von 0.2 µM unempfindlicher.^[262,270] Der Vorteil der HPLC-UV-Methode ist in der einfachen Handhabung und schnellen Durchführung zu sehen. Sie ist daher für eine Bestimmung des Nitrotyrosingehaltes von *in vitro*-nitrierten Proteinen geeignet. Eine hohe Selektivität wird durch die Analyse des charakteristischen UV/VIS-Spektrums von 3-Nitrotyrosin im Sauren mit einem Photodiodenarray-Detektor erzielt. Eine 10fache Empfindlichkeitssteigerung erfährt die HPLC-UV-Methode nach Vorsäulenderivatisierung mit 6-Aminochinolyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbomat (AccQ).^[298] Die Nachweisgrenze von 15 nM (300 fmol) nähert sich denen der Fluoreszenzmethoden (*Abschnitt 2.2.3.1*). KAMISAKI^[299] ermittelte eine Empfindlichkeit von 2 nM (100 fmol) für 3-Nitrotyrosin nach NBD-F-Vorsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. Eine sehr wertvolle Methode stellt die elektrochemische Detektion von 3-Nitrotyrosin dar.^[278] ISHIDA^[300] und Maruyama^[301] entwickelten HPLC-Methoden zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin in Plasma bzw. Zerebralgewebe mit Nachweisgrenzen von 0.2 (10 fmol) und 0.9 nM (60 fmol). SHIGENAGA et al.^[291] wendeten eine indirekte Prozedur an, mit deren Hilfe der Analyt zu N-Acetyl-3-Aminotyrosin konvertiert und bis zu 20 fmol mittels elektrochemischer Detektion nachgewiesen werden kann. OHSHIMA et al.^[292] haben eine neuartige HPLC-basierte Analyse entwickelt, in der 3-Nitrotyrosin zu 3-Aminotyrosin auf einer Platinsäule reduziert wird. Die gefundene Nachweisgrenze liegt bei 5 nM (100 fmol). In der Literatur sind außerdem LC-MS/MS-Methoden zur Analyse von 3-Nitrotyrosin beschrieben.^[290,302,303] Die Quantifizierung des Analyten erfolgt mit dem Massenfragment $[M+H-HCOOH]^+$ mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 181$ im *single reaction monitoring*-Modus. GAUT^[302] und Yi^[290] erzielten Nachweisgrenzen von 1.6 nM (3.2 fmol) bzw. 2.2 nM (10 fmol). Messungen im *full scan*-Modus ($m/z([M+H]^+) = 227$) sind um das 10fache weniger empfindlich. DELATOUR^[294] überführte 3-Nitrotyrosin vor der LC-MS/MS-Analyse in das Butylesterderivat, um Interferenzen der Plasmamatrix zu umgehen. Die Nachweisgrenze ($m/z([M+H-C_4H_8O_2]^+) = 181$) beläuft sich auf 0.43 nM (70 fmol). Der Autor untersuchte außerdem die Anwendbarkeit verschiedener Standardisierungsmethoden. Ein großer Vorteil der LC- gegenüber den GC-MS(/MS)-Methoden ist, dass keine Derivatisierung des Analyten für eine Analyse notwendig ist. Eine artifizielle Bildung wird zu diesem Zeitpunkt der Probenvorbereitung ausgeschlossen.

2.4.3.4 GC-Analytik

Die negative chemische Ionisation (NCI) wird häufig zur Ionisierung von organischen Verbindungen mittels GC-MS eingesetzt.^[304] Sie ist deutlich empfindlicher als die Elektronenstoßionisation (EI) und ermöglicht auch die Analyse von weniger flüchtigen organischen Verbindungen. In der Literatur sind zahlreiche GC-NCI-MS-Methoden beschrieben, mit der 3-Nitrotyrosin bis in den unteren amol- bzw. pM-Bereich nachgewiesen wird.^[278,279] Die freie Aminogruppe des Analyten wird in das Trifluoracet(TFA)-, Pentafluorpropion(PFP)- bzw. Heptafluorbutyr(HFB)amid und die Carboxylgruppe in einen *n*-Propyl-, Trifluorethyl(TFE)-, Trimethylsilyl(TMS)- oder *t*-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Ester überführt (Abbildung 2.13).^[289,290,302,305,306]

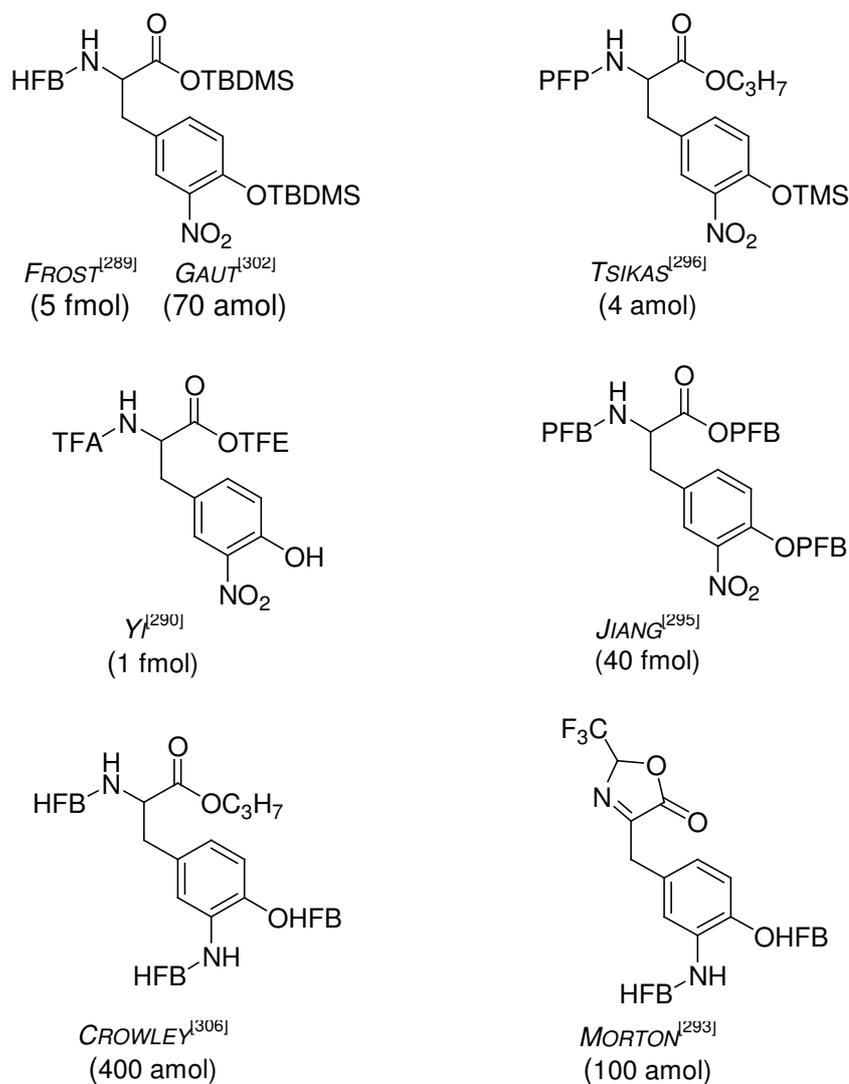


Abbildung 2.13: Derivatisierung von 3-Nitrotyrosin für die GC-NCI-MS(/MS)-Analyse. Die NWG ist in Klammern angegeben. HFB- = Heptafluorbutyr-, PFP- = Pentafluorpropion-, TBDMS- = *t*-Butyldimethylsilyl-, TFA- = Trifluoracet-, TFE- = Trifluorethyl-, TMS- = Trimethylsilyl-.

Die phenolische Hydroxylgruppe von 3-Nitrotyrosin liegt in den Derivaten in seiner freien oder in alkylsilylierter Form vor. Die Nitrogruppe ist nach Reduktion zum Amin mit Natriumdithionit ebenfalls der Derivatisierung zugänglich. 3-Nitrotyrosin wird so vor der chromatographischen Analyse in eine leichtflüchtige Verbindung mit hohem Elektroneneinfangsquerschnitt umgewandelt und massenspektrometrisch im *single ion monitoring*(SIM)- oder *single reaction monitoring*(SRM)-Modus detektiert. Die niedrigste Nachweisgrenze von 4 amol (4 pM) wird mittels einer MS/MS-Detektion erzielt.^[305]

MORTON et al.^[293] beschreiben die Überführung von 3-Nitrotyrosin in ein TFA-Oxazolinon-Derivat, die ebenfalls eine empfindliche Detektion (NWG = 0.15 nM, 100 amol) ermöglicht. Eine relativ unempfindliche Methode mit einer Nachweisgrenze von 40 fmol (40 nM) stellt die von JIANG et al.^[295] veröffentlichte Derivatisierung mit Pentafluorbenzyl(PFB)-bromid dar.

2.5 IMMUNAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (IAC)

Die Immunaффinitätschromatographie (IAC) beruht auf der reversiblen Bindung eines Analyten (z. B. ein niedermolekularer organischer Umweltkontaminant oder ein Protein) mit an einem Trägermaterial immobilisierten Fängerantikörpern. Die Antikörper (Immunglobuline) werden durch Immunisierung eines Säugetiers mit einem Antigen hergestellt. Als Antigene werden Fremdproteine, die eine Vielzahl von antigenen Determinanten (Epitope) besitzen, eingesetzt. Epitope sind bestimmte native strukturelle Komponenten des Fremdproteins und/oder kleine organische Moleküle (Haptene), die als solche vom Organismus nicht als fremd erkannt werden und daher in einer chemischen Reaktion an das Fremdprotein gebunden werden müssen (Protein-Hapten-Konjugat). Das Immunsystem wird durch die Immunisierung zur Produktion von einer Vielzahl von Antikörpern angeregt. Polyklonale Antikörper sind ein Gemisch aus Immunglobulinen mit unterschiedlichen Affinitäten zu verschiedenen Epitopen des Antigens, während monoklonale Antikörper ein Gemisch aus Immunglobulinen mit einer identischen Affinität zu einem einzigen Epitop besitzen. Für allgemeine Erläuterungen zur Struktur, Typen und Herstellung von Antikörpern siehe ALBERTS et al.^[307].

2.5.1 Anreicherung und Elution

Die traditionelle Immunaффinitätschromatographie nutzt hohe Affinitäten von $>10^5$ - 10^{11} l/mol zwischen Antikörper und Antigen.^[308] Die Probe wird auf eine IAC-Säule in einem definierten Puffer aufgegeben und die Matrixkomponenten eluiert, während der Analyt über den Antikörper an die Säule gebunden bleibt. Aufgrund der hohen Affinität werden für die Elution drastische Bedingungen benötigt, um die Antikörper-Analyt-Wechselwirkungen zu minimieren. Die in biologischen Molekülen angetroffenen nichtkovalenten Protein-Protein-Wechselwirkungen werden in ionische (Coulomb-Anziehung) und Wasserstoffbrücken-Bindungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen eingeteilt.^[307] Protein-Protein-Wechselwirkungen werden durch eine pH-Wertänderung, chaotrope Salze, eine Änderung der Ionenstärke, denaturierende Verbindungen und organische Solventien beeinflusst. Nicht-chemische Elutionstechniken wie eine Temperatur- oder Druckänderung können ebenfalls zum Ziel der Elution des Analyten führen.^[309] Diese Art der IAC wird oft auch als Affinitätsextraktion bezeichnet, da diese eher einem Extraktionsverfahren bzw. einer Festphasenextraktion im *off-line*-Modus ähnelt.^[310,311] Die Immunaффinitätschromatographie im Sinne einer chromatographischen Technik, die durch eine kontinuierliche Elution der Analyten charakterisiert ist, ist hingegen als *weak affinity chromatography* bekannt (*Abschnitt 2.5.4*).

2.5.2 Immobilisierung von Antikörpern

Die Immobilisierung von Antikörpern am Trägermaterial, das zuvor mit einem Kopplungsreagenz aktiviert wird, erfolgt über verschiedene funktionelle Gruppen der Antikörperfragmente. Der Antikörper wird entweder durch Ausbildung einer kovalenten Bindung oder aufgrund von physikalisch adsorptiven Wechselwirkungen an der Säulenmatrix fixiert.^[312-316]

Kopplung über Aminogruppen

Die Kopplung des Antikörpers erfolgt über die ϵ -Aminogruppe von Lysin in verschiedenen Antikörperdomänen und der Aminogruppe der N-terminalen Aminosäuren, in deren Bereich die Antigenbindungsstellen lokalisiert sind. Es handelt sich hierbei um eine ungerichtete, unselektive Kopplung, so dass der Antikörper einer heterogenen Orientierung relativ zur Trägeroberfläche unterliegt. Das Resultat ist ein Aktivitäts- und Kapazitätsverlust aufgrund einer induzierten Konformationsänderung und einer erschwerten Zugänglichkeit des Analyten an das Epitop aufgrund sterischer Effekte. Zur Aktivierung des Trägermaterials für einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe finden zahlreiche Kopplungsreagenzien wie N,N' - Carbonyldiimidazol, Cyanogenbromid, N-Hydroxysuccinimid, Tresyl- bzw. Tosylchlorid

Anwendung. Die Immobilisierung kann auch an Epoxid-aktivierte Träger erfolgen. Die Bindung über die γ - und δ -Carboxylgruppe von Aspartat und Glutamat ist ebenfalls eine Methode der ungerichteten, unselektiven Kopplung. In diesem Fall ist die Trägeroberfläche mit Cyanurchlorid- bzw. Phenylendiisocyanat aktiviert worden.

Kopplung über freie Thiolgruppen

Eine weitaus selektivere Methode der Antikörperimmobilisierung ist die Kopplung über freie Thiolgruppen der Antikörper. F(ab)₂-Fragmente eines Antikörpers werden so z. B. nach enzymatischem Verdau mit Pepsin und anschließender Reduktion der Disulfidbrücken mit Dithiothreitol generiert und selektiv an Divinylsulfon-, Epoxid-, Acetylbromid bzw. -iodid, Maleinimid-, TNB-thiol-, Tresyl- und Tosylchlorid-aktivierte Matrices gebunden.

Kopplung über die Polysacchariddomäne

Eine elegante Lösung zur gerichteten, kovalenten Immobilisierung von Antikörpern stellt die Kopplung über ihre Kohlenhydratdomäne dar. Sie ist in Antikörpern ausschließlich am Fc-Fragment lokalisiert. Nach einer enzymatischen oder chemischen mit Periodat durchgeführten oxidativen Spaltung eines Oligosaccharids werden diese über den entstandenen Aldehyd an den Hydrazid-aktivierten Träger immobilisiert. Die Kopplung des Antikörpers kann auch mittels einer nichtkovalenten Wechselwirkung von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) mit Biotin erfolgen. Die Affinitätskonstante dieses Systems liegt bei 10^{15} l/mol.^[314,317] Der Antikörper wird hierfür an seiner oxidierten Kohlenhydratdomäne mit Biotinhydrazid umgesetzt und an immobilisiertes Streptavidin gekoppelt.

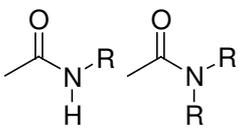
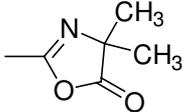
Kopplung über das Fc-Fragment

Die bakteriellen Zellwandproteine Protein A und G aus *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus* binden IgG über das Fc-Fragment unter physiologischen Bedingungen mit hohen Affinitäten. Bindet man Protein A bzw. G an ein Trägermaterial kann man diese Wechselwirkung für eine gerichtete, selektive Immobilisierung von Antikörpern nutzen. Allerdings muss mit einem Verlust von Antikörpern gerechnet werden, wenn nicht-physiologische Bedingungen z. B. zur Elution des Analyten angewendet werden.

2.5.3 Trägermaterialien

Die in der Immunaффinitätschromatographie als Träger eingesetzten Materialien lassen sich in Polysaccharid- und Silica-basierte und organisch-synthetische Polymere einteilen (*Tabelle 2.14*).^[318-321]

Tabelle 2.14: Auswahl der In der Immunaффinitätschromatographie verwendeten Trägermaterialien.

Träger	Bausteine	Oberflächenfunktion
Polysaccharide		
Agarose (Sephарose)	D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose, Verknüpfung: $\beta 1 \rightarrow 4$, Verzweigung: $\beta 1 \rightarrow 3$, quervernetzt mit Epichlorhydrin bzw. Diepoxid	
Cellulose	D-Glucose, Verknüpfung: $\beta 1 \rightarrow 4$; quervernetzt mit Epichlorhydrin	
Dextran (Sephadex)	D-Glucose, Verknüpfung: $\alpha 1 \rightarrow 6$, Verzweigung: $\alpha 1 \rightarrow 3$, quervernetzt mit Epichlorhydrin bzw. 2,3-Dibrompropanol	
Silica-basierte Träger		
Silica, porös	SiO ₂	
Controlled Pore Glass (CPG)	SiO ₂ , aus Borosilicatglas nach Abtrennung der Boratphase mit Säuren und hoher Temperatur	
Org.-synth. Polymere		
Polyacrylamide	Copolymere aus Acrylamiden und N,N'-Methyldiacrylamid	
Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA)	Copolymer aus 2-Hydroxyethylmethacrylat und Ethylenglycol-dimethacrylat	
Polyglycidylmethacrylat	2,3-Epoxypropylmethacrylat	
Azlacton-funktionalisierte Polyacrylamide	Copolymer aus Diacrylamiden und Azlacton-funktionalisierten Monomeren	
Perfusionsmatrix auf Polystyrolbasis	Copolymer aus Polystyrol und Divinylbenzol	

An ihrer Oberfläche besitzen sie funktionelle Gruppen, z. B. Hydroxyl-, Amid- und Epoxidfunktionen. Sie können funktionalisiert und für eine Immobilisierung von Antikörpern aktiviert werden. Die Träger werden häufig mit homo- bzw. heterobifunktionellen Verbindungen als Nukleophile bzw. Elektrophile umgesetzt. Um eine bessere Zugänglichkeit der reaktiven Gruppe des Antikörpers zu dem Reaktionszentrum am Träger zu erreichen, werden auf diese Weise Spacer in einer Länge von 4-10 Bindungen an die Matrix gebunden. Der Spacer kann dabei die Aktivierungsgruppe bereits enthalten. Bei der Auswahl des Trägermaterials

und des Spacers orientiert man sich an der gewünschten Aktivierungsmethode und dem Reaktionspartner am Antikörper. Die neu eingeführte Funktionalität kann dabei eine zur Oberflächengruppe entgegengesetzte Reaktivität aufweisen. Eine wichtige Anforderung an das Trägermaterial ist seine mechanische und chemische Stabilität hinsichtlich der gewünschten Anwendung. Die Materialien auf Silica- und die Perfusionen auf Polystyrolbasis zeichnen sich durch eine hohe Druckstabilität aus und sind daher für die Hochleistungsimmunaffinitätschromatographie (HPIAC) gut geeignet.^[315,320] Polysaccharide, Polyacrylamide und Polymethacrylate hingegen sind weniger druckbeständig und kommen daher überwiegend in der Niederdruckflüssigkeitschromatographie oder bei *off-line*-Extraktionen zur Anwendung. Ein Fluß der mobilen Phase wird in diesen Fällen u. a. über die Gravitation, ein angelegtes Vakuum, mit Spritzen oder mit peristaltischen Pumpen erzeugt. Bei der IAC müssen außerdem die adsorptiven Eigenschaften des Trägermaterials berücksichtigt werden, um unspezifische Bindungen des Analyten zu vermeiden. In der Regel werden die hydrophilen bioorganischen und Acrylamid- und Methacrylat-basierten Matrices bevorzugt.

2.5.4 Weak Affinity Chromatography

Während in der traditionellen Immunaффinitätschromatographie Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen mit hohen Affinitätskonstanten von $>10^5$ - 10^{11} l/mol für eine Anreicherung genutzt werden, kommen in der *weak affinity chromatography* monoklonale Antikörper mit niedrigen Affinitätskonstanten zum Antigen von $<10^5$ l/mol zur Anwendung. Da eine Elution des Analyten in diesem Fall meist unter isokratischen Bedingungen erfolgt und keine drastischen Änderungen des Eluenten nötig sind, wird diese Technik im Gegensatz zur traditionellen Affinitätsextraktion als die „echte Affinitätschromatographie“ angesehen.^[311] Der Vorteil der *weak affinity chromatography* ist in der Erhaltung der Aktivität der immobilisierten Antikörper während der milden Elution zu sehen. Das Konzept der *weak affinity chromatography* wurde erstmals von OHLSON et al.^[308,322,323] entwickelt. Die Autoren demonstrierten die Anwendbarkeit der Methode anhand von Trennungen von Oligosacchariden im HPIAC-Modus. Die monoklonalen Antikörper mit Affinitätskonstanten von $\approx 10^2$ - 10^3 l/mol wurden auf druckstabilen 10- μ m-Silicapartikeln immobilisiert und die Analyttrennung unter milden isokratischen Bedingungen bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 AMINOSÄURE- UND PROTEINANALYTIK

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten HPLC-Messungen wurden mit einem HPLC-System von Shimadzu mit Hochdruckgradientenpumpe und einem BioLC-System von Dionex mit Niederdruck- bzw. Hochdruckgradientenpumpe durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor.

3.1.1 NBD-F-Vorsäulenderivatisierung

3.1.1.1 Durchführung

4-Fluoro-7-nitro-benzoxadiazol (NBD-F) reagiert mit primären und sekundären Aminosäuren unter alkalischen Bedingungen zu den entsprechenden NBD-F-Derivaten in einer nukleophilen aromatischen Substitution (*Abbildung 3.1*).

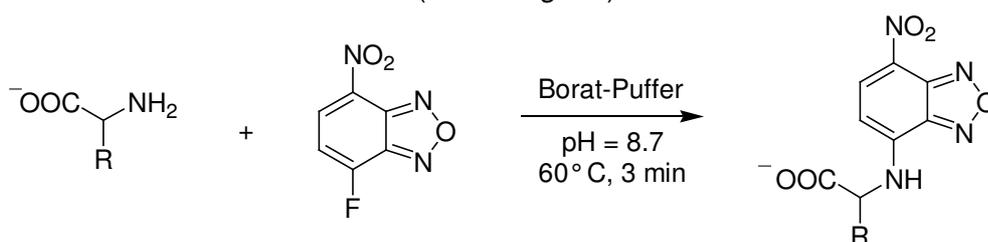


Abbildung 3.1: NBD-F-Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren. Fluoreszenzanregung: 470 nm, Fluoreszenzdetektion: 530 nm.

In *Abbildung 3.2* sind zwei Varianten der NBD-F-Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren dargestellt. Der Unterschied der vorgestellten Methoden NBD-F-VD1 und NBD-F-VD2 besteht lediglich in dem Endschrift der Derivatisierung (Schritt 4 in *Abbildung 3.2*). Als Grundlage der Methodenetablierung und -entwicklung dienen die Arbeiten von WATANABE et al.^[112]. Die Derivatisierung wird gemäß der Autoren in einer Lösung aus Borat-Puffer ($\text{pH} = 8.0$) und Ethanol bei 60°C durchgeführt. Durch Zugabe von $460 \mu\text{l}$ 5 mM Salz-

säure und das Abkühlen der Derivatisierungslösung auf Eis wird die Reaktion gestoppt. Es wurden verschiedene Änderungen dieser Methode vorgenommen, die im Folgenden näher erläutert werden. Als organisches Lösungsmittel wurde Ethanol (EtOH) durch Acetonitril (ACN) ersetzt und EDTA dem Derivatisierungs-Puffer zugesetzt, um gemäß der Studie von MIYANO et al.^[129] Störungen der Derivatisierung durch potentiell vorhandene Metallionen zu umgehen.

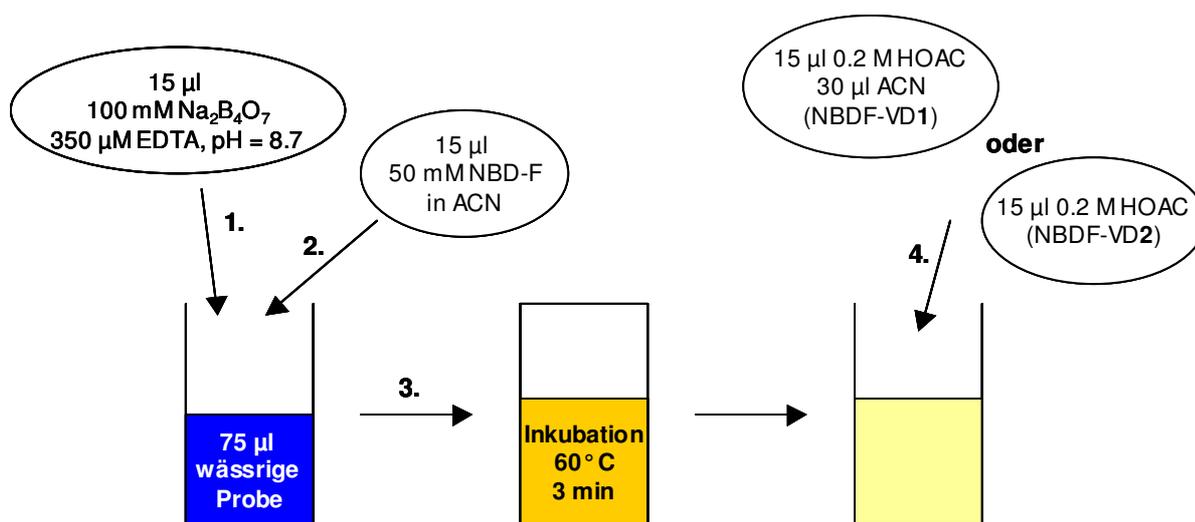


Abbildung 3.2: Durchführung der NBD-F-Vorsäulenderivatisierung nach Methode NBD-F-VD1 und NBD-F-VD2. Verdünnungsfaktor (F_{ver}): 2.0 (NBD-F-VD1) bzw. 1.6 (NBD-F-VD2), Injektionsvolumen (V_{inj}): 20 µl (Shimadzu-HPLC-System) bzw. 25 µl (Dionex-HPLC-System).

Bei Anwendung der Vorschrift von WATANABE et al. führt die 50fache Verdünnung der Probenlösung zu einem deutlichen Empfindlichkeitsverlust. Daraufhin wurde auf die Zugabe von Salzsäure verzichtet und ein geringes Volumen von 0.2 M Essigsäure (HOAc) verwendet. Die Analytkonzentration wird in Methode NBD-F-VD1 und NBD-F-VD2 lediglich um das 2fache verdünnt. Außerdem wird der pH-Wert der Derivatisierungslösung in den Pufferbereich des Essigsäure/Acetat-Puffersystems ($\text{pK}_s \pm 1$) auf 5.1 herabgesetzt. Dies führt zu einer erhöhten Lebensdauer der verwendeten Silica-basierten RP-Säule und zu einem reproduzierbaren definierten Ladungszustand der Analyten zum Zeitpunkt der Probeninjektion. Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde die Derivatisierungslösung ebenfalls auf Eis abgekühlt, dabei ist aber stets ein Niederschlag entstanden, der vor Injektion der Lösung auf die RP-Säule durch Zugabe von ACN wieder in Lösung gebracht werden musste. Um die Bildung eines kolloidalen Niederschlags generell zu vermeiden, wurde in Methode NBD-F-VD1 ACN nach der Derivatisierung zugesetzt, obwohl die Lösung nur auf RT abgekühlt wurde. In Methode NBD-F-VD2 wird das organische Lösungsmittel nicht zugegeben. Als Variante der Derivatisierung NBD-F-VD2 wurde anstelle der Addition von 0.2 M HOAc 0.4 M Phosphorsäure eingesetzt. Diese Variante sollte in Kombination mit der in *Abschnitt 3.1.1.2*

dargestellten Gradiententrennung NBD-F-G4 mit saurem 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5) angewendet werden. Das Ziel einer hohen Stabilität der Retentionszeiten (R_t) sollte erreicht werden, da sich nach Zugabe ein pH-Wert von rund 2.0-2.5 einstellt und ein Umpuffern der Injektionslösung durch den Eluenten von einem pH-Wert von 5.1 auf 2.5 umgangen werden kann. Da Adsorptionseffekte der hydrophoben NBD-Aminosäuren an den PEEK-Oberflächen der Injektionsschleife des Autosamplers beobachtet wurden und diese zu einer geringen Empfindlichkeit und Probenverschleppung führen, ist dieser Ansatz nicht weiterverfolgt worden.

Die NBD-F-Vorsäulenderivatisierung wurde auf eine quantitative Umsetzung der Aminosäuren mittels einer Reaktionskinetik von 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin unter den Bedingungen der Methode NBD-F-VD1 überprüft (Abbildung 3.3).

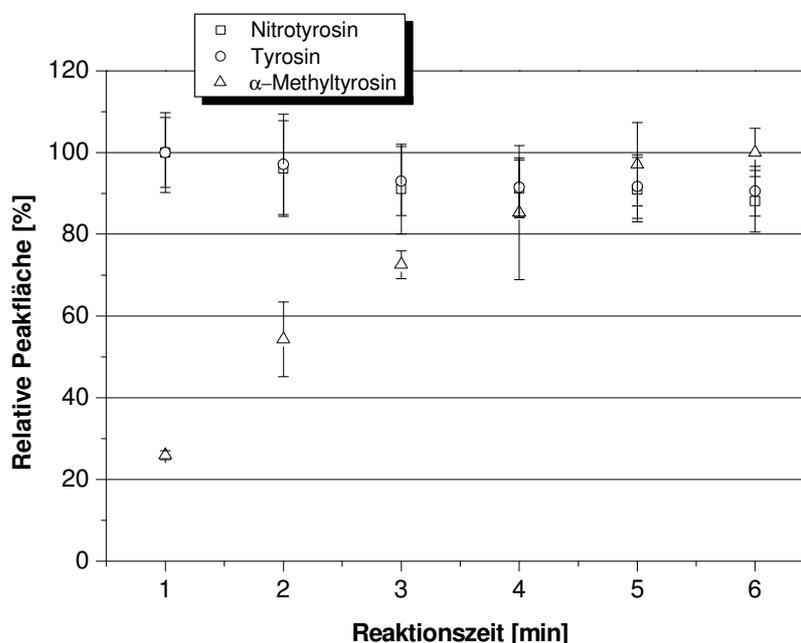


Abbildung 3.3: Relative Peakflächen von 15 pmol 3-Nitrotyrosin und Tyrosin und 75 pmol α -Methyltyrosin in Abhängigkeit der Derivatisierungszeit bei 60 °C (NBD-F-VD1). Die HPLC-Trennung (Shimadzu-HPLC-System) erfolgte mit Gradient NBD-F-G1 (Abschnitt 3.1.1.2). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von je zwei Derivatisierungen pro Zeiteinheit.

3-Nitrotyrosin und Tyrosin zeigen bereits zum Zeitpunkt der ersten Messung nach einer Minute ein maximales Messsignal, das im weiteren zeitlichen Verlauf auf 90 % abnimmt. Das Signal von α -Methyltyrosin, das als Derivatisierungsstandard eingesetzt wird, besitzt eine signifikante Zeitabhängigkeit. Die quantitative Umsetzung des Analyten ist erst nach 6 min vollständig. Diese Beobachtung kann auf eine sterische Abschirmung der nukleophilen Aminogruppe durch den in α -Position befindlichen Methylsubstituenten zurückgeführt werden. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass α -substituierte und sekundäre Aminosäuren eine längere Reaktionszeit benötigen als sterisch gut zugängliche primäre

Aminosäuren. Als Kompromiß wurde die Derivatisierungszeit auf 3 min festgelegt, obwohl die Reaktion von α -Methyltyrosin zu diesem Zeitpunkt nur zu 73 % abgeschlossen ist. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Derivatisierung siehe *Abschnitt 3.1.1.3*.

3.1.1.2 HPLC-Analyse von Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin

Zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin wurde der HPLC-Gradient NBD-F-G1 basierend auf der isokratischen Methode von KAMISAKI^[299] entwickelt. KAMISAKI et al. quantifizierten die Analyten in freier Form in Plasma und verwendeten α -Methyltyrosin als internen Standard. Die Trennung mit dem Dreistufen-Gradienten NBD-F-G1 erfolgt mit einem 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.2) und Methanol (MeOH) als HPLC-Eluenten auf der analytischen C18-RP-Säule *Nucleodur* von Macherey&Nagel. Es wird eine effiziente Abtrennung des fluoreszierenden Nebenproduktes NBD-OH von den drei Analyten erreicht (*Abbildung 3.4*). Die R_t -Präzision von Messungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen liegt deutlich unter 1 % (*Tabelle 3.1*). Signifikante R_t -Verschiebungen von rund 0.4 min zwischen verschiedenen Messserien konnten sich jedoch bei einer mehrtätigen Standzeit der RP-Säule trotz ausreichenden Spülens und Lagerung ergeben.

Tabelle 3.1: Retentionszeiten von 2x7 Aminosäurestandardlösungen (0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 und 0.30 μ M 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin, N = 14) nach Derivatisierung NBD-F-VD1 und HPLC-Trennung mit Gradient NBD-G1.

AA	R_t [min]	Präzision ⁽¹⁾ [%]
Ntyr	19.71 \pm 0.13	0.65
Tyr	20.89 \pm 0.12	0.55
Mtyr	21.77 \pm 0.19	0.88

(1) - relative Standardabweichung.

Kalibriergeraden von 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin sind in *Abbildung 3.5* dargestellt. Die relativen Signalstärken und Steigungen von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin sind nahezu identisch, beide Analyten werden daher mit gleichhoher Empfindlichkeit detektiert. Die Steigung von α -Methyltyrosin hingegen ist unter den gewählten Bedingungen (NBD-F-VD1/NBD-F-G1) um den Faktor 2 kleiner. Der interne Standard wird daher weniger empfindlich nachgewiesen. Dieses Resultat spiegelt sich auch in den Nachweis(NWG)- und Bestimmungsgrenzen (BG) der Analyten wider. Die Nachweisgrenzen belaufen sich auf 10, 13 und 19 nM bzw. 100, 130 und 190 fmol (*on column*) für 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin.

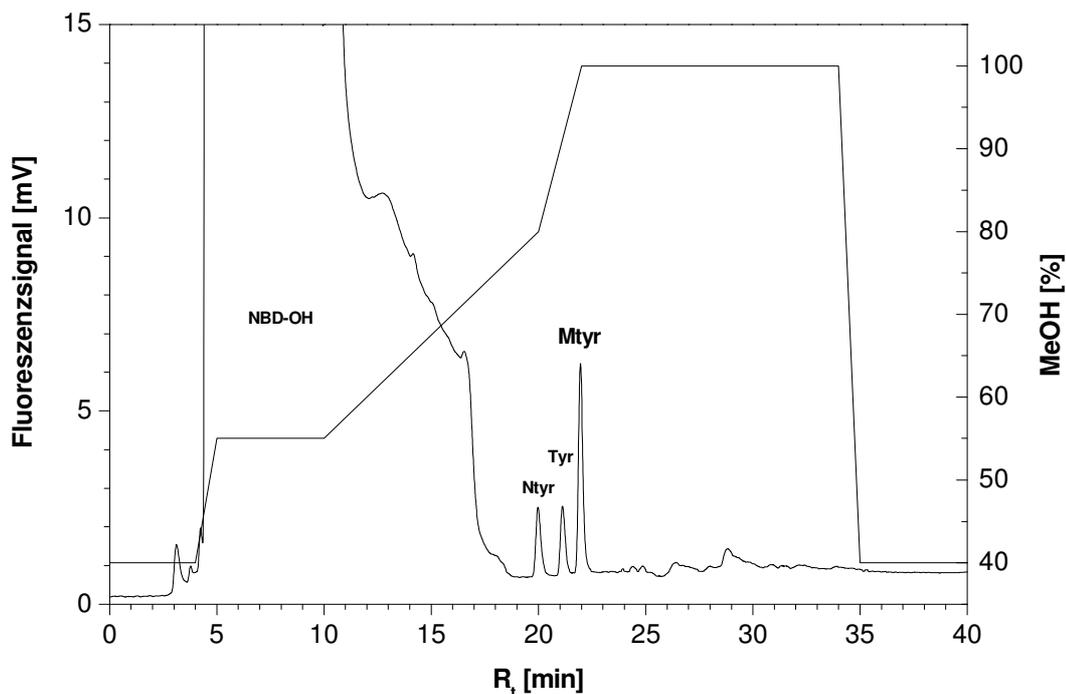


Abbildung 3.4: HPLC-FD-Standardchromatogramm von $0.2 \mu\text{M}$ 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und $1 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin nach Derivatisierung NBD-F-VD1. HPLC-Parameter (Shimadzu-HPLC-System): Injektionsvolumen: $20 \mu\text{l}$, Säule Nucleodur ($250 \times 4 \text{ mm}$, 100 \AA , $5 \mu\text{m}$, C18-RP, ec), Säulentemperatur: 30°C , Flussrate: 0.5 ml/min . Eluent A: 10 mM Natriumphosphat-Puffer ($\text{pH} = 7.2$), Eluent B: MeOH, Gradient (NBD-F-G1): 0-4 min 40 % B, 4-5 min 40-55 % B, 5-10 min 55 % B, 10-20 min 55-80 % B, 20-22 min 80-100 % B, 22-34 min 100 % B, 34-35 min 100-40 % B, 35-48 min 40 % B. Fluoreszenz-anregung: 470 nm , Fluoreszenzdetektion: 530 nm .

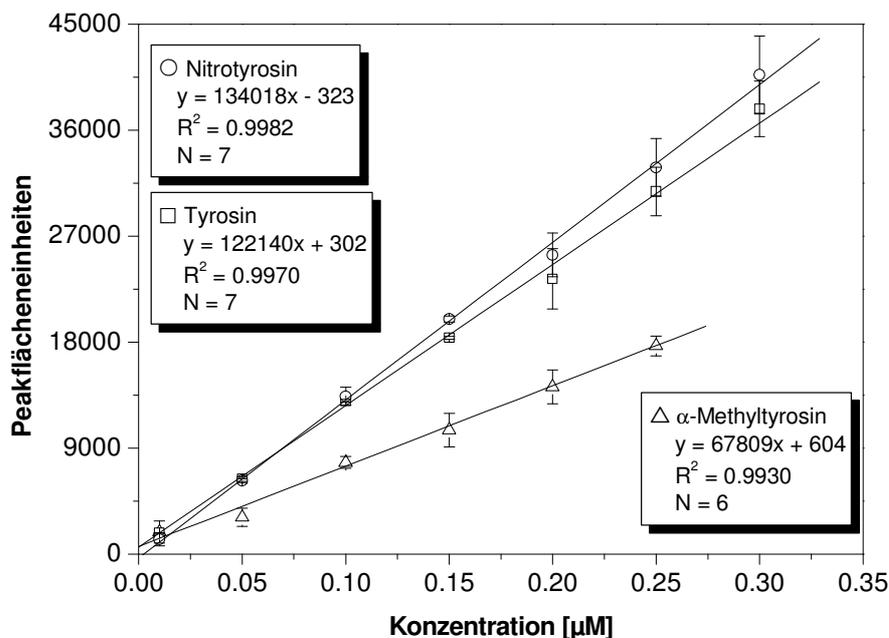


Abbildung 3.5: Kalibrierung von 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin nach Derivatisierung NBD-F-VD1 und HPLC-Trennung (Shimadzu-HPLC-System) mit Gradient NBD-G1. Die Datenpunkte ($N = 6$ bzw. 7) zeigen Mittelwert und Standardabweichung von je zwei Derivatisierungen ($N' = 2$) von zwei aufeinanderfolgenden Messtagen.

Die Bestimmungsgrenzen liegen bei 35, 45 bzw. 63 nM. Die *on column*-Nachweisgrenze von 3-Nitrotyrosin entspricht der von *KAMISAKI* et al. ermittelten Nachweisgrenze von 0.1 pmol (S/N = 3). Die Berechnung der absoluten *on column*-Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen erfolgte wie in *Abschnitt 5.4.2* beschrieben aus dem von der Derivatisierungsmethode abhängigen Verdünnungsfaktor ($F_{\text{ver}} = 2$), dem Injektionsvolumen ($V_{\text{inj}} = 20 \mu\text{l}$) und den auf die Probenlösung bezogenen relativen Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen. Als weitere HPLC-Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin in Umweltproben kam der Vierstufen-Gradient NBD-F-G2 zur Anwendung (*Abbildung 3.6*). Dieser Gradient wurde verwendet, da es weder mit Methode NBD-F-G4 noch NBD-F-G1 möglich war, Störkomponenten aus den Umweltproben, die im R_t -Bereich von 3-Nitrotyrosin eluieren, aufzulösen (*Abschnitt 3.3.6*).

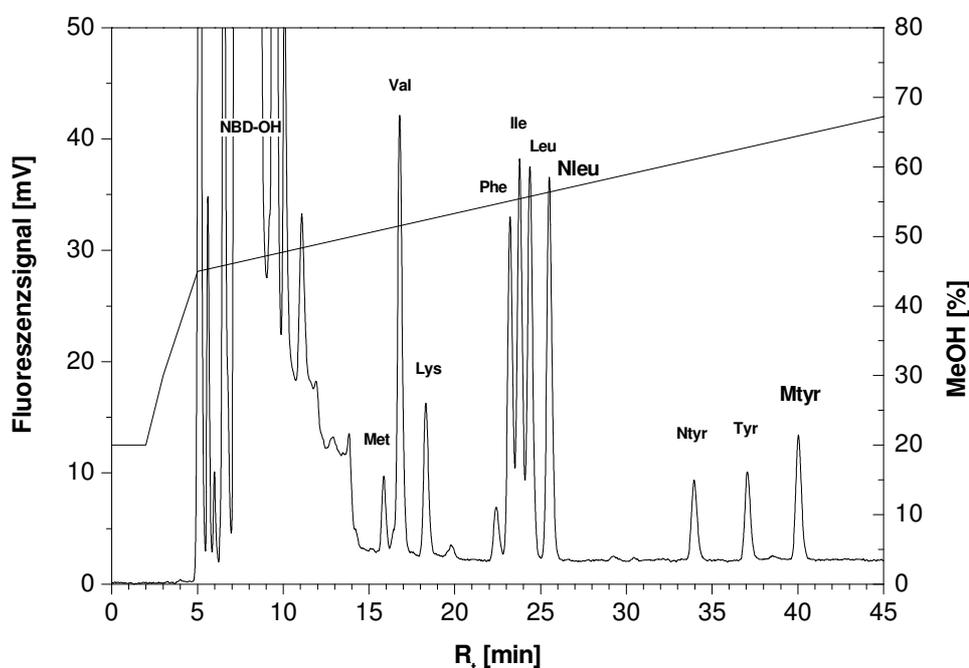


Abbildung 3.6: HPLC-FD-Standardchromatogramm von 0.2 μM AA-S-18, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und 0.4 μM α -Methyltyrosin nach Derivatisierung NBD-F-VD2. HPLC-Parameter (Dionex-P580HPG-System): Injektionsvolumen: 25 μl , Säule Nucleodur (250x4 mm, 100 \AA , 5 μm , C18-RP, ec), Säulentemperatur: 32 $^{\circ}\text{C}$, Flussrate: 1.0 ml/min. Eluent A: 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5), Eluent B: MeOH, Gradient (NBD-F-G2): 0-2 min 20 % B, 2-3 min 20-30 % B, 3-5 min 30-45 % B, 5-50 min 45-70 % B, 50-51 min 70-80 % B 51-61 min 80 % B, 61-62 min 80-20 % B, 62-77 min 20 % B. Fluoreszenzanregung: 470 nm, Fluoreszenzdetektion: 530 nm.

3.1.1.3 HPLC-Analyse von proteinogenen Aminosäuren

Gradientenoptimierung

Zur Chromatographie von proteinogenen Aminosäuregemischen wurde der Gradient NBD-F-G1 modifiziert. Die Trennung mit dem Dreistufen-Gradienten NBD-F-G3 erfolgte ebenfalls mit 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.2) und MeOH auf der analytischen C18-RP-Säule *Nucleodur* von Macherey&Nagel (*Abbildung 3.7*). In diesem Fall werden 11 proteinogene Aminosäuren und 3-Nitrotyrosin getrennt. Die polaren Aminosäuren Aspartat und Glutamat eluieren kurz nach dem Totvolumen der Säule. Eine gute Separation der unpolaren Aminosäuren konnte erzielt werden. Eine Coelution von NBD-OH mit Serin und Glycin, die nach ZHANG et al.^[36] die häufigsten Aminosäuren in Feinstaub sind, konnte jedoch unter diesen Bedingungen nicht aufgelöst werden. Die Elution von Histidin und Arginin wurde nicht individuell überprüft. Es kann aber angenommen werden, dass diese ebenfalls mit NBD-OH coeluierten. Außerdem wurde ein *peak fronting* einzelner Aminosäuren beobachtet. Diese Methode wurde daher nicht zur Aminosäurebestimmung in Proteinhydrolysaten und Umweltproben verwendet.

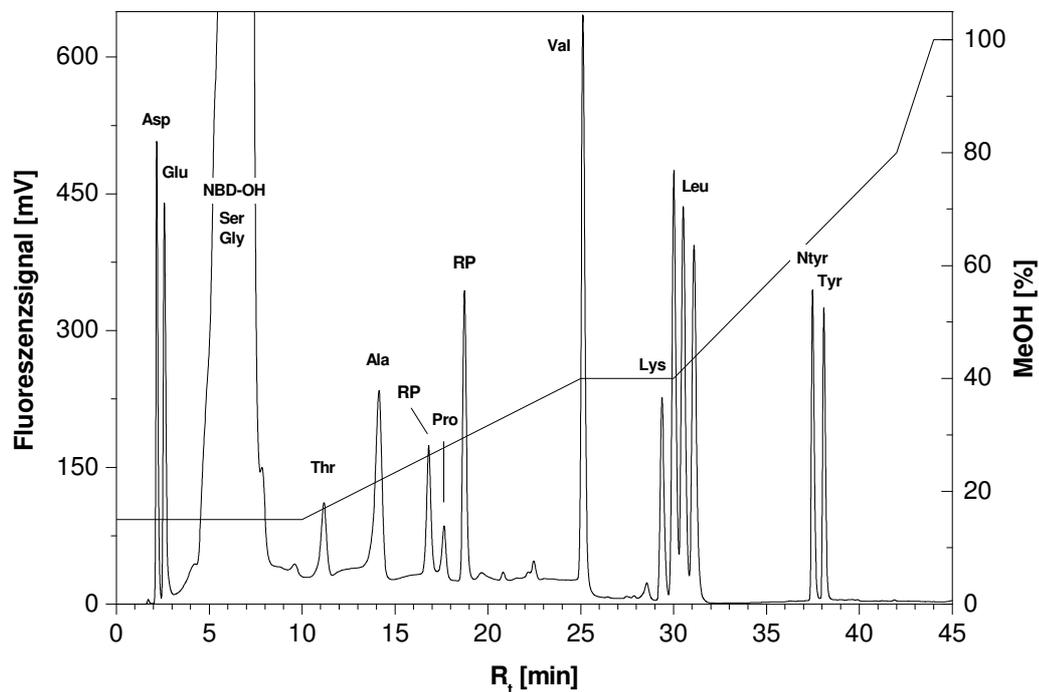


Abbildung 3.7: HPLC-FD-Standardchromatogramm von 5 µM AA-S-18 und 3-Nitrotyrosin nach NBD-F-Derivatisierung NBD-F-VD1. HPLC-Parameter (Dionex-GP50-System): Injektionsvolumen: 25 µl, Säule Nucleodur (250x4 mm, 100 Å, 5 µm, C18-RP, ec), Säulentemperatur: 37 °C, Flussrate: 1.0 ml/min. Eluent A: 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.2), Eluent B: MeOH, Gradient (NBD-F-G3): 0-10 min 15 % B, 15-25 min 15-40 % B, 25-30 min 40 % B, 30-42 min 40-80 % B, 42-44 min 80-100 % B, 44-54 min 100 % B, 54-56 min 100-15 % B, 56-66 min 15 % B. Fluoreszenzanregung: 470 nm, Fluoreszenzdetektion: 530 nm. RP = Reagenzienpeak.

Als Alternative wurde daraufhin eine pH-Wertänderung des Puffers in den sauren Bereich in Erwägung gezogen. Die Trennung mit dem Vierstufen-Gradienten NBD-F-G4 erfolgte mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5) und MeOH als HPLC-Eluenten (Abbildung 3.8). Insgesamt werden 15 proteinogene Aminosäuren, 3-Nitrotyrosin, der Hydrolyse- und der Derivatisierungsstandard Norleucin und α -Methyltyrosin akzeptabel getrennt. Unter den sauren Bedingungen sind die NBD-F-Derivate von Histidin und Arginin die Verbindungen mit der höchsten Polarität, da diese zuerst von der RP-Säule eluieren. Das Lysinderivat hingegen eluiert aufgrund der 2fachen Derivatisierung erst deutlich später, obwohl nichtderivatisiertes Lysin neben Histidin und Arginin zu den polarsten Aminosäuren zählt. Serin konnte von NBD-OH nicht getrennt werden. Aspartat eluiert in der rechten Flanke des NBD-OH-Peaks. Glutamat und Threonin sind in dem gezeigten HPLC-Chromatogramm nur partiell aufgelöst. Bei zunehmender Alterung der Säule (hohe Anzahl von Injektionen) coeluierten beide vollständig, so dass Glutamat und Threonin als Peakpaar quantifiziert wurden. Die unpolaren Aminosäuren Phenylalanin, Isoleucin und Leucin werden nicht so gut aufgelöst wie bei Verwendung von neutralem Natriumphosphat-Puffer (NBD-F-G3).

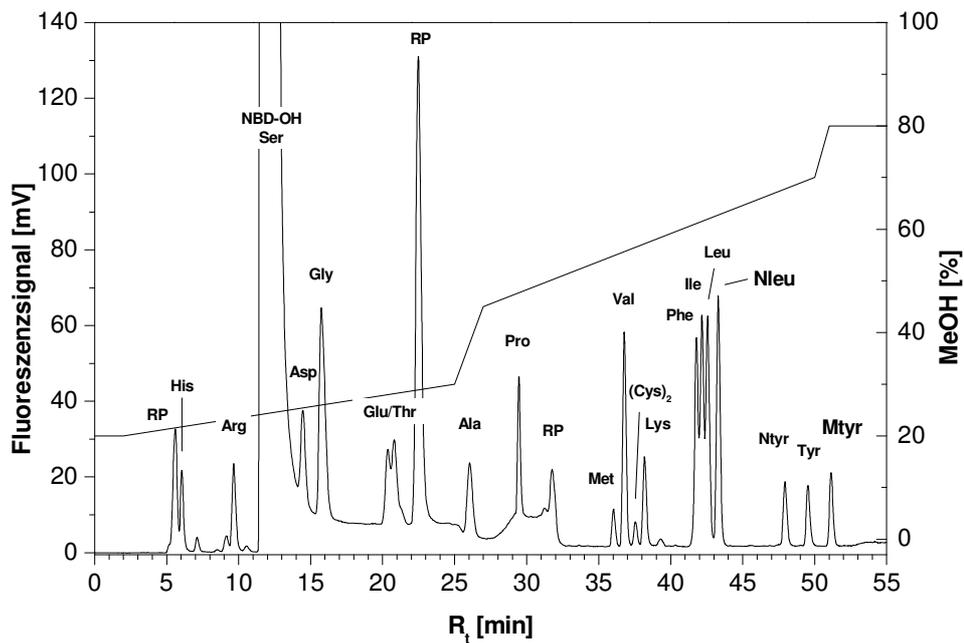


Abbildung 3.8: HPLC-FD-Standardchromatogramm von 0.2 μ M AA-S-18, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und 1 μ M Methyltyrosin nach Derivatisierung NBD-F-VD2. HPLC-Parameter (Dionex-P580HPG-System): Injektionsvolumen: 25 μ l, Säule Nucleodur (250x4 mm, 100 Å , 5 μ m, C18-RP, ec), Säulentemperatur: 32 $^{\circ}$ C, Flussrate: 1.0 ml/min, Eluent A: 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5), Eluent B: MeOH, Gradient (NBD-F-G4): 0-2 min 20 % B, 2-25 min 20-30 % B, 25-27 min 30-45 % B, 27-50 min 45-70 % B, 50-51 min 70-80 % B, 51-61 min 80 % B, 61-62 min 80-20 % B, 62-77 min 20 % B. Fluoreszenzanregung: 470 nm, Fluoreszenzdetektion: 530 nm. RP = Reagenzienpeak.

Die Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 wurde kalibriert (*Abschnitt 5.4.1*) und Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (*Abschnitt 5.4.2*) bestimmt. In *Tabelle 3.2* sind die Retentionszeiten der an drei Tagen erfolgten Messungen von 15 Aminosäurestandardlösungen aufgelistet. Die R_t -Präzision liegt bei $\leq 1.3\%$. Die niedrigste R_t -Reproduzierbarkeit zeigten die Derivate der früh bis 26.0 min eluierenden, die höchste R_t -Reproduzierbarkeit die unpolaren Aminosäuren ($\leq 0.2\%$). Eine weitere Reduzierung des pH-Wertes des Natriumphosphat-Puffers auf unter 2.0 wurde in Erwägung gezogen, um eine bessere Selektivität im Elutionsbereich des NBD-OH-Peaks durch Protonierung der Carboxylgruppen und Erhöhung der Hydrophobizität von Serin und Aspartat zu erreichen.

Tabelle 3.2: Retentionszeiten von 3x5 Aminosäurestandardlösungen (0.01, 0.05, 0.20, 0.40 und 0.60 μM AA-S-18, 3-Nitrotyrosin und Norleucin, N = 15) nach Derivatisierung NBD-F-VD2 und HPLC-Trennung mit Gradient NBD-G4.

AA	R_t [min]	Präzision ⁽¹⁾ [%]
His	6.03 \pm 0.04	0.70
Arg	9.67 \pm 0.08	0.79
Asp	14.42 \pm 0.19	1.31
Gly	15.75 \pm 0.07	0.46
Glu	20.32 \pm 0.21	1.04
Thr	20.76 \pm 0.20	0.98
Ala	26.00 \pm 0.21	0.81
Pro	29.44 \pm 0.09	0.31
Met	36.00 \pm 0.09	0.25
Val	36.75 \pm 0.08	0.21
(Cys) ₂ ⁽³⁾	37.51 \pm 0.16	0.42
Lys	38.17 \pm 0.07	0.17
Phe	41.75 \pm 0.10	0.25
Ile	42.15 \pm 0.07	0.17
Leu	42.54 \pm 0.07	0.17
Nleu	43.27 \pm 0.08	0.18
Ntyr	47.92 \pm 0.08	0.17
Tyr	49.51 \pm 0.09	0.18
Mtyr ⁽²⁾	51.12 \pm 0.09	0.17

(1) - relative Standardabweichung; (2) - in den Konzentrationen 0.02, 0.1, 0.4, 0.8 und 1.2 $\mu\text{mol/l}$; (3) - in den Konzentrationen 0.005, 0.025, 0.1, 0.2 und 0.3 $\mu\text{mol/l}$.

Herkömmliche Silica-basierte RP-Säulen besitzen allerdings bei sehr saurem pH-Wert (≤ 2.0) eine geringe Stabilität. Da kommerziell erhältliche RP-Säulen mit einer erhöhten pH-

Wertstabilität sehr teuer sind, wurden entsprechende Optimierungen nicht vorgenommen. Ein weiterer Optimierungsansatz sollte die Fähigkeit der GP50-Niederdruckgradientenpumpe zur simultanen Mischung von bis zu vier Eluenten nutzen, um einen Gradienten von saurem zu neutralem pH-Wert zu erzeugen. *Abbildung 3.9* zeigt ein entsprechendes HPLC-Chromatogramm. Die Trennung von 13 proteinogenen Aminosäuren erfolgte mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH = 2.5 und pH = 7.2 und ACN mit dem ternären Multistufen-Gradienten NBD-F-G5. Es konnte eine gute Trennung der polaren Aminosäurederivate einschließlich der Separation von Serin und NBD-OH erzielt werden. Glycin und Threonin hingegen coeluierten mit Glutamat bzw. einem Nebenprodukt der Derivatisierung. Die unpolaren NBD-F-Derivate einschließlich Tyrosin und 3-Nitrotyrosin werden im Vergleich zu NBD-F-G4 nicht separiert. Da die quartäre GP50-Niederdruck- gegen die binäre P580HPG-Hochdruckgradientenpumpe ausgetauscht wurde, sind keine weiteren Optimierungsexperimente dieses Gradienten unternommen worden.

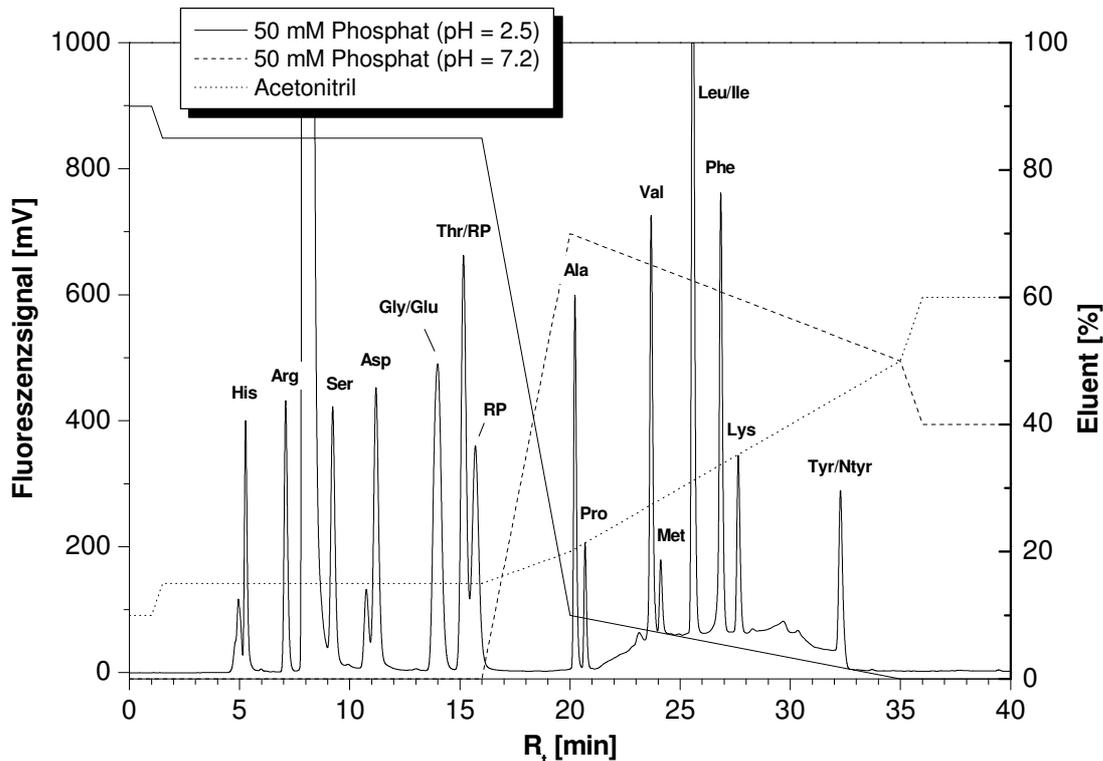


Abbildung 3.9: HPLC-FD-Standardchromatogramm von 4 µM AA-S-18 und 3-Nitrotyrosin nach Derivatisierung NBD-F-VD1. HPLC-Parameter (Dionex-GP50-System): Injektionsvolumen: 25 µl, Säule Nucleodur (250x4 mm, 100 Å, 5 µm, C18-RP, ec), Säulentemperatur: 30 °C, Flussrate: 1.0 ml/min. Eluent A: 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5), Eluent B: 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.2), Eluent C: ACN, Gradient (NBD-F-G5): 0-1 min 90 % A, 0 % B, 10 % C, 1-1.5 min 90-85 % A, 0 % B, 10-15 % C, 1.5-16 min 85 % A, 0 % B, 15 % C, 16-20 min 85-10 % A, 0-70 % B, 15-20 % C, 20-35 min 10-0 % A, 70-50 % B, 20-50 % C, 35-36 min 0 % A, 50-40 % B, 50-60 % C, 36-46 min 0 % A, 40 % B, 60 % C, 46-47 min 0-90 % A, 40-0 % B, 60-10 % C, 47-57 min 90 % A, 0 % B, 10 % C. Fluoreszenzanregung: 470 nm, Fluoreszenzdetektion: 530 nm. RP = Reagenzienpeak.

Kalibrierung

Es wurde eine 6-Punkt-Kalibrierung der Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 durchgeführt (Abbildung 3.10, Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12). Hierfür wurden fünf Kalibrierlösungen der Konzentrationen 0.01, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6 μM hergestellt, jeweils 3-mal derivatisiert und chromatographisch getrennt. Der mittlere Aminosäuregehalt von Wasser wurde aus 4 Blindderivatisierungen ermittelt und als Blindwert in die Kalibrierung einbezogen. Alle Aminosäuren zeigen eine lineare Abhängigkeit von Signal und Konzentration. Die Kalibrierung von Glycin erwies sich als problematisch, da stets ein hoher Blindwert beobachtet wurde. Aufgrund der niedrigeren Glycin-Blindwerte von Wasser, die mittels der OPA-Methode ermittelt wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen Reagenzienpeak handelt. Der Blindwert variierte von einem Messtag zum darauffolgenden so stark, dass lediglich die Glycinmessungen eines Tages für die Kalibrierung herangezogen werden konnten und die des Vortages verworfen werden mussten. Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Leucin und Norleucin werden - gemessen an ihrer Steigung m - mit Werten von 72-84 ($\text{mV}\cdot\text{min}\cdot\text{l}$)/ μmol am empfindlichsten nachgewiesen. Histidin, Methionin, Cystin und α -Methyltyrosin besitzen um den Faktor 4-14 niedrigere Empfindlichkeiten von 6-18 ($\text{mV}\cdot\text{min}\cdot\text{l}$)/ μmol . Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen als Maß für die Reproduzierbarkeit der Derivatisierung NBD-F-VD2 sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Im Konzentrationsbereich von 0.05-0.6 μM betragen sie mit Ausnahme der NBD-F-Derivate von Arginin und Lysin 0.6-22.1 %. Eine hohe Reproduzierbarkeit der Derivatisierung von Arginin und Lysin im unteren und mittleren Konzentrationsbereich ist nicht gewährleistet. Es ist mit Abweichungen von bis zu 38 % für Arginin und 36 % für Lysin in ihrer Response nahe der Bestimmungsgrenze zu rechnen.

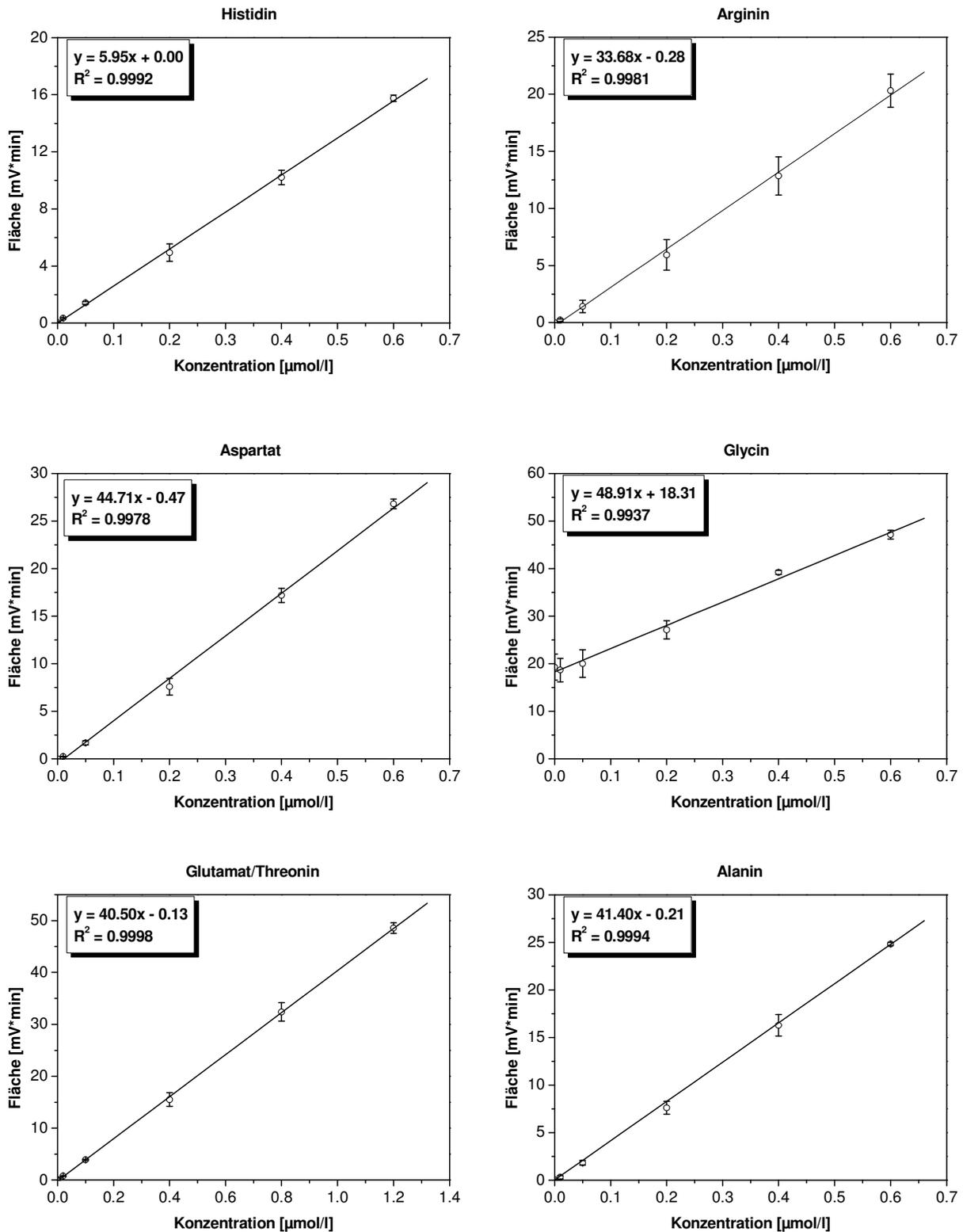


Abbildung 3.10: Kalibrierung von Histidin, Arginin, Aspartat, Glycin, Glutamat/Threonin und Alanin nach Derivatisierung NBD-F-VD2 und HPLC-Trennung mit Gradient NBD-F-G4. Die Datenpunkte ($N = 6$) zeigen Mittelwert und Standardabweichung von je drei bzw. 4 Derivatisierungen ($N' = 3$ bzw. $N' = 4$). Die HPLC-Messungen erfolgten an drei Messtagen.

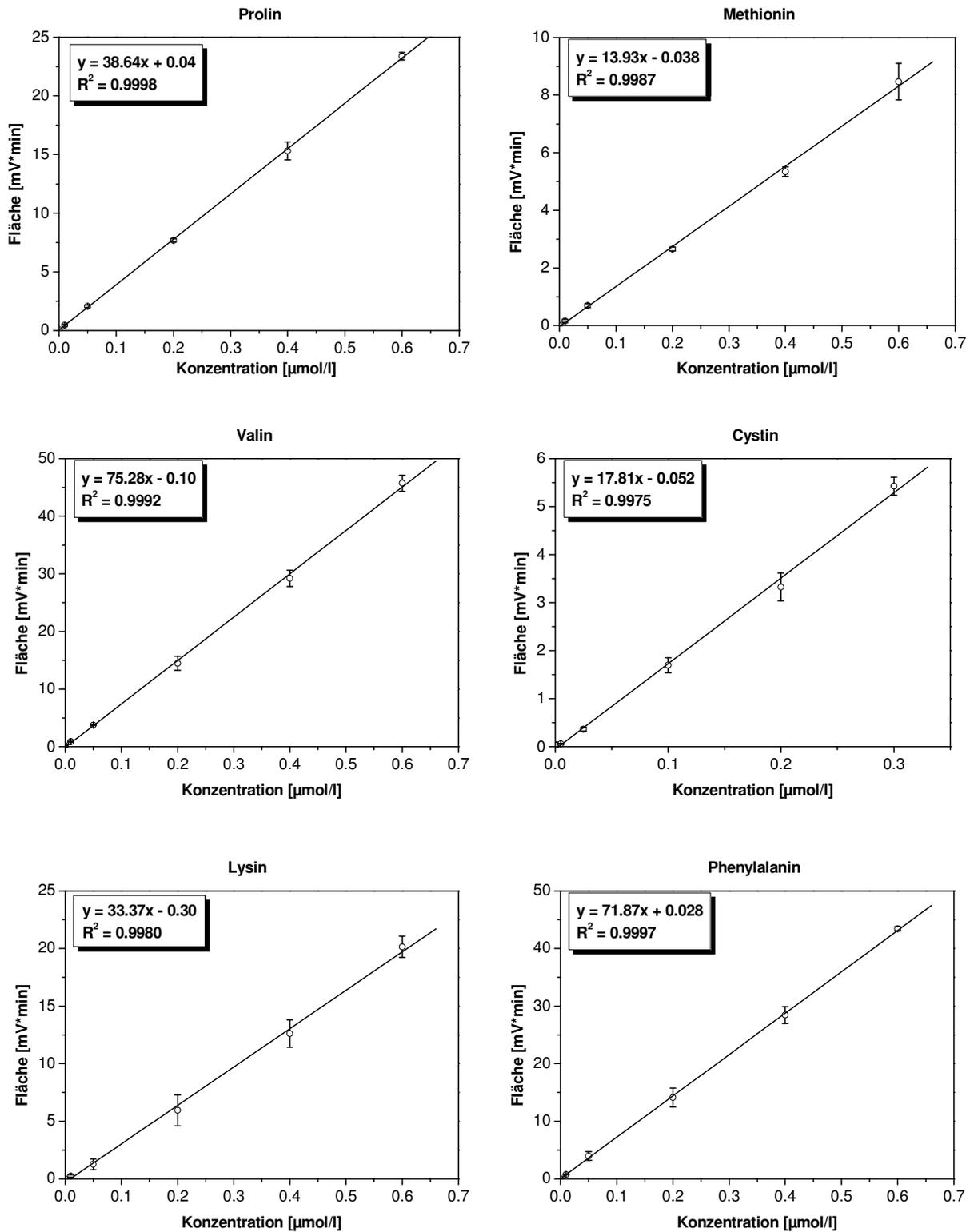


Abbildung 3.11: Kalibrierung von Prolin, Methionin, Valin, Cystin, Lysin und Phenylalanin nach Derivatisierung NBD-F-VD2 und HPLC-Trennung mit Gradient NBD-F-G4. Weitere Erläuterungen vgl. Abbildung 3.10.

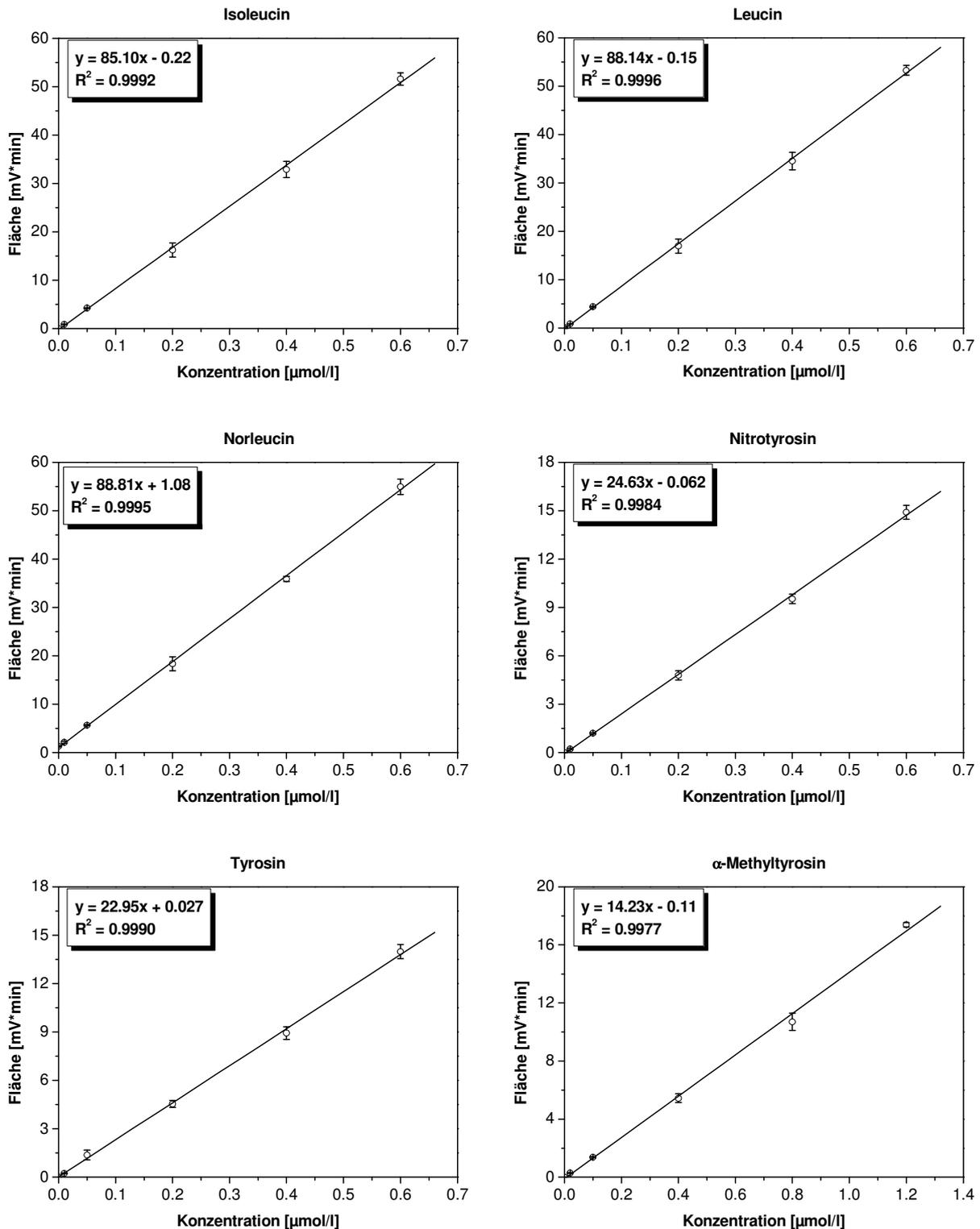


Abbildung 3.12: Kalibrierung von Isoleucin, Leucin, Norleucin, 3-Nitrotyrosin, Tyrosin und α -Methyltyrosin nach Derivatisierung NBD-F-VD2 und HPLC-Trennung mit Gradient NBD-F-G4. Weitere Erläuterungen vgl. Abbildung 3.10.

Tabelle 3.3: Relative Standardabweichung [%] der Peakflächen von Aminosäurestandardlösungen der in Abbildung 3.10, Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 dargestellten Kalibration (Derivatisierung NBD-F-VD2, Gradient NBD-F-G4).

AA	Konzentration				
	0.01	0.05	0.2	0.4	0.6
	[µmol/l]				
His	14.9	6.6	12.4	5.0	1.4
Arg	51.0	38.0	22.6	13.0	7.1
Asp	10.0	12.6	11.4	4.2	1.9
Gly	13.1	14.6	7.1	1.1	2.0
Glu/Thr ⁽¹⁾	8.7	3.4	8.4	5.4	2.1
Ala	57.7	12.9	9.0	7.0	0.6
Pro	18.3	5.6	1.9	5.0	1.4
Met	32.2	10.0	2.6	3.0	7.5
Val	7.7	1.5	8.5	4.9	3.1
(Cys) ₂ ⁽²⁾	19.5	11.0	9.2	8.7	3.4
Lys	40.4	36.4	22.5	9.4	4.6
Phe	7.9	19.0	11.7	5.2	0.9
Ile	8.6	2.0	9.0	5.1	2.5
Leu	7.7	2.5	8.7	5.2	1.9
Nleu	9.6	2.6	7.9	1.5	2.9
Ntyr	21.6	3.8	6.0	3.1	2.9
Tyr	9.3	22.1	4.6	4.4	3.2
Mtyr ⁽¹⁾	14.2	2.6	5.4	5.6	0.9

(1) - in den Konzentrationen 0.02, 0.1, 0.4, 0.8 und 1.2 µmol/l; (2) - in den Konzentrationen 0.005, 0.025, 0.1, 0.2 und 0.3 µmol/l.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 wurden sowohl aus Kalibrierkenndaten gemäß DIN 32645 als auch aus Messungen von Blindwerten mittels der Blindwertmethode ermittelt (Abschnitt 5.4.2). Die höchste Nachweisgrenze beider Verfahren wurde als Quantifizierungskriterium für die Aminosäurebestimmung in den analysierten Protein- und Feinstaubproben zugrundegelegt.

Tabelle 3.4: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt aus 4 Blindwerten (Blindwertmethode) und aus Kalibrierdaten gemäß DIN32645 der in Abbildung 3.10, Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 gezeigten Kalibrierung (0.0-0.6 μM , $N = 6$, $N' = 3$, Kalibriermethode). Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4. Verdünnungsfaktor (F_{ver}): 1.6, Injektionsvolumen (V_{inj}): 25 μl . Fett gedruckte Werte repräsentieren die höchsten NWG.

AA	Blindwertmethode		Kalibriermethode	
	NWG	BG	NWG	BG
[nmol/l]				
His	10.5	31.6	12.9	25.8
Arg	_(1)	_(1)	20.4	40.8
Asp	_(1)	_(1)	22.1	44.2
Gly	189.2	583.1	37.2	74.3
Glu/Thr	25.8	70.2	13.6	52.2
Ala	11.1	21.9	11.9	23.7
Pro	6.5	20.1	6.6	13.1
Met	_(1)	_(1)	16.7	33.4
Val	8.4	19.7	13.6	27.3
(Cys) ₂	15.5	40.5	11.8	23.6
Lys	_(1)	_(1)	21.2	42.4
Phe	1.5	5.1	7.8	15.6
Ile	_(1)	_(1)	13.5	27.0
Leu	9.9	26.2	9.6	19.3
Nleu	7.2	17.9	10.6	21.2
Ntyr	_(1)	_(1)	11.6	23.3
Tyr	_(1)	_(1)	14.6	29.2
Mtyr	_(1)	_(1)	44.6	89.2

(1) - kein Blindwert.

Die NWG liegen im unteren nM-Bereich (6.6-25.8 nM) mit Ausnahme von α -Methyltyrosin und Glycin (44.6 nM bzw. 0.19 μM). Die *on column*-NWG belaufen sich demnach unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Injektionsvolumens auf 103-403 fmol bzw. 697 fmol und 2.96 pmol für α -Methyltyrosin und Glycin. Die NWG von Glycin und Glutamat/Threonin werden deutlich von den Blindwerten dominiert. Die BG der Kalibriermethode sind um das 2fache höher als die NWG.

3.1.2 OPA/MPA-Vorsäulenderivatisierung

Die HPLC-Messungen mit den in diesem Abschnitt vorgestellten Methoden wurde mit der P580HPG-Hochdruckgradientenpumpe des Dionex-HPLC-Systems durchgeführt.

3.1.2.1 Durchführung

o-Phthaldialdehyd (OPA) reagiert mit primären Aminosäuren unter alkalischen Bedingungen in Anwesenheit von 3-Mercaptopropionsäure (MPA) zu Thiol-substituierten Isoindol-Aminosäurederivaten (Abbildung 3.13). Sekundäre Aminosäuren reagieren nicht.

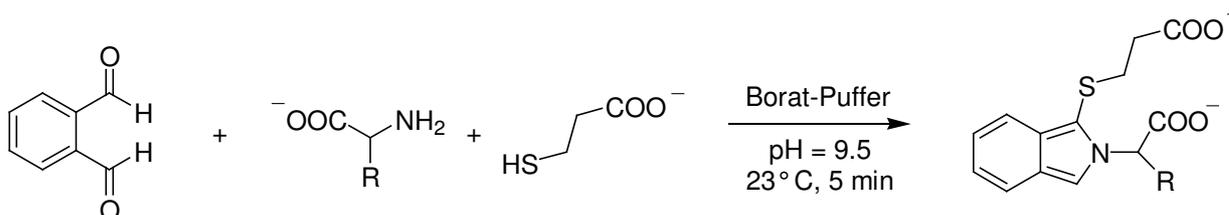


Abbildung 3.13: OPA/MPA-Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren. Fluoreszenzanregung: 330 nm, Fluoreszenzdetektion: 460 nm.

Alle Proben wurden nach der in Abbildung 3.14 gezeigten Methode OPA-VD1 mithilfe des Software-gesteuerten AS50-Autosampler-Probengebers nach Empfehlungen von MOLNÁR-PERL et al.^[119,120] derivatisiert.

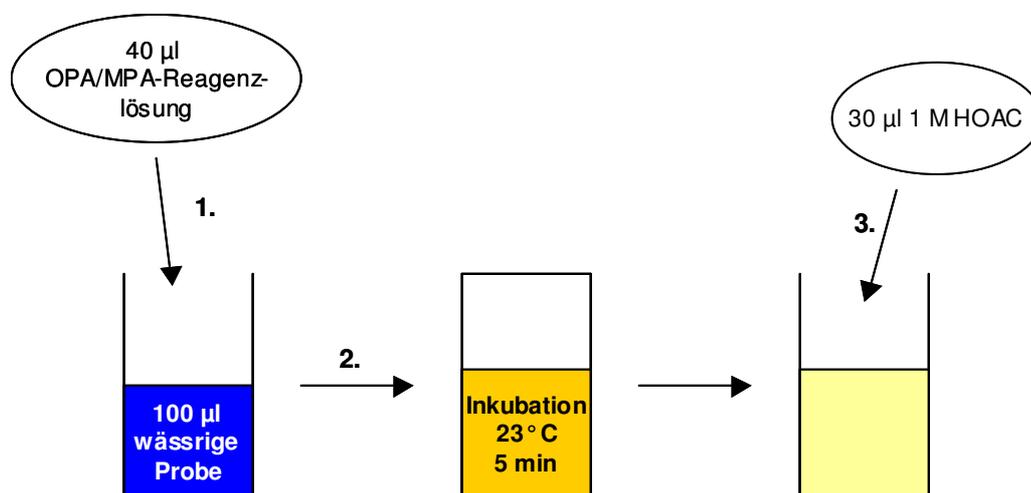


Abbildung 3.14: Durchführung der OPA/MPA-Vorsäulenderivatisierung nach Methode OPA-VD1. Die OPA/MPA-Reagenzlösung enthält 30 mM *o*-Phthaldialdehyd (OPA), 92 mM 3-Mercaptopropionsäure (MPA), 278 µM EDTA und 1 % SDS in 160 mM Borat-Puffer (pH = 9.5). Verdünnungsfaktor (F_{ver}): 1.7, Injektionsvolumen (V_{inj}): 25 µl (Dionex-HPLC-System).

Das Verhältnis OPA/MPA in der Derivatisierungslösung beträgt 1/3, während das OPA-Reagenz bei Umsetzung einer 0.2 µM Aminosäurestandardlösung im 3 000fachen Überschuss vorliegt. EDTA wurde nach MIYANO et al.^[129] als Komplexbildner in 30fachem

Überschuss zur Gesamtaminosäure-Stoffmenge zugesetzt. Die Anwesenheit von SDS führt nach JONES^[109] zu einer höheren Fluoreszenz-Response von Lysin. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von 1 M HOAc auf 5.1 herabgesetzt. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Derivatisierung siehe *Abschnitt 3.1.2.2*.

3.1.2.2 HPLC-Analyse von proteinogenen Aminosäuren

Für die Aminosäureanalyse von Aminosäurestandardlösungen, Protein- und Feinstaubhydrolysaten erfolgte die Trennung der Isoindol-Aminosäuren nach Derivatisierung OPA-VD1 mit dem Sechsstufen-Gradienten OPA-G1. Als Eluenten wurden als wässrige Phase ein 50 mM Natriumacetat-Puffer mit 0.044 % Triethylamin (pH = 6.5) und als organische Phase ein MeOH/ACN(1:1)-Gemisch eingesetzt. Eine Trennung von 15 proteinogenen Aminosäuren, Ornithin und Norvalin wird auf der analytischen C12-RP-Säule *Synergi MaxRP* von Phenomenex erzielt (*Abbildung 3.15*). Eine Basislinientrennung von Glycin und Threonin sowie Valin und Methionin konnten jedoch nicht erzielt werden. Alle Aminosäuren zeigen mit Ausnahme von Histidin, Glycin, Ornithin und Lysin eine vergleichbare Response. Diese Aminosäuren eluieren je nach Derivatisierungsbedingungen aufgrund der Reaktion mit bis zu drei OPA-Molekülen in Form von mehreren Peaks.^[117-120] Zwei Signale im HPLC-FD-Standardchromatogramm konnten Ornithin zugeordnet werden. In *Abbildung 3.16* ist ein Korrelationsdiagramm der Peakflächen der als Ornithin identifizierten Derivate dargestellt. Der Korrelationskoeffizient R^2 bestätigt die Zuordnung. Das Peakflächenverhältnis von Ornithin 1 zu Ornithin 2 beträgt 78 % und kann neben R_t als ein weiteres Identifizierungskriterium in den untersuchten Realproben herangezogen werden. Histidin, Lysin und Glycin bilden offensichtlich unter den Bedingungen der Derivatisierungsmethode OPA-G1 keine weiteren Derivate. Als interner Standard wurde Norvalin eingesetzt, da Norleucin mit Leucin coeluiert. 3-Nitrotyrosin wurde in einer Konzentration von 0.1 μ M mit Methode OPA-VD1/OPA-G1 analysiert. Ein entsprechender Peak wurde in dieser Konzentration jedoch nicht beobachtet. Eine sehr gute R_t -Reproduzierbarkeit ist für alle Aminosäurederivate gegeben. Die Präzision von Messungen an zwei aufeinanderfolgenden Messtagen liegt mit Ausnahme der polaren OPA/MPA-Derivate von Aspartat und Glutamat bei 0.1-0.2 % (*Tabelle 3.5*).

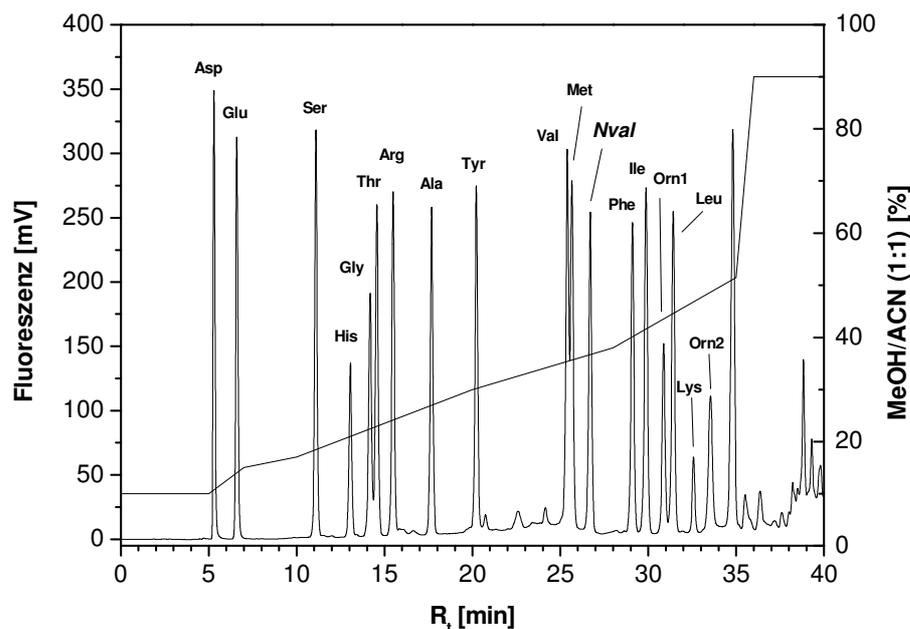


Abbildung 3.15: HPLC-FD-Standardchromatogramm von $0.2 \mu\text{M}$ AA-S-18, Norvalin und $1 \mu\text{M}$ Ornithin nach Derivatisierung OPA-VD1. HPLC-Parameter (Dionex-P580HPG-System): Injektionsvolumen: $25 \mu\text{l}$, Säule Synergi MaxRP ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, 80 \AA , $4 \mu\text{m}$, C12-RP), Säulentemperatur: 37°C , Flussrate: 1.0 ml/min . Eluent A: 50 mM Natriumacetat-Puffer, 0.044% TEA ($\text{pH} = 6.5$), Eluent B: MeOH/ACN (1:1), Gradient OPA-G1: 0-5 min 10 % B, 5-7 min 10-15 % B, 7-10 min 15-17 % B, 10-20 min 17-30 % B, 20-28 min 30-38 % B, 28-35 min 38-51.5 % B, 35-36 min 51.5-90 % B, 36-47 min 90 % B, 47-48 min 90-10 % B, 48-54 min 10 % B. Fluoreszenzanregung: 330 nm , Fluoreszenzdetektion: 460 nm .

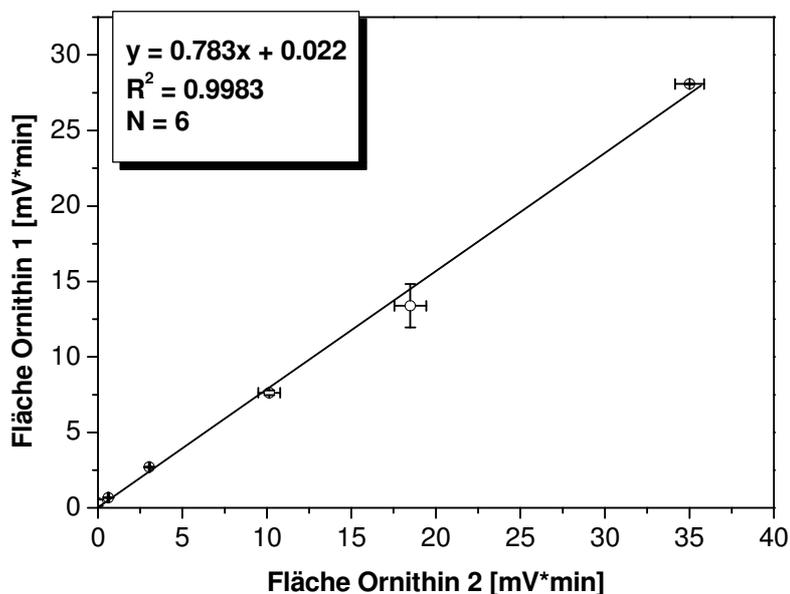


Abbildung 3.16: Korrelation der Peakflächen von Ornithin 1 und Ornithin 2 in den Konzentrationen 0, 0.025 , 0.1 , 0.3 , 0.5 und $1.0 \mu\text{M}$.

Tabelle 3.5: Retentionszeiten von 2×5 Aminosäurestandardlösungen (0.005, 0.02, 0.06, 0.1 und 0.2 µmol/l AA-S-18 und Norvalin, N = 10). Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit HPLC-Trennung OPA-G1.

AA	R _t [min]	Präzision ⁽¹⁾ [%]
Asp	5.29 ± 0.03	0.56
Glu	6.57 ± 0.04	0.65
Ser	11.04 ± 0.02	0.18
His	12.99 ± 0.02	0.19
Gly	14.09 ± 0.03	0.19
Thr	14.48 ± 0.02	0.15
Arg	15.43 ± 0.03	0.16
Ala	17.60 ± 0.02	0.14
Tyr	20.15 ± 0.03	0.13
Val	25.31 ± 0.03	0.12
Met	25.57 ± 0.03	0.12
Nval	26.61 ± 0.03	0.12
Phe	29.01 ± 0.04	0.13
Ile	29.77 ± 0.04	0.12
Orn 1 ⁽²⁾	30.75 ± 0.06	0.20
Leu	31.33 ± 0.03	0.11
Lys	32.47 ± 0.05	0.14
Orn 2 ⁽²⁾	33.46 ± 0.04	0.12

(1) - relative Standardabweichung; (2) - in den Konzentrationen 0.025, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 µmol/l.

Kalibrierung

Für die Quantifizierung von Aminosäuren in Protein- und Feinstaubhydrolysaten wurden prinzipiell 5- bzw. 6-Punkt-Kalibrierungen durchgeführt (*Abbildung 3.17*, *Abbildung 3.18* und *Abbildung 3.19*). Hierfür wurden 4 bzw. 5 Kalibrierlösungen der Konzentration 0.02, 0.06, 0.1 und 0.2 µmol/l oder 0.005, 0.02, 0.06, 0.1 und 0.2 µmol/l jeweils 2-mal derivatisiert und chromatographisch getrennt. Der mittlere Aminosäuregehalt von Wasser wurde aus 4 oder 5 Blindderivatisierungen ermittelt und als Blindwert in die Kalibrierung einbezogen. Die Qualität der Derivatisierungsreagenzien konnte dadurch ebenfalls überwacht werden. Als Kriterium für die Linearität wurde der visuelle Linearitätstests angewendet. Histidin, Arginin, Ornithin 1, Ornithin 2 und Lysin wurden zusätzlich auf eine bessere Regression durch Annahme einer quadratischen Korrelation geprüft. Bei einer besseren relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x0} der quadratischen Regression wurde mit dem Anpassungstest nach Mandel auf Signifikanz getestet.^[349] Bestätigte sich diese, so wurde die lineare Kalibrierung

verworfen und die quadratische Funktion als Kalibrierfunktion angewendet. Je sieben Kalibrierungen von Histidin, Arginin, Ornithin 1, Ornithin 2 und Lysin wurden auf diese Weise untersucht. Die quadratische Regression von Histidin, Lysin und Ornithin 1 zeigten stets eine bessere V_{xo} und ein besseres Bestimmtheitsmaß R^2 . Eine Signifikanz wurde hingegen nur bei je einer bzw. zwei Kalibrierungen nachgewiesen. In insgesamt fünf bzw. sechs der sieben Kalibrierungen zeigten die quadratischen Regressionen für Arginin und Ornithin 2 ebenfalls eine bessere V_{xo} . Der Anpassungstest nach Mandel bestätigte allerdings in nur einem Fall von Ornithin 2 eine Signifikanz.

Die Kalibrierung wurde an zwei aufeinanderfolgenden Messtagen durchgeführt. Valin, Isoleucin, Serin, Leucin und Methionin werden - gemessen an ihrer Steigung m - mit Werten von >250 (mV·min·l)/ μ mol am empfindlichsten nachgewiesen. Histidin, Lysin und Ornithin besitzen um das 2fache niedrigere Empfindlichkeiten von <122 (mV·min·l)/ μ mol. Um einen Eindruck über die Stabilität der Methode zu gewinnen, wurden die Steigungen von acht in einem Zeitraum von sieben Monaten durchgeführten Kalibrierungen verglichen. Für 13 Aminosäuren wurden relative Standardabweichungen von 5-8 % ermittelt. Die Steigungen der linearen Kalibrierfunktionen der basischen Aminosäuren Histidin, Arginin und Lysin jedoch variierten um 14-15 %, die von Ornithin 1 und Ornithin 2 sogar um 19 bzw. 31 %.

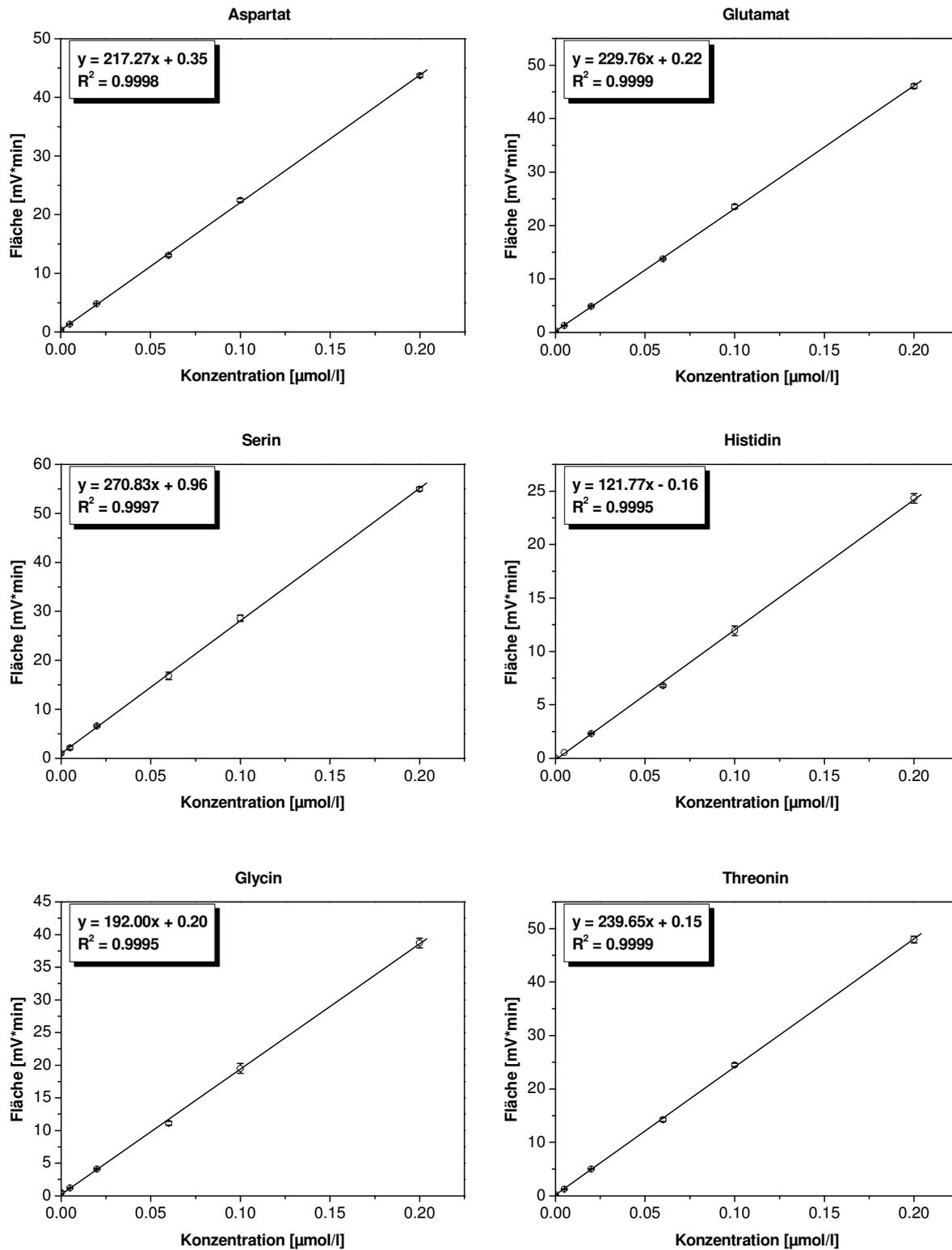


Abbildung 3.17: Kalibrierung von Aspartat, Glutamat, Serin, Histidin, Glycin und Threonin nach Derivatisierung OPA-VD1 und HPLC-Trennung mit OPA-G1. Die Datenpunkte ($N = 6$) zeigen Mittelwert und Standardabweichung von je zwei Derivatisierungen ($N' = 2$) einer Aminosäurestandardlösung (AA-S-18, Norvalin und Ornithin) der angegebenen Konzentrationen. Die HPLC-Messungen erfolgten an zwei aufeinanderfolgenden Messtagen.

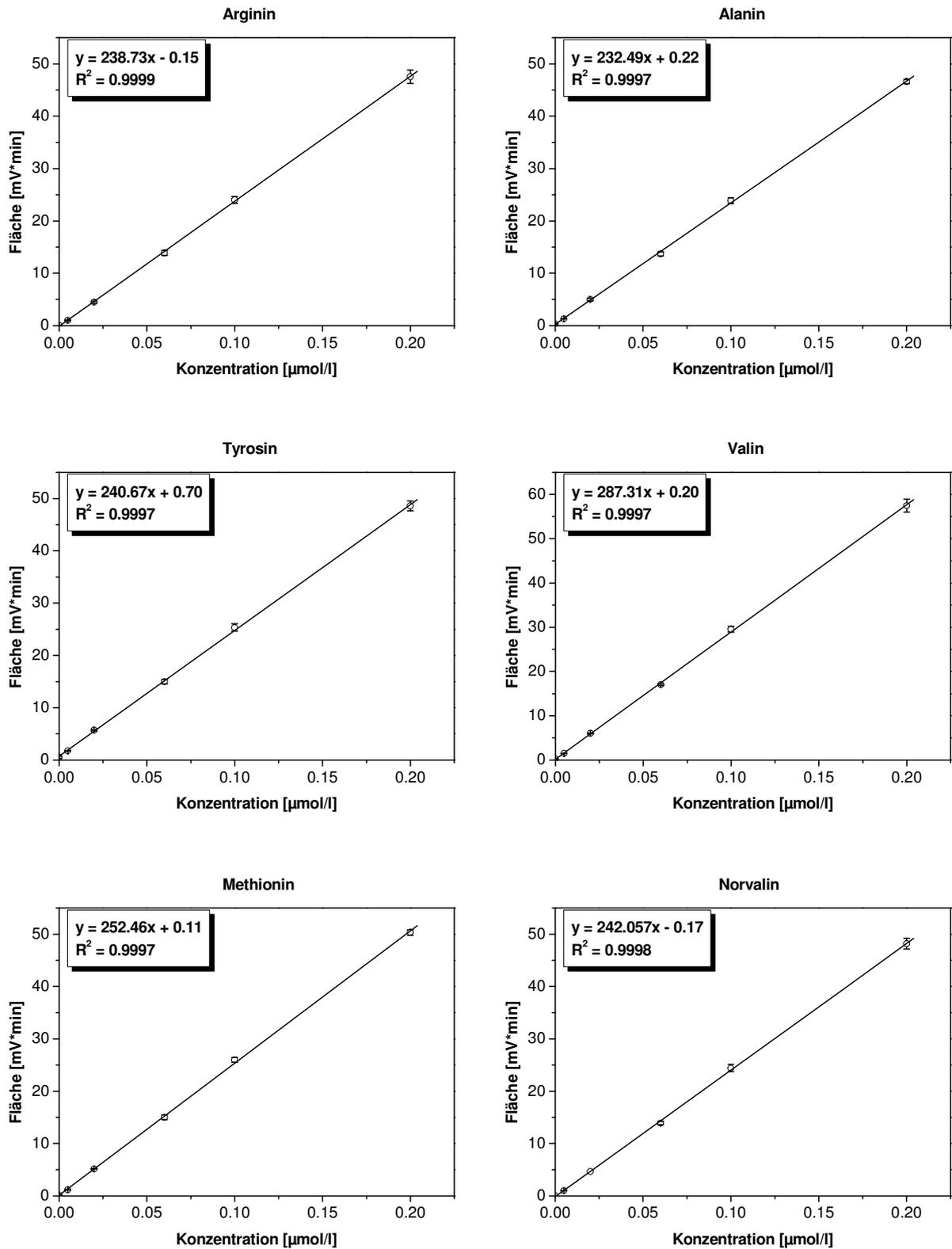


Abbildung 3.18: Kalibrierung von Arginin, Alanin, Tyrosin, Valin, Methionin und Norvalin nach Derivatisierung OPA-VD1 und HPLC-Trennung mit OPA-G1. Weitere Erläuterungen vgl. Abbildung 3.17.

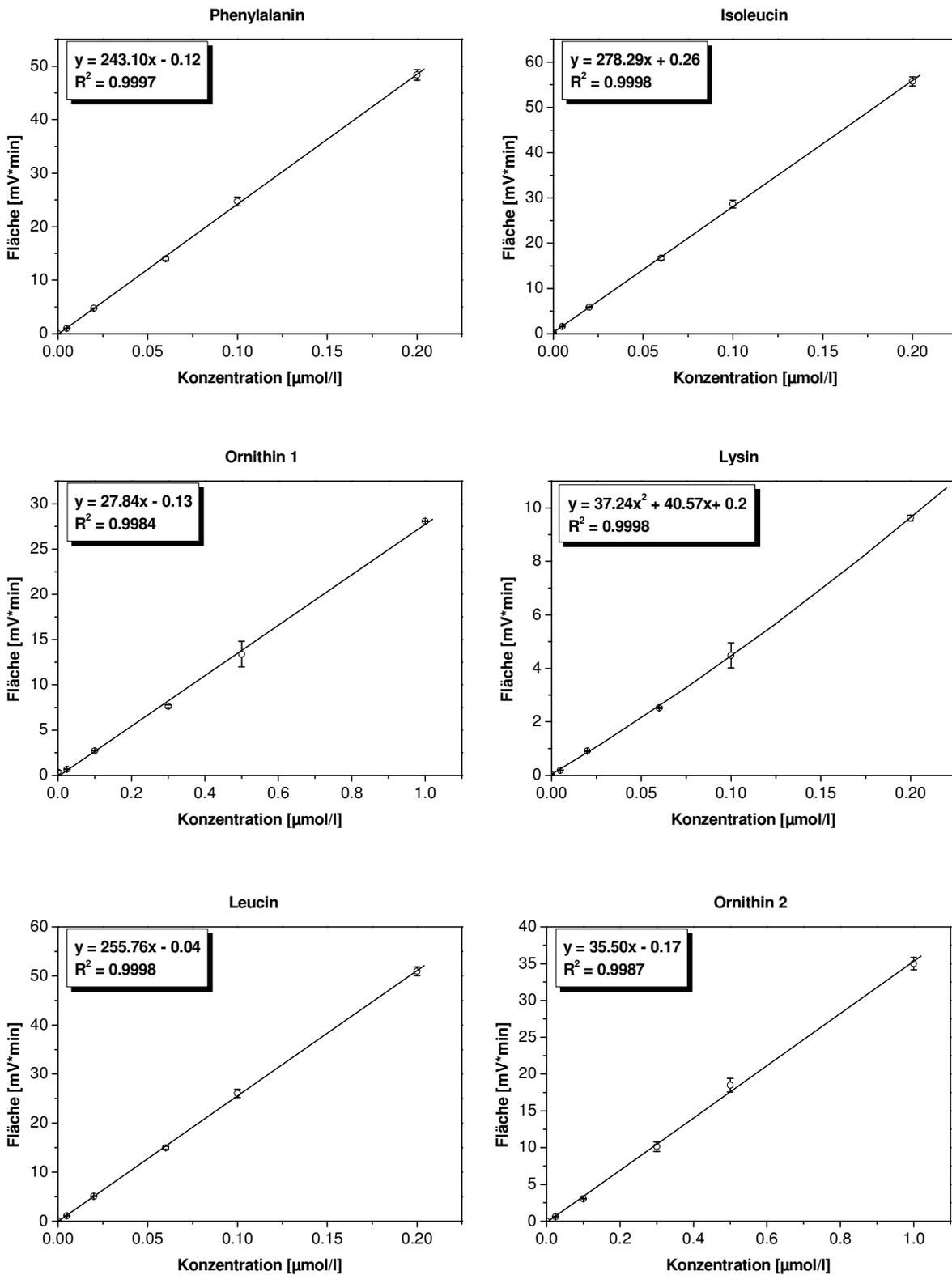


Abbildung 3.19: Kalibrierung von Phenylalanin, Isoleucin, Ornithin 1, Leucin, Lysin und Ornithin 2 nach Derivatisierung OPA-VD1 und HPLC-Trennung mit OPA-G1. Weitere Erläuterungen vgl. Abbildung 3.17.

Eine gute Reproduzierbarkeit der Derivatisierung ist nach *Tabelle 3.6* gewährleistet. Die relativen Standardabweichungen der Peakflächenbestimmung betragen mit Ausnahme der OPA/MPA-Derivate von Serin, Arginin, Lysin, Ornithin 1 und Ornithin 2 in allen untersuchten Konzentrationen 0.0-6.4 %.

Tabelle 3.6: Relative Standardabweichung [%] der Peakflächen von Aminosäurestandardlösungen der in Abbildung 3.17, Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 dargestellten Kalibrierung (Derivatisierung OPA-VD1, Gradient OPA-G1).

AA	Konzentration				
	0.005	0.02	0.06	0.1	0.2
	[µmol/l]				
Asp	5.3	0.7	1.5	1.3	0.5
Glu	4.8	2.8	1.1	1.8	0.9
Ser	12.7	3.1	4.7	2.2	0.7
His	0.4	2.4	1.6	3.7	1.8
Gly	4.6	2.2	2.8	3.9	1.9
Thr	6.4	1.0	2.6	1.2	1.3
Arg	9.3	3.8	3.4	2.7	2.7
Ala	3.3	4.3	2.8	2.4	0.9
Tyr	0.4	2.7	2.7	2.7	2.0
Val	0.8	1.4	1.0	2.2	2.6
Met	5.7	0.3	3.2	1.9	1.1
Nval	3.8	0.0	2.4	2.8	2.1
Phe	1.5	0.5	2.5	3.3	2.0
Ile	4.0	1.5	2.5	3.0	1.7
Orn1 ⁽¹⁾	3.6	0.8	2.0	10.7	0.1
Leu	4.7	0.5	2.2	3.2	1.8
Lys	6.0	1.6	1.0	10.6	1.1
Orn2 ⁽¹⁾	8.1	1.4	6.4	5.1	2.4

(1) - in den Konzentrationen 0.025, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 µmol/l.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode OPA-VD1/OPA-G1 wurden sowohl aus Kalibrierkenndaten als auch aus Messungen von Blindwerten ermittelt. Die höchste Nachweisgrenze beider Verfahren wurde als Quantifizierungskriterium für die Aminosäurebestimmung in den Protein- und Feinstaubproben zugrundegelegt. Die NWG der quadratischen Regressionen sind ausschließlich über die Blindwertmethode bestimmt worden. Die NWG belaufen sich mit Ausnahme von Ornithin auf Werte zwischen 0.9-4.8 nmol/l bzw. 13-71 fmol (*Tabelle 3.7*).

Tabelle 3.7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt aus fünf Blindwerten (Blindwertmethode) und Kalibrierdaten der in Abbildung 3.17, Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 gezeigten Kalibrierung (0.0-0.2 μM , $N = 6$, $N' = 2$) und je zwei Parallelmessungen (Kalibriermethode). Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1. Verdünnungsfaktor (F_{ver}): 1.7, Injektionsvolumen (V_{inj}): 25 μl . Fett gedruckte Werte repräsentieren die höchsten NWG.

AA	Blindwertmethode		Kalibriermethode	
	NWG	BG	NWG	BG
[nmol/l]				
Asp	0.7	2.3	2.4	9.1
Glu	0.8	2.4	1.7	6.6
Ser	2.8	9.0	2.7	10.3
His	1.9	2.8	3.5	13.3
Gly	4.8	12.5	3.5	13.2
Thr	1.1	3.2	2.8	10.8
Arg	1.3	2.3	2.0	7.6
Ala	1.2	3.3	2.7	10.4
Tyr	1.6	7.3	2.8	10.8
Val	1.0	2.8	2.6	10.1
Met	1.3	4.3	2.8	10.7
Nval	_(1)	_(1)	2.4	9.4
Phe	0.7	1.0	3.2	10.9
Ile	0.7	2.4	2.4	9.2
Orn1	39.7	93.1	32.4	120.9
Leu	0.7	1.4	2.6	9.9
Lys	0.9	2.9	_(2)	_(2)
Orn2	_(1)	_(1)	29.4	110.0

(1) - kein Blindwert; (2) - quadratische Regression.

Glycin, Serin, Arginin, Histidin und Lysin und Ornithin, das aufgrund seiner geringeren Response eine Sonderstellung einnimmt, besitzen die höchsten Nachweisgrenzen. Die NWG von Serin und Glycin werden durch die Blindwerte und ihre hohe Streuung beeinflusst. Die Bestimmungsgrenzen liegen um das 2-4fache höher als die Nachweisgrenzen.

3.1.3 HPLC-Methodenvergleich

Die Bestimmung von insgesamt 15 proteinogenen Aminosäuren ist sowohl mit der vorgestellten Methode OPA-VD1/OPA-G1 als auch der Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 möglich. Die OPA-Methode erweist sich jedoch aus folgenden Gesichtspunkten als vorteilhafter. Eine

Auflösung von Glutamat und Threonin wird mit Gradient NBD-F-G4 nicht erreicht, während Gradient OPA-G1 eine nahezu vollständige Basislinientrennung aller OPA/MPA-Derivate erzielt. Die Quantifizierung der sekundären Aminosäure Prolin ist mit der OPA-Methode zwar nicht möglich, allerdings kann mit der NBD-F-Methode Serin durch den coeluiierenden NBD-OH-Peak nicht bestimmt werden. Die Empfindlichkeit beider Methoden liegt im nM- bzw. fmol-Bereich. Dies entspricht den aus der Literatur erwarteten Werte (*Abschnitt 2.2.3.1*). OPA/MPA-Derivate werden aber um das 2-39fache empfindlicher detektiert als die entsprechenden NBD-F-Derivate (*Abbildung 3.20*).

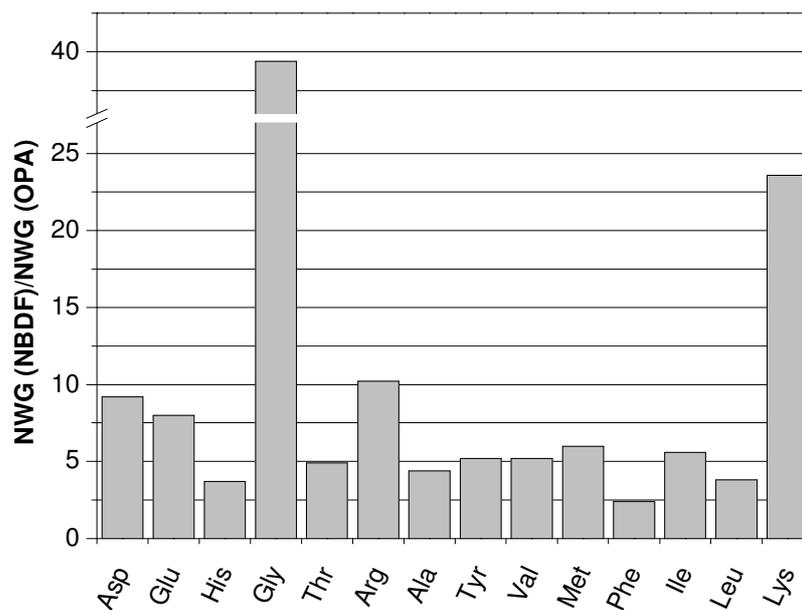


Abbildung 3.20: Verhältnis der Nachweisgrenzen der Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 und OPA-VD1/OPA-G1.

Die OPA/MPA-Derivatisierung ist deutlich robuster als die NBD-F-Methode. Diese Beobachtung ist wohl darauf zurückzuführen, dass die OPA/MPA-Derivatisierung im AS50-Autosampler durchgeführt werden konnte und nicht mit der Hand pipettiert werden musste. Die Proben konnten daher über Nacht automatisch analysiert werden. Dies ermöglichte neben der kürzeren Analysezeit der OPA-HPLC-Methode von 23 min/Probe einen signifikant höheren Probendurchsatz. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten beider Verfahren ist zwar vergleichbar (<1 %), aber auch hier erweist sich die OPA-Methode als etwas präziser. Die Stärke der NBD-F-Methode liegt neben der Möglichkeit der Bestimmung einer hohen Anzahl proteinogener Aminosäuren in der simultanen Detektion von 3-Nitrotyrosin mit hoher Empfindlichkeit.

3.1.4 Mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse

3.1.4.1 Mikrowellensystem

Mars5-Mikrowelle

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten sauren Proteinhydrolysen wurden in dem Mikrowellenaufschlusssystem *Mars5* von CEM vorgenommen. Das System ermöglicht Hochdruckaufschlüsse bis 100 bar und 300°C in bis zu 12 aus Teflon gefertigten Hochdruckbehältern, den *XP1500plus*-Reaktionsgefäßen (*Abbildung 3.21*). Die Temperatur- bzw. Druckkontrolle erfolgt direkt *in situ* im Inneren eines Referenzdruckbehälters mit einem faser-optischen Temperatur- und Drucksensor.



Abbildung 3.21: Mikrowellenaufschlusssystem Mars5 (links) und XP1500plus-Reaktionsgefäße (rechts). Das mittlere Reaktionsgefäß ist der Referenz-Hochdruckbehälter mit angeschlossenem Drucksensor.

Die Analyse von μg -Mengen an Protein erforderte die Anfertigung von speziellen Hydrolyseeinsätzen aus PTFE für die Hochdruckbehälter. Allerdings verhinderte deren Verwendung den Einsatz des Temperatursensors, der bis in das Innere des Referenzdruckbehälters reicht. Die Kontrolle der Hydrolyse erfolgte daher über die Messung des Drucks im Referenzgefäß.

Hydrolyseeinsätze

Im Verlauf der Implementierung der mikrowelleninduzierten Proteinhydrolyse kamen insgesamt zwei Hydrolyseeinsätze zur Anwendung. Hydrolyseeinsatz I war aus zwei Ebenen aufgebaut, während Hydrolyseeinsatz II lediglich aus einer Ebene bestand, die mit jeweils 4 Rollrandgläsern mit 2-ml-Volumen (Hydrolysevials) bestückt wurden. Die Proben wurden

stets in 300-320 μl Hydrolysemedium in den Rollrandgläsern vorgelegt und die Reaktionsgefäße vor dem Einsetzen der bestückten Hydrolyseeinsätze I oder II mit 5 bzw. 10 ml Hydrolysemedium befüllt. Die Proben befanden sich während der Proteinhydrolyse stets in Kontakt mit der Gasphase, da diese durch die Hydrolyseeinsätze nicht verschlossen wurden.



Abbildung 3.22: Hydrolyseeinsatz I (links) und II (rechts) für XP-1500 plus-Reaktionsgefäße des Mars5-Mikrowellenaufschlußsystems.

In den Hydrolysevidials der unteren Ebene von Einsatz I wurde nach Abkühlen der Reaktionsgefäße nach der Hydrolyse stets ein höherer Flüssigkeitsstand beobachtet als in den oberen Proben, die nahezu trocken waren. Möglicherweise unterlagen die Proben der oberen Ebene einer Gasphasenhydrolyse, während die der unteren Ebene in der flüssigen Phase zersetzt wurden. Außerdem konnte eine höhere Belastung der unteren Proben mit Kontaminationen aufgrund des unterschiedlichen Flüssigkeitsstandes nicht ausgeschlossen werden (*Abschnitt 3.1.4.6* und *Abschnitt 3.1.4.7*). Um eine Vergleichbarkeit der Hydrolyse der Proben eines Reaktionsgefäßes zu gewährleisten, wurde Hydrolyseeinsatz II auf Kosten eines höheren Probendurchsatzes im Verlauf der Optimierungen eingesetzt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Hydrolyse mit Einsatz II überwiegend über einen Austausch zwischen Hydrolysemedium und Probe über die Gasphase erfolgte, da die Rollrandgläser nach der Hydrolyse kaum oder keine Flüssigkeit enthielten.

Bestimmung der Hydrolysetemperatur

Um eine Aussage über die vorherrschende Hydrolysetemperatur (T_H) treffen zu können, wurden p-T-Diagramme von 4.7 M HCl und einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA

experimentell bestimmt. Hierfür wurden der Referenzdruckbehälter ohne Hydrolyseeinsatz mit installiertem Druck- und Temperatursensor mit 15 ml des entsprechenden Mediums befüllt und der Hydrolysedruck (p_H) bei verschiedenen Temperaturen unter Gleichgewichtsbedingungen in dem Mars5-System bestimmt (Abbildung 3.23). Unter der Annahme, dass sich bei den mit den Hydrolyseeinsätzen durchgeführten Hydrolysen ein Zwei-Phasen-System aus Flüssig- und Gasphase ausbildet, kann eine dem Hydrolysedruck entsprechende Temperatur T_H dem p-T-Diagramm entnommen werden.

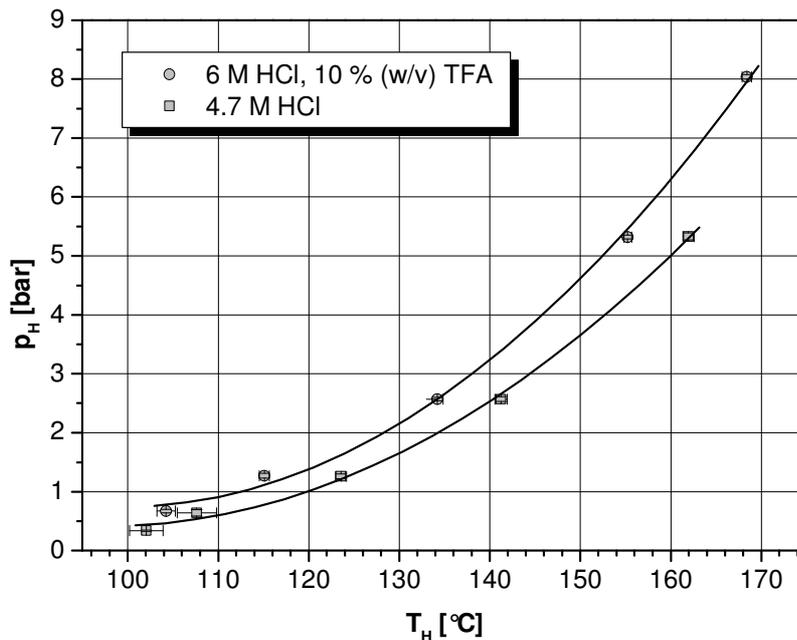


Abbildung 3.23: p-T-Diagramme von 4.7 M HCl (■) und 6 M HCl, 10 % TFA (●).

Erwartungsgemäß besitzt das Hydrolysemedium aus 6 M HCl und 10 % (w/v) TFA einen höheren Dampfdruck als 4.7 M HCl. Dies ist auf den niedrigeren Siedepunkt von TFA im Vergleich zu Salzsäure zurückzuführen. Die Proteinhydrolysen wurden bei 4 bar in 4.7 M HCl und einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol bzw. 5 bar in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol und einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol, 3 mM Ascorbinsäure durchgeführt. Die Hydrolysetemperatur beläuft sich bei diesen Bedingungen unter der Annahme, dass die Präsenz von Phenol, Ascorbinsäure und der Probe keinen signifikanten Einfluss auf den Dampfdruck hat, auf 152° C und 146° C.

3.1.4.2 Standardprotein-Charakterisierung

Zur Optimierung und Kontrolle der Hydrolysen wurde Rinderserumalbumin (BSA) in seiner unnitrierten und nitrierten Form verwendet. Albumin gehört zu der großen Gruppe von Plasmaproteinen. Es macht ungefähr 60 % der gesamten Plasmaproteinmenge aus. Seine

Hauptaufgabe besteht in der Aufrechterhaltung des sogenannten kolloidosmotischen Drucks, der die Flüssigkeitsverteilung in Geweben und Organismen bestimmt. Weiterhin übernimmt Albumin als Protein mit einer hydrophoben Bindungstasche eine wichtige Funktion als Transportprotein in der Verteilung von in Wasser schwerlöslichen Verbindungen wie z.B. Fettsäuren, Bilirubin und Vitaminen.^[324] Die Aminosäurezusammensetzung wurde aus dem Eintrag der NCBI-Proteindatenbank für BSA (*accession number* AAN17824) ermittelt.^[283,325] Da es sich bei den Aminosäuren 1-25 des Eintrags um ein Signalpeptid handelt und nicht zum Protein in seiner reifen Form gehört, wurde es nicht in die Berechnung der theoretischen Aminosäurezusammensetzung einbezogen.^[326] BSA besitzt unter der Annahme der Existenz von 17 Disulfidbindungen ein Molekulargewicht von 66 428.5 Da.^[327] Die Molekularmasse des verwendeten BSA wurde mit einer ESI-TOF-MS-Messung verifiziert (Abbildung 3.24).

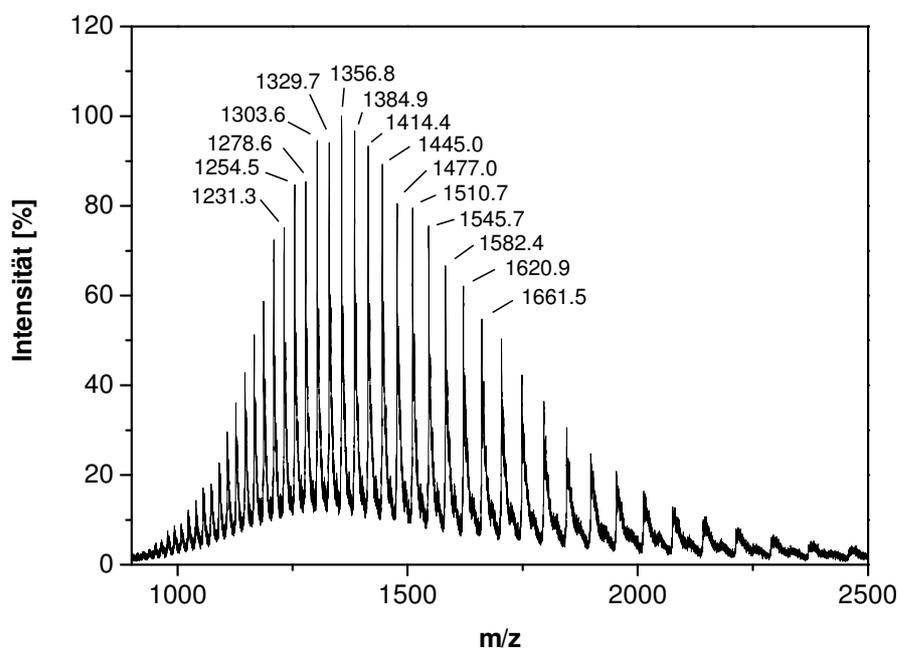


Abbildung 3.24: ESI-Massenspektrum von BSA (0.15 g/l) in 50 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) HOAc. Das Spektrum zeigt die unprozessierten Rohdaten. Massenkalisierung des TOF-MS erfolgte mit Pferdeherz-Myoglobin (0.17 g/l) in 50 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) HOAc ($w_{1/2} = 0.65$ Da, $m/z = 1212$, $N_H = 14$).

Demnach trägt ein BSA-Molekül unter den Meßbedingungen 24-70 Protonen. Das Spektrum wurde mit Hilfe der MaxEnt-Software konvolviert. Die für die Berechnung des MaxEnt-Spektrums benötigte Peakbreite $w_{1/2}$ von BSA wurde über die experimentell bestimmte Peakbreite von Myoglobin (Singulett, $m/z = 1212$, $n_H = 14$) berechnet. Nach Konvolution des ESI-MS-Spektrums ergibt sich eine Masse von 66 432.5 Da (Abbildung 3.25). Dies entspricht nahezu dem Molekulargewicht, das gemäß der Aminosäurezusammensetzung zu erwarten ist, und der Masse von $66\,431.5 \pm 1.3$ Da, die aus einer ESI-MS-Messung von FENG et al.^[328]

hervorgeht. Aus dem MaxEnt-Spektrum wird allerdings deutlich, dass das verwendete BSA heterogen ist.

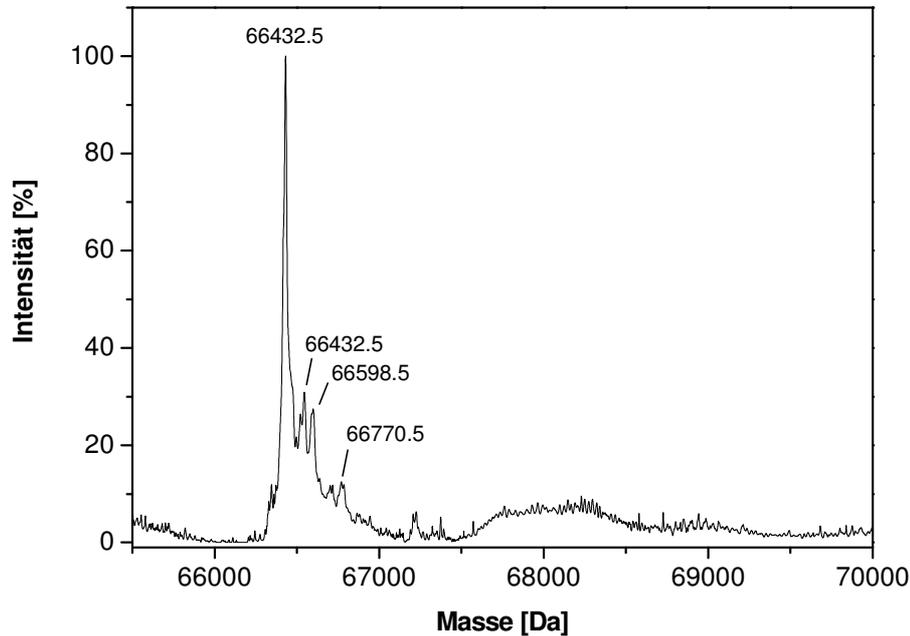


Abbildung 3.25: MS-Spektrum von BSA nach Konvolution des in Abbildung 3.24 gezeigten ESI-MS-Spektrums nach Hintergrundsubtraktion. Die Konvolution erfolgte mit dem Maximum-Entropie-Algorithmus der MaxEnt-Software mit einer berechneten Peakbreite $w_{1/2} = 0.4$ für einen BSA-Peak mit $m/z = 1\ 212$ und $N_H=55$.

In Tabelle 3.8 ist die Aminosäurezusammensetzung von BSA dargestellt, die als Grundlage für die Wiederfindungsbestimmung diente. Die Primärstruktur des Proteins ohne Signalpeptid enthält 583 Aminosäuren. Zu den am häufigsten vorkommenden Aminosäuren mit Stoffmengenanteilen von 10.5 bis 6.0 % zählen Leucin, Glutamat, Lysin, Alanin, Aspartat, Valin und Cystein. 336 der 583 Aminosäuren (57.6 %) in BSA können dieser Gruppe von 7 der 20 proteinogenen Aminosäuren zugeordnet werden. Die Anzahl von Isoleucin, Leucin und Valin beläuft sich auf 111 Aminosäuren (19 %). Dies ist bei der sauren Proteinhydrolyse von besonderer Bedeutung, da diese - sofern sie untereinander in hydrophoben Peptidbindungen gebunden vorliegen - schwer spaltbar sind.

Tabelle 3.8: Aminosäurezusammensetzung von BSA (Aminosäuren 25-607 von AAN17824).^[325]

AA	Anzahl	Anteil [mol%]	Stoffmenge ⁽¹⁾ [nmol]
Ala	46	7.89	69.9
Arg	23	3.95	35.0
Asn	14	2.40	21.2
Asp	40	6.86	60.8
Cys	35	6.00	53.2
Glu	59	10.12	89.7
Gln	20	3.43	30.4
Gly	16	2.74	24.3
His	17	2.92	25.8
Ile	14	2.40	21.3
Leu	61	10.46	92.7
Lys	59	10.12	89.7
Met	4	0.69	6.1
Phe	27	4.63	41.0
Pro	28	4.80	42.6
Ser	28	4.80	42.6
Thr	34	5.83	51.7
Trp	2	0.34	3.0
Tyr	20	3.43	30.4
Val	36	6.18	54.7

(1) - in 103 µg BSA.

Als Nitroproteinstandard wurde Nitro-(7.4)-BSA, dessen Synthese in *Abschnitt 5.9.1.1* beschrieben ist, eingesetzt. Der Nitrotyrosingehalt wurde auf 7.4 Moleküle pro BSA-Molekül mit der spektrophotometrischen Methode bestimmt (*Abschnitt 3.3.2*). Das Molekulargewicht von Nitro-(7.4)-BSA beträgt dementsprechend 66 761.5 Da ($7.4 \times 45 \text{ Da} = 333 \text{ Da}$, $m(\text{NO}_2\text{-H}) = 45 \text{ Da}$).

3.1.4.3 Berechnung der Proteinwiederfindungen

Als Referenzmethoden, die als Grundlage zur Berechnung der Wiederfindungen von BSA und Nitro-(7.4)-BSA dienten, wurden die gravimetrische Bestimmung von BSA bzw. die Bestimmung von Nitro-(7.4)-BSA im BCA-Assay als BSA-Äquivalent herangezogen. Die Molekulargewichte wurden für BSA und Nitro-(7.4)-BSA auf 66 500 bzw. 66 830 Da

festgelegt. Die Berechnung der BSA- bzw. Nitro-(7.4)-BSA-Wiederfindungen erfolgte über die Bestimmung der Aminosäurewiederfindungen mittels Aminosäureanalytik. Um systematische Fehler der Proteinhydrolyse weitestgehend zu eliminieren, wurde der 25 %-getrimmte Mittelwert ($M_{t,25}$) der Aminosäurewiederfindungen als entsprechender Wert der Proteinwiederfindung gewertet. Aufgrund der unterschiedlichen Freisetzungs- und Zersetzungskonstanten der proteinogenen Aminosäuren entspricht die Verteilung der Aminosäurewiederfindungen *a priori* keiner Normalverteilung. Das arithmetische Mittel der Gesamtpopulation kann daher deutlich von dem wahren Wert der Proteinwiederfindung abweichen. Die Berechnung von $M_{t,25}$ erfolgte nach WILCOX.^[329] Die Einzelwiederfindungen wurden nach auf- bzw. absteigender Größe sortiert und je 25 % der Aminosäuren mit der größten und der niedrigsten Wiederfindung eliminiert. Das arithmetische Mittel der verbleibenden Werte wird das 25 %-getrimmte Mittel ($M_{t,25}$) genannt und repräsentiert die Proteinwiederfindung. Der Fehler $s_{t,25}$ des getrimmten Mittelwertes $M_{t,25}$ ergibt sich aus der winsorisierten Probenvarianz s_w^2 nach der in Gleichung 3.1 dargestellten Formel. Die bei der Bestimmung des 25 %-getrimmten Mittelwertes eliminierten Wiederfindungen werden durch die noch verbleibende höchste und niedrigste Wiederfindung ersetzt. Die Größe der Stichprobe bleibt somit erhalten. Die Varianz dieser Werte stellt die winsorisierte Probenvarianz s_w^2 dar.

$$s_{t,25} = \sqrt{\frac{s_w^2}{n \cdot (1 - 2 \cdot 0.25)^2}}$$

Gleichung 3.1: Fehler $s_{t,25}$ des 25 %-getrimmten Mittelwertes $M_{t,25}$. s_w^2 = winsorisierte Varianz, n = Anzahl der bestimmten Aminosäuren.

Die Berechnung der Proteinwiederfindungen der Nitro-(7.4)-BSA-Proben, die mit der NBD-F-Methode bestimmt wurden, erfolgte durch Bildung des getrimmten Mittelwertes aus 13 proteinogenen Aminosäuren (Arginin, Aspartat/Asparagin, Glycin, Glutamat/Glutamin/Threonin, Alanin, Prolin, Valin, Lysin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, 3-Nitrotyrosin und Tyrosin), die der BSA-Proben, die mit der OPA-Methode bestimmt wurden, aus 14 proteinogenen Aminosäuren (Aspartat/Asparagin, Glutamat/Glutamin, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Arginin, Alanin, Tyrosin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Lysin) ermittelt. Die aufgeführten 25 %-getrimmten Mittelwerte basieren somit auf 7 bzw. 8 Aminosäurewiederfindungen, da stets sechs Werte ($2 \times 25\%$) bei der Mittelwertbildung entfernt wurden.

3.1.4.4 Hydrolyseoptimierung und -methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich saure Proteinhydrolysen durchgeführt, deren Parameter wie Hydrolysemedium, Hydrolysedruck p_H und Hydrolysetemperatur T_H in *Tabelle 3.9* als Hydrolysemethoden (HM) zusammengefasst sind.

Tabelle 3.9: Bedingungen der durchgeführten mikrowelleninduzierten Proteinhydrolyse.

Hydrolyse- methode (HM)	Hydrolysemedium	p_H [bar]	T_H [° C]	t_H [min]	Hydrolyse- einsatz
1, 2, 3, 4	4.7 M HCl	4	152	35, 45, 60, 180	I
5	6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol	4	146	30	I
6	6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol	5	152	30	I, II
7, 8, 9	6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 1 %(w/v) Phenol, 3 mM Ascorbinsäure	5	152	30, 45, 60	II

Das *Mars5*-Mikrowellensystem wurde im druckkontrollierten Modus gefahren. Die Methoden HM1-HM6 sind als Zwischenschritte der Hydrolyseoptimierung anzusehen, während HM7, HM8 und HM9 optimierte und gut charakterisierte Hydrolyseparameter beschreiben. Die Proteinhydrolyse wurde hinsichtlich Proteinverlusten (Hydrolysestandard) und der Aminosäure- und Proteinwiederfindungen der Standardproteine (*Abschnitt 3.1.4.6*, *Abschnitt 3.1.4.7* und *Abschnitt 3.1.4.8*) und atmosphärischer Feinstaubmatrix (*Abschnitt 3.2.4.3*) charakterisiert.

3.1.4.5 Empfindlichkeit der Proteinhydrolyse

Die Empfindlichkeit der Proteinbestimmung wird durch den Aminosäurehintergrund dominiert. In acht untersuchten Blindlösungen der Proteinhydrolysen nach Methode HM1 und HM2 wurden Glycin, Phenylalanin und Prolin in Stoffmengen von 0.1-0.2 nmol gefunden, während Alanin, Methionin und Valin um den Faktor 10 weniger vorhanden waren. Die Aminosäurezusammensetzung einer Hydrolyseblindlösung ist in *Tabelle 3.10* gezeigt.

Tabelle 3.10: Aminosäurezusammensetzung einer Hydrolyseblindlösung (HM2). Cystein wurde aus der Wiederfindung von Cystin durch Multiplikation mit Faktor 2 bestimmt. Die HPLC-Analyse erfolgte mit Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

AA		Gly	Ala	Pro	Met	Val	Cys	Lys
Stoffmenge	[nmol]	0.20	0.04	0.19	0.02	0.02	1.3	0.03
Stoffmengenanteil⁽¹⁾	[mol%]	12.0	2.0	10.4	1.0	1.2	71.9	1.4

(1) - Summe der Stoffmengenanteile summieren sich aufgrund der Rundung zu 99.9 %.

In diesem Fall war Cystin die vor Glycin und Prolin am häufigsten vorkommende Aminosäure. Möglicherweise handelt es sich hier um menschliches Haar als eingetragene Kontamination. Beispielsweise enthalten Proteine der keratinassoziierten Proteine (KAP) einen hohen Gehalt dieser Aminosäuren. Sie werden gemäß ihrer Aminosäurezusammensetzung in KAPs mit sehr hohem (>30 mol%), hohem (<30 mol%) Cystein- und hohem Glycin/Tyrosingehalt eingeteilt.^[330] Serin und Prolin sind mit einem Stoffmengenanteil von 5-10 mol% vertreten. *GOLAZ et al.*^[205] identifizierten ebenfalls menschliches Keratin als Hauptquelle von Kontaminationen bei der Aminosäureanalyse. Die 10 untersuchten Hydrolyseblindlösungen der Methoden HM6-HM9 enthielten Glycin, Glutamat/Glutamin, Aspartat/Asparagin und Serin bis 0.2 nmol als häufigste Aminosäuren (Abbildung 3.26).

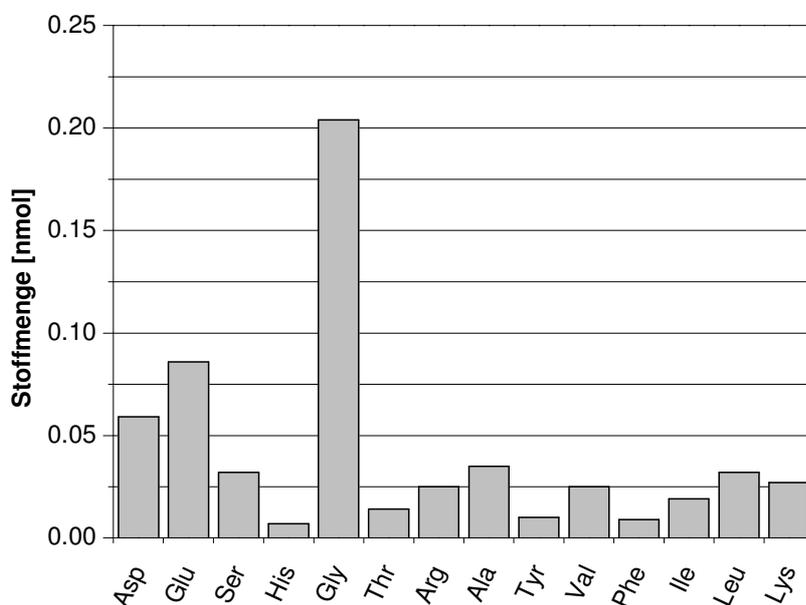


Abbildung 3.26: Typische Aminosäurezusammensetzung einer Hydrolyseblindlösung nach Hydrolyse HM6-HM9. Die gefundenen Stoffmengen wurden mit dem zugesetzten Hydrolysestandard korrigiert. Die HPLC-Analyse der dargestellten Blindlösung erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Der Gehalt anderer proteinogener Aminosäuren lag deutlich unter 0.1 nmol. In 3 der 10 Blindhydrolysate wurden jedoch erhöhte Mengen an Aminosäuren vorgefunden. Der Glycingehalt erreichte max. 0.7 nmol, der der anderen Aminosäuren 0.1-0.3 nmol. Als Hydrolysekontrolle wurden 103 µg BSA eingesetzt. Der Fehler in der Bestimmung von Glycin in den BSA-Proben (103 µg, 24.3 nmol Glycin) beläuft sich bei einem Blindwert von 0.2 nmol auf 0.8 %. Der Fehler des Gehaltes der anderen Aminosäuren ist deutlich geringer, da diese in BSA häufiger vorkommen und/oder ihr Blindwert geringer ist. Die Proteinwiederfindungen sind mit Ausnahme der BSA-Wiederfindungen der Standardadditionsexperimente **A**, **B** und **C** nicht mit den Blindwerten korrigiert worden. Um die Nachweisstärke der Proteinhydrolyse und den Fehler in der Proteinquantifizierung aufgrund des Aminosäurehintergrundes abzuschätzen, wurde der Aminosäuregehalt der Blindhydrolysate in BSA-Äquivalentmassen umgerechnet. Sie streuen um eine Größenordnung von 0.06-0.81 µg (*Abbildung 3.27*).

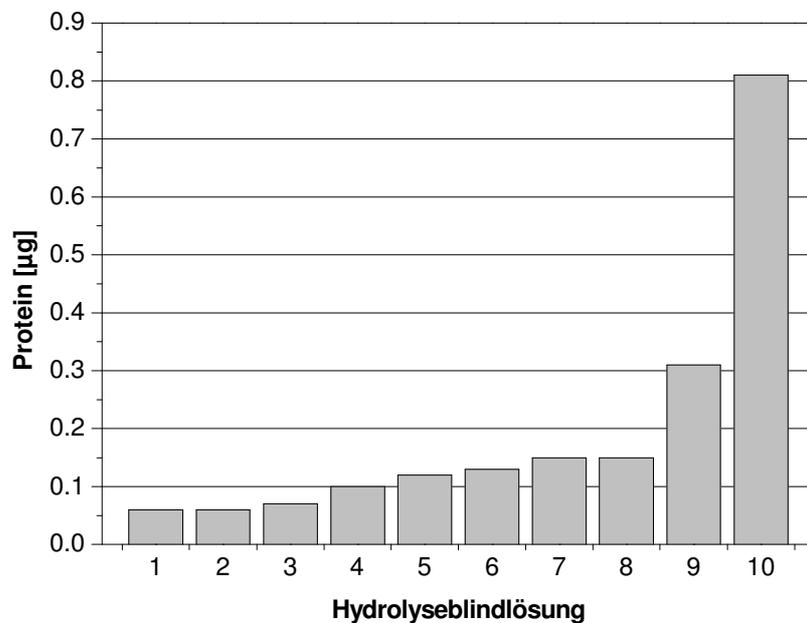


Abbildung 3.27: Proteinäquivalent des Aminosäuregehaltes von 10 Hydrolyseblindlösungen nach Proteinhydrolyse (HM6-HM9). Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1. NWG = 1.3 µg/ml, BG = 3.0 µg/ml (Blindwertmethode, N = 9). Wert der Hydrolyseblindlösung 10 ist nach Grubbs-Ausreißertest als Ausreißer anzusehen (P = 99 %).^[331]

Im Mittel ist mit einem Proteinäquivalent (Hydrolyseblindlösung 1-9) von 0.13 µg zu rechnen. Die NWG und BG belaufen sich nach der Blindwertmethode auf 0.4 µg und 0.9 µg (in 300 µl Hydrolysemedium) bzw. 1.3 µg/ml und 3.0 µg/ml. Eine Messung und Berücksichtigung des Aminosäuregehaltes von Blindhydrolysaten bei der Analyse von Proteinmengen im unteren µg-Bereich ist jedoch unerlässlich. Im Rahmen des Standardadditionsexperimentes **A** wurde anhand der BSA-Wiederfindungen experimentell gezeigt, dass die Analyse von 1 µg Protein

in reiner Lösung nach Subtraktion des Aminosäuregehaltes des Blindhydrolysates mit der entwickelten Methode möglich ist (*Abschnitt 3.2.4.3*).

3.1.4.6 Hydrolysen in 4.7 M HCl

Es wurden 4 BSA- und 12 Nitro-(7.4)-BSA-Proben in 4 Hydrolysen in 4.7 M HCl bei 4 bar zersetzt (*Tabelle 3.11*). Die HPLC-Analyse der Hydrolysate erfolgte nach NBD-F-Derivatisierung. Es wurde die Hydrolysedauer als auch der Zeitpunkt der Probenvorbereitung, zu dem der interne Standard Norleucin zugegeben wurde, variiert. α -Methyltyrosin diente in allen Analysen als Derivatisierungsstandard, wurde also unmittelbar vor der Vorsäulenderivatisierung bei Verdünnung der Probe addiert. Damit sollte eine von der Hydrolyse unabhängige Kontrolle der Derivatisierung gewährleistet werden.

Tabelle 3.11: Proteinhydrolysen von BSA- und Nitro-(7.4)-BSA in 4.7 M HCl bei 4 bar (152 °C). Es wurden vier Proteinproben pro Hydrolyse analysiert und die Aminosäurewiederfindung einer Probe durch eine HPLC-Einzelbestimmung ermittelt. Die HPLC-Analyse erfolgte mit Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

HM	N ⁽¹⁾	Protein	Menge	t _H	ISTD	
					Zugabe vor Hydrolyse	Zugabe vor Derivatisierung
			[μ g]	[min]		
1	1	BSA	401	35	-	Nleu/Mtyr
2	1	Nitro-(7.4)-BSA	391	45	-	Nleu/Mtyr
3	1	Nitro-(7.4)-BSA	152	60	Nleu	Mtyr
4	1	Nitro-(7.4)-BSA	391	180	Nleu	Mtyr

(1) - Anzahl der durchgeführten Hydrolysen.

HPLC-Trennung

In *Abbildung 3.28* ist eine chromatographische Aminosäuretrennung von Nitro-(7.4)-BSA nach Hydrolyse in 4.7 M HCl (HM3) dargestellt.

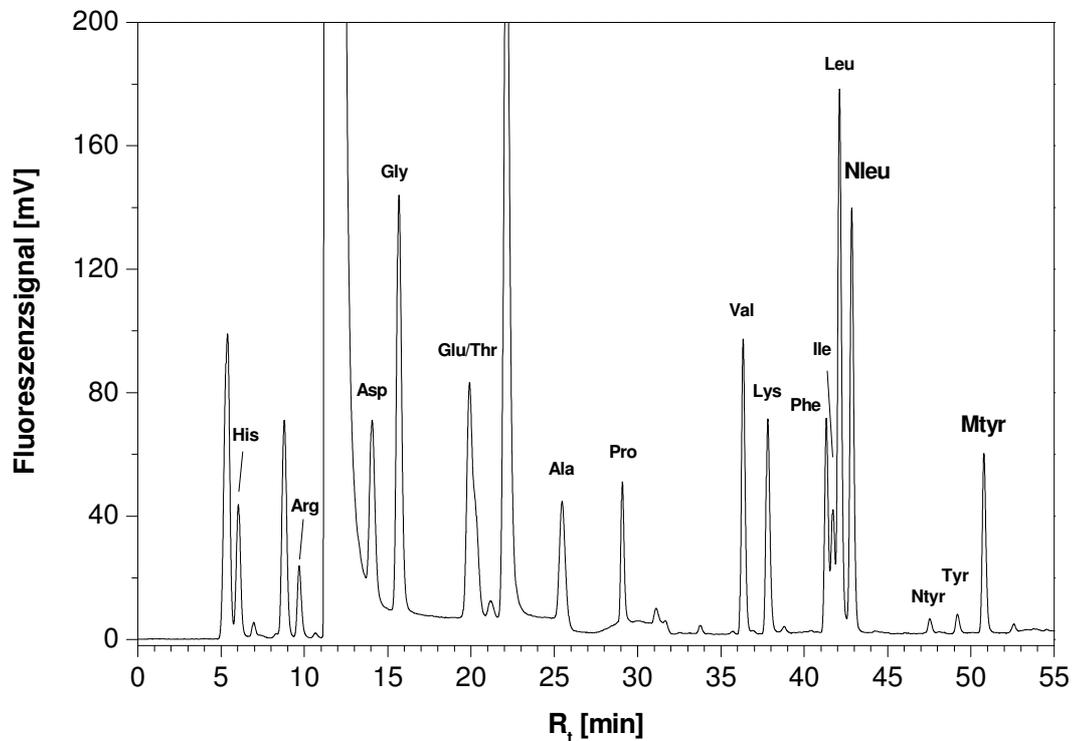


Abbildung 3.28: HPLC-FD-Chromatogramm eines Nitro-(7.4)-BSA-Hydrolysates (152 µg) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 60 min, 4 bar (HM3) mit Norleucin (100.2 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:250, Addition von 1 nmol α -Methyltyrosin und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

Mit dieser chromatographischen Methode ist es möglich 14 der 15 mit HPLC-Gradient NBD-F-G4 getrennten proteinogenen Aminosäuren und 3-Nitrotyrosin in Proteinhydrolysaten mit Norleucin als Hydrolysestandard zu bestimmen. Die Histidinwiederfindungen in den untersuchten Proteinhydrolysaten nach Hydrolyse HM1-HM4 waren aufgrund einer mit Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 nicht aufgelösten Coelution einer Störkomponente stets zu hoch. Histidin konnte somit in Proteinhydrolysaten mit dieser Methode nicht ermittelt werden. Eine Coelution von Störkomponenten wie z. B. partiell hydrolysierte Oligopeptide aus BSA und Nitro-(7.4)-BSA mit Norleucin und α -Methyltyrosin wurde nicht beobachtet und wird durch die übereinstimmende Wiederfindung beider interner Standards, die vor der Derivatisierung in das Hydrolysat gegeben wurden, bestätigt (*Tabelle 3.12*).

Tabelle 3.12: Wiederfindungen von Norleucin (0.5 nmol) und α -Methyltyrosin (1 nmol) nach Standardaddition zu BSA- und Nitro-(7.4)-BSA-Hydrolysaten nach Hydrolyse unmittelbar vor Derivatisierung NBD-F-VD2 und HPLC-Trennung mit Gradient NBD-F-G4. Angegeben ist der Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindungen in vier Proteinproben.

HM	Wiederfindung	
	Norleucin	α -Methyltyrosin
	[%]	
1	98.9 \pm 2.8	94.1 \pm 3.0
2	96.2 \pm 1.2	97.4 \pm 1.8

Protein- und Aminosäurewiederfindungen

In Tabelle 3.13 sind Proteinwiederfindungen der Hydrolysen aufgelistet. Die mittels externer Kalibrierung quantifizierten Wiederfindungen belaufen sich auf 62.1 und 80.1-83.4 %. Diese Werte sind bzgl. Protein- bzw. Aminosäureverlusten, die während der Probenvorbereitung und der Hydrolyse auftreten, nicht korrigiert. Die Reproduzierbarkeit der Hydrolysen in einem Reaktionsgefäß ist gemessen an der Standardabweichung der entsprechenden Wiederfindung mit 7.4-21.4 % sehr unpräzise. Die Proteinwiederfindungen und die Präzision verbessern sich aber bei Korrektur der Probenverluste mit Hilfe des Hydrolysestandards auf 100 % und 5 %.

Tabelle 3.13: Proteinwiederfindungen nach Hydrolyse in 4.7 M HCl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Wiederfindungen ($M_{t,25}$) von je drei bzw. vier BSA- und Nitro-(7.4)-BSA-Proben einer Hydrolyse. Die Quantifizierung erfolgte mit externer Kalibrierung bzw. nach Korrektur des Probenverlustes mittels der Wiederfindung des Hydrolysestandards Norleucin.

HM	Protein	t_H [min]	Wiederfindung	
			Kalibrierung (ext) [%]	Kalibrierung (int) [%]
1	BSA	35	83.4 \pm 7.4	-
2	Nitro-(7.4)-BSA	45	80.1 \pm 21.4	-
3	Nitro-(7.4)-BSA	60	81.9 \pm 14.4	94.8 \pm 5.4
4	Nitro-(7.4)-BSA	180	62.1 \pm 19.2 ⁽¹⁾	105.1 \pm 5.0 ⁽¹⁾

(1) - Mittelwert aus drei Proben

Die Wiederfindungen von 8 Nitro-(7.4)-BSA-Proben und Norleucin der Hydrolyse HM3 und HM4 sind in Abbildung 3.29 und Abbildung 3.30 dargestellt. Die Wiederfindung von Norleucin streut zwischen 37-105 % mit einer Standardabweichung von 16 und 28 %.

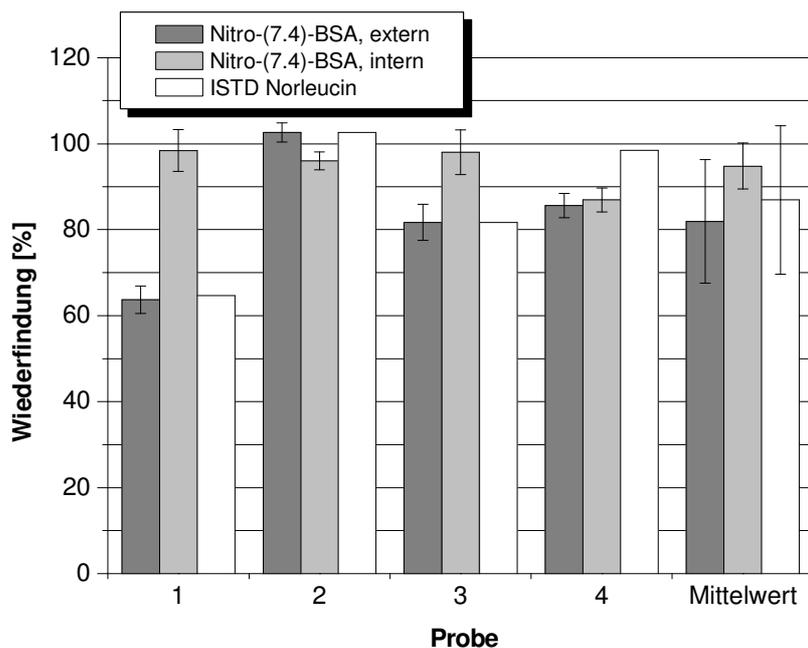


Abbildung 3.29: Wiederfindungen von 4 Nitro-(7.4)-BSA-Proben (152 µg) und Norleucin (100 nmol) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 60 min, 4 bar (HM3). Angegeben sind 25 %-getrimmte Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen, die mit externer und interner Kalibrierung bestimmt wurden.

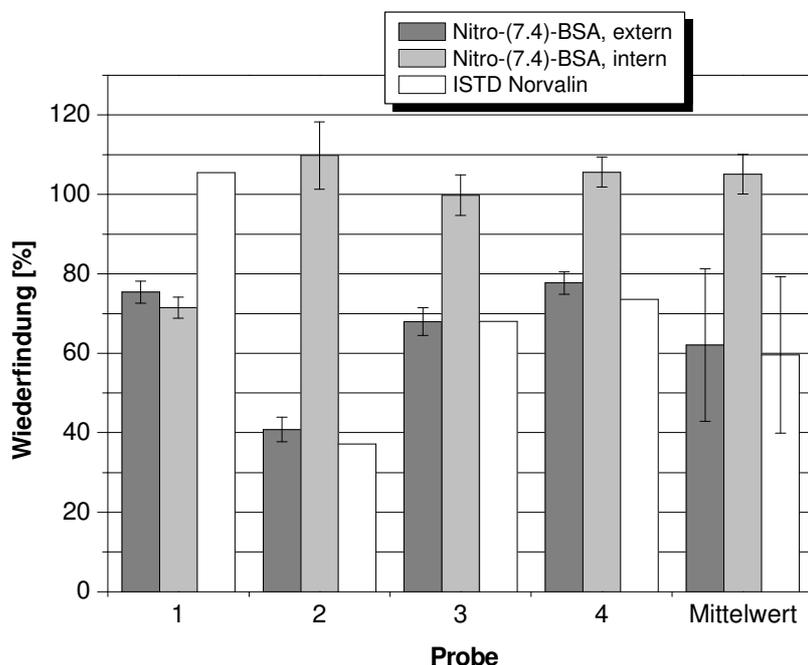


Abbildung 3.30: Wiederfindungen von 4 Nitro-(7.4)-BSA-Proben (391 µg) und Norleucin (184 nmol) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 180 min, 4 bar (HM4). Angegeben sind 25 %-getrimmte Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen, die mit externer und interner Kalibrierung bestimmt wurden.

Die Ursache für diese Beobachtung ist im ungünstigsten Fall ein Siedeverzug, der zu einem Probenverlust durch Verspritzen der Hydrolysemischung führt. Die Derivatisierung als Ursache für die hohe Streuung konnte durch die Verwendung von α -Methyltyrosin ausgeschlossen werden. Die Präzision der Derivatisierung der Proteinhydrolysate liegt bei 2-4 %. In *Abbildung 3.31* und *Abbildung 3.32* sind korrigierte Aminosäurewiederfindungen der Hydrolysen HM1-HM4 dargestellt. Da bei Durchführung der Hydrolysen HM1 und HM2 kein Hydrolysestandard eingesetzt wurde, beziehen sich die dargestellten Wiederfindungen auf die Wiederfindung von freigesetztem Alanin aus BSA, um die Ergebnisse dennoch untereinander vergleichen zu können. Methionin und Cystin lagen in den Proteinhydrolysaten stets nahe bzw. unter der NWG vor oder ihre Wiederfindungen streuten von Probe zu Probe in erheblichem Ausmaß. Die relativen Wiederfindungen von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin liegen bei 73.2-82.1 %.

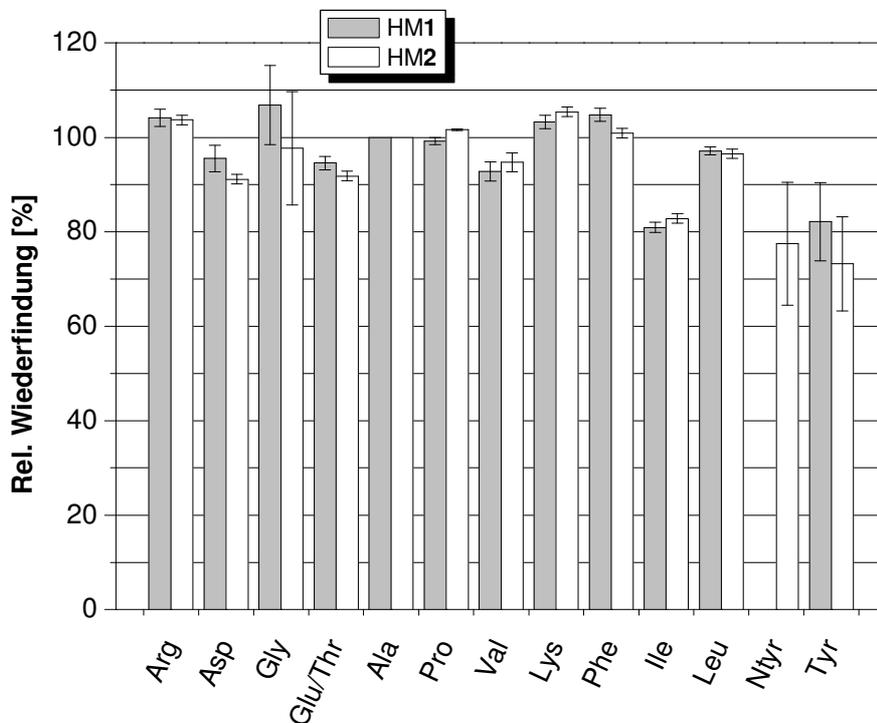


Abbildung 3.31: Zu Alanin relative Aminosäurewiederfindungen von 401 μg BSA (HM1) und 391 μg Nitro-(7.4)-BSA (HM2) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 35 (HM1) und 45 min (HM2), 4 bar. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Wiederfindungen von vier Proteinproben, die mit je einer HPLC-Einzelbestimmung analysiert wurden.

Bei t_{H} -Erhöhung von 60 (HM3) auf 180 min (HM4) werden offensichtlich weitere Aminosäuren freigesetzt (*Abbildung 3.32*). Glycin, Prolin, Alanin und Arginin werden allerdings deutlich überbestimmt. Die Ursache hierfür ist unklar, da in diesem Fall keine Blindhydrolysen durchgeführt wurden. Die Wiederfindungen von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin unter diesen Bedingungen liegen bei 50 bzw. 32 % ($t_{\text{H}} = 60$ min) und 17 bzw. 15 % ($t_{\text{H}} = 180$ min).

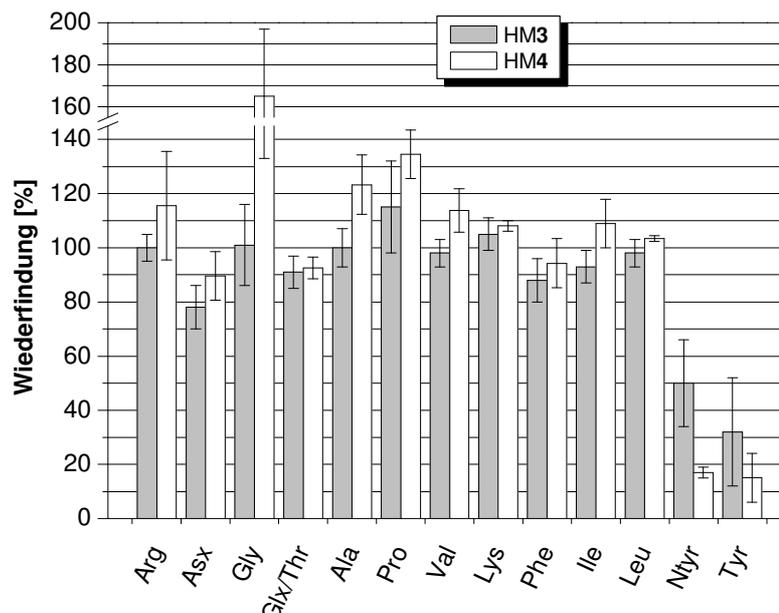


Abbildung 3.32: Aminosäurewiederfindungen von 152 (HM3) und 391 μg Nitro-(7.4)-BSA (HM4) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 60 (HM3) und 180 min (HM4), 4 bar nach Korrektur des Probenverlustes mittels der Wiederfindung des Hydrolysestandards Norleucin. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Wiederfindungen von drei bzw. vier Proteinproben, die mit je einer HPLC-Einzelbestimmung analysiert wurden.

Die relativen Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen der Hydrolyse HM3 nach externer und interner Kalibrierung sind in *Abbildung 3.33* dargestellt.

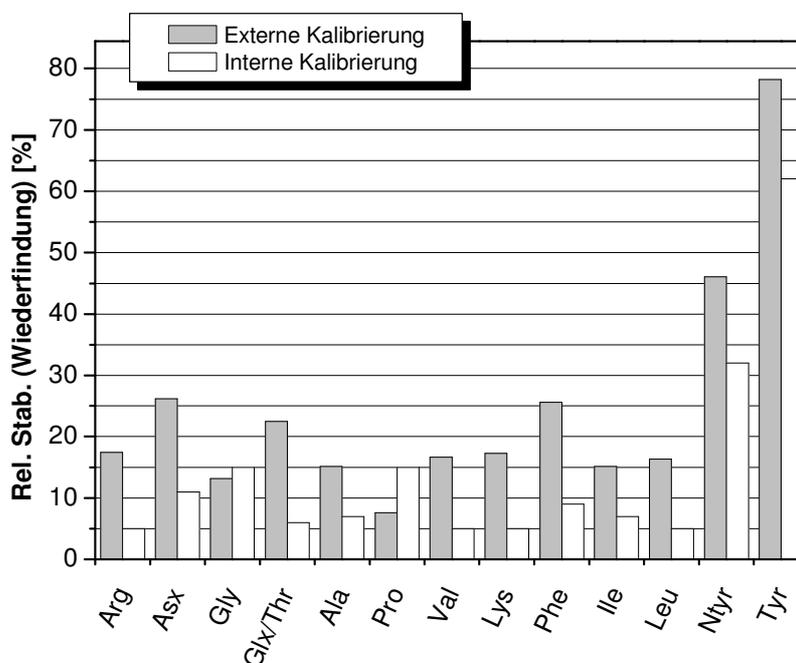


Abbildung 3.33: Relative Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen von 152 μg Nitro-(7.4)-BSA nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 60 min, 4 bar (HM3) nach externer Kalibrierung und Korrektur des Probenverlustes. Die relative Standardabweichung wurde aus den Aminosäurewiederfindungen von vier Proteinproben, die mit je einer HPLC-Einzelbestimmung analysiert wurden, bestimmt.

Mit Ausnahme von Glycin, Prolin, 3-Nitrotyrosin und Tyrosin erhöht sich die Präzision der Hydrolyse nach Korrektur des Probenverlustes um einen Faktor 2-3 auf Werte unter 12 %. Die Bestimmung von Glycin und Prolin wird unpräziser. Vermutlich führt der kontaminierende Eintrag von Glycin zu dieser Beobachtung (*Abschnitt 3.1.4.7*). Im Falle von Prolin kann angenommen werden, dass Norleucin als primäre Aminosäure einen schlechten internen Standard für die sekundäre Aminosäure darstellt.

3-Nitrotyrosin- und Norleucinwiederfindung

Um Informationen über die Säurestabilität und Adsorptionseffekte von Norleucin zu gewinnen, wurden jeweils 100 bzw. 210 nmol des internen Standards nach HM3 und HM4 hydrolysiert (*Tabelle 3.14*).

Tabelle 3.14: Wiederfindungen von 100 (HM3) und 210 nmol (HM4) Norleucin in je zwei Hydrolyseviolen der unteren bzw. oberen Ebene des Hydrolyseeinsatzes I nach Proteinhydrolyse in 4.7 M HCl.

HM	t _H [min]	Wiederfindung Norleucin			
		untere Ebene		obere Ebene	
		[%]			
3	60	65.7	55.8	11.7	23.1
4	180	5.5	9.6	0.6	0.7

Die Wiederfindungen in den Hydrolyseviolen der unteren Ebene des Hydrolyseeinsatzes I nach t_H = 60 min sind vergleichbar mit denen der Wiederfindungen von Norleucin in den Proteinhydrolysaten (*Abbildung 3.29* und *Abbildung 3.30*). Die Wiederfindungen der oberen Ebene sind in beiden Fällen geringer. Ein Fehler in der Derivatisierung und der anschließenden HPLC-Analyse kann auch hier durch die hohe Wiederfindung von α -Methyltyrosin ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung wurde im Falle der Wiederfindungen des Hydrolysestandards in den Proteinproben nicht gemacht. Eine Stoffmenge von 75.4 nmol 3-Nitrotyrosin wurde ebenfalls nach HM4 hydrolysiert. Die Wiederfindungen liegen nahe bzw. unter der Nachweisgrenze von 0.5 % und können auf die Hydrolyseinstabilität von 3-Nitrotyrosin im gewählten Hydrolysemedium und den verwendeten Borosilikatgläsern zurückgeführt werden.^[293]

3.1.4.7 Hydrolysen in 6 M HCl, 10 % TFA, 0.1 % Phenol

Es wurden 14 BSA- und 8 Nitro-(7.4)-BSA-Proben in 7 Hydrolysen in einer Lösung von 6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol zersetzt (Tabelle 3.15). Die HPLC-Analyse der Hydrolysate erfolgte sowohl nach NBD-F- und OPA/MPA-Derivatisierung. Der Hydrolysedruck p_H wurde variiert und Hydrolyseeinsatz I und II verwendet.

Tabelle 3.15: Proteinhydrolysen von BSA und Nitro-(7.4)-BSA in 6 M HCl, 10%(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol bei 4 und 5 bar (146 °C, HM5 bzw. 152 °C, HM6). Es wurden vier Proteinproben pro Hydrolyse analysiert und die Aminosäurewiederfindung einer Probe durch eine HPLC-Einzelbestimmung ermittelt. Die HPLC-Analyse erfolgte mit Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 oder OPA-VD1/OPA-G1. Die Proteinwiederfindungen einer Hydrolyse werden durch das identische Symbol in Abbildung 3.36 repräsentiert.

HM	N ⁽⁴⁾	Protein	Menge [µg]	t _H [min]	p _H [bar]	Methode	Hydrolyse- einsatz	Symbol
5	1	Nitro-(7.4)- BSA ⁽¹⁾	142	30	4	NBD-F	I	-
6	2	Nitro-(7.4)- BSA ⁽²⁾	99	30	5	NBD-F/OPA	I/II	■/●
6	4	BSA ⁽³⁾	103	30	5	OPA	II	▲, ◆, ○, ●

Vorlage der Probe im Hydrolysevial vor der Hydrolyse in (1) - 100 µl Wasser, (2) - 300 µl 4 M HCl, 7 %(w/v) TFA, 0.07 %(w/v) Phenol, (3) - 300 µl 6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol; (4) - Anzahl der durchgeführten Hydrolysen.

HPLC-Trennung

In *Abbildung 3.34* ist eine chromatographische Aminosäuretrennung von Nitro-(7.4)-BSA nach Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol (HM6) und NBD-F-Derivatisierung dargestellt. In diesen Proteinhydrolysaten tritt im Gegensatz zu denen in 4.7 M HCl keine Coelution einer Störkomponente mit Histidin auf, die Histidinwiederfindungen belaufen sich auf die erwarteten Werte. Methionin und Cystin werden unter diesen Bedingungen stabilisiert (hohe Wiederfindungen), eine gute Reproduzierbarkeit von Probe zu Probe ist aber dennoch nicht gegeben. Ein exemplarisches HPLC-FD-Chromatogramm eines BSA-Hydrolysates nach Hydrolyse HM6 und OPA/MPA-Derivatisierung ist in *Abbildung 3.35* dargestellt. Es wird eine akzeptable Trennung von 14 proteinogenen Aminosäuren erzielt. Mittels der HPLC-Analyse eines BSA-Hydrolysates, das nicht mit Norvalin aufgestockt wurde, konnte eine Coelution im Elutionsbereich des Hydrolysestandards Norvalin ausgeschlossen werden.

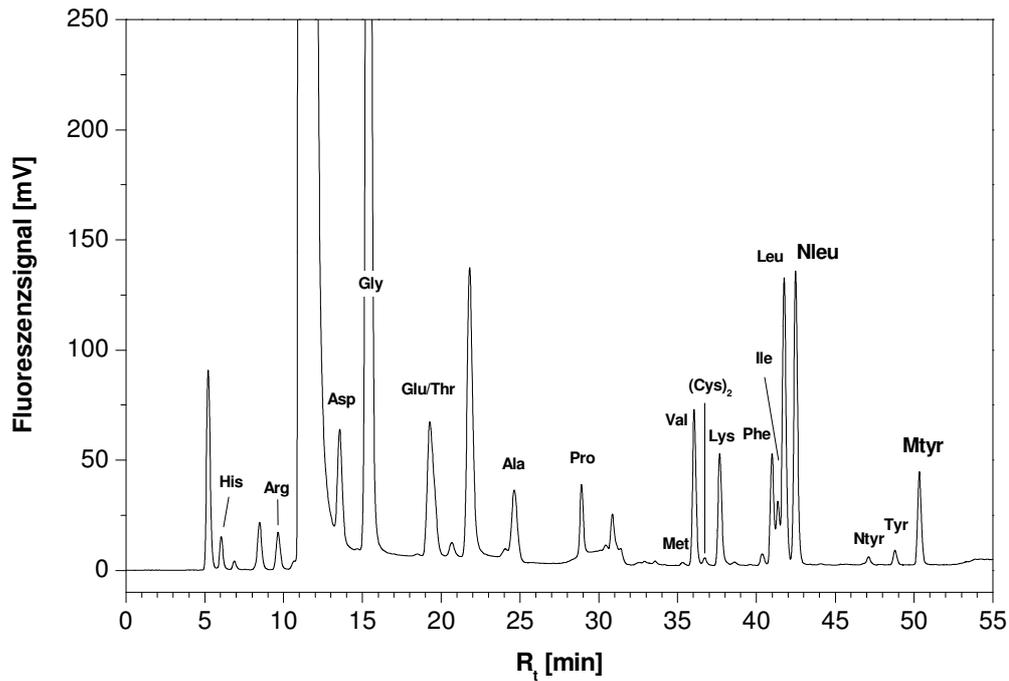


Abbildung 3.34: HPLC-FD-Chromatogramm eines Nitro-(7.4)-BSA-Hydrolysates (99 μg) nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6) mit Norleucin (99.4 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:162, Addition von 1 nmol α -Methyltyrosin und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

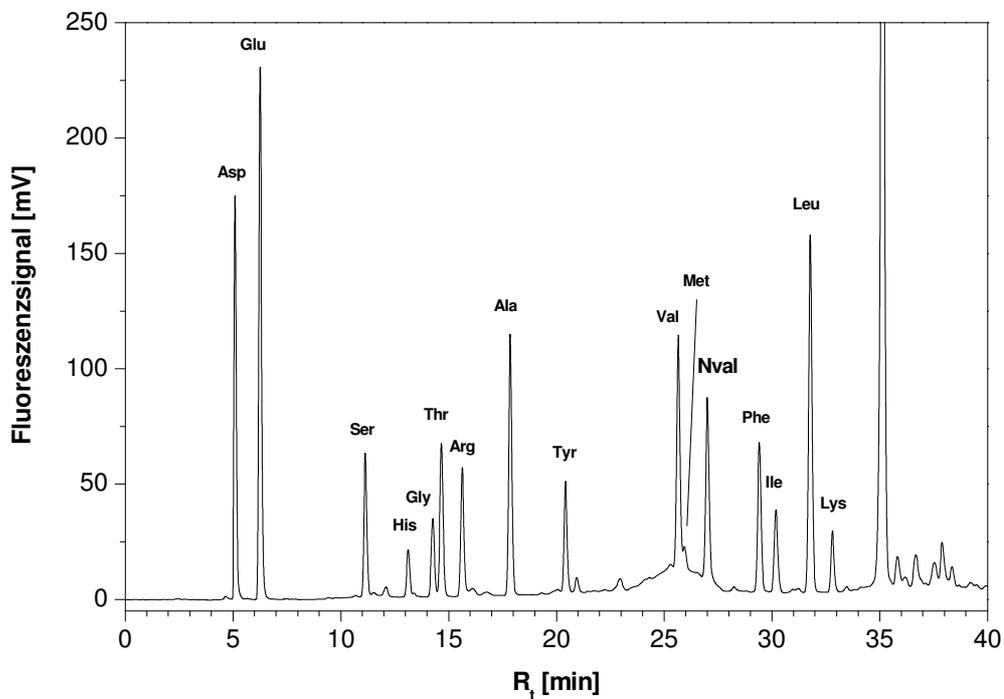


Abbildung 3.35: HPLC-FD-Chromatogramm eines BSA-Hydrolysates (103 μg) nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6) mit Norvalin (47.4 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:600 und Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Protein- und Aminosäurewiederfindungen

In *Abbildung 3.36* ist eine Korrelation der mit externer Kalibrierung bestimmten Wiederfindungen der Standardproteine gegen die des Hydrolysestandards nach Hydrolyse HM6 aufgetragen.

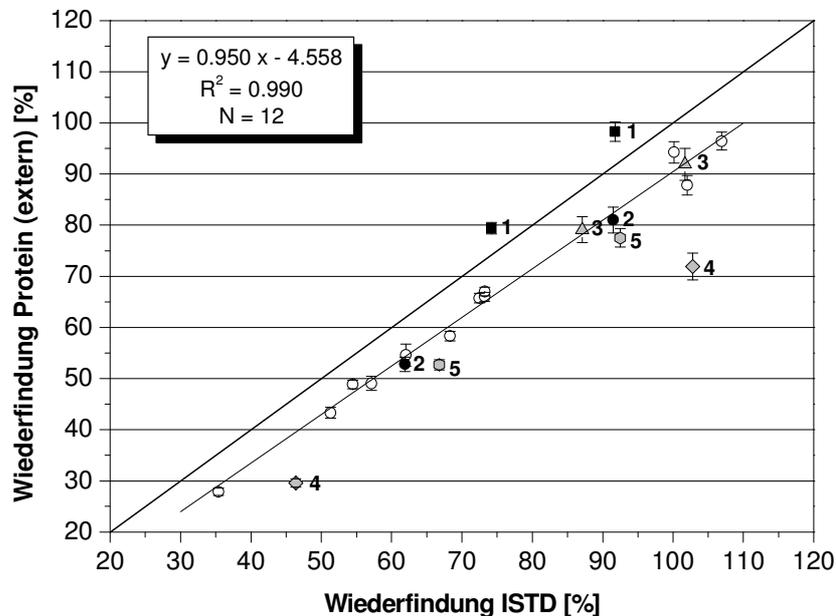


Abbildung 3.36: Korrelationsdiagramm der extern bestimmten Wiederfindungen von BSA (103 µg; ▲, ◆, ○, ●) und Nitro-(7.4)-BSA (99 µg; ■, ●) und Norvalin (1.5 nmol) bzw. Norleucin (1.6 nmol) nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6). Dargestellt sind 25 %-getrimmte Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen der Proben. Die Korrelationsparameter beziehen sich auf die Wiederfindungen von 12 BSA-Proben (○).

Die Proteinwiederfindungen liegen mit Ausnahme des Datenpaares **1** (Nitro-(7.4)-BSA, NBD-F, *Abbildung 3.42*) unterhalb der eingezeichneten 1:1-Linie. Die Korrelationsparameter wurden aus den Wiederfindungen von 12 BSA-Proben, die parallel in drei XP1500plus-Hochdruckbehältern hydrolysiert wurden, bestimmt. Die Proteinwiederfindungen, die als Datenpaare **1**, **2**, **3**, **4** und **5** gekennzeichnet wurden, sind nicht miteinbezogen worden. In 13 der 22 hydrolysierten Proteinproben traten Proteinverluste von 20-75 % auf, die durch die Verwendung des Hydrolysestandards korrigiert werden konnten (*Abbildung 3.37*). Nach Bereinigung des Proteinverlustes ($x = 100$ %) ergibt sich unter den Bedingungen von HM6 aus der Korrelationsgeraden eine Proteinwiederfindung von 89.5 %. Idealerweise sollten die Proteinwiederfindungen nach Korrektur des Probenverlustes keine Abhängigkeit mehr von der externen Wiederfindung des Hydrolysestandards zeigen. Die Steigung der Korrelationsgeraden deutet jedoch eine Abhängigkeit der korrigierten Proteinwiederfindung von dem Probenverlust an. Bei hohen Probenverlusten wird tendenziell weniger Protein gefunden.

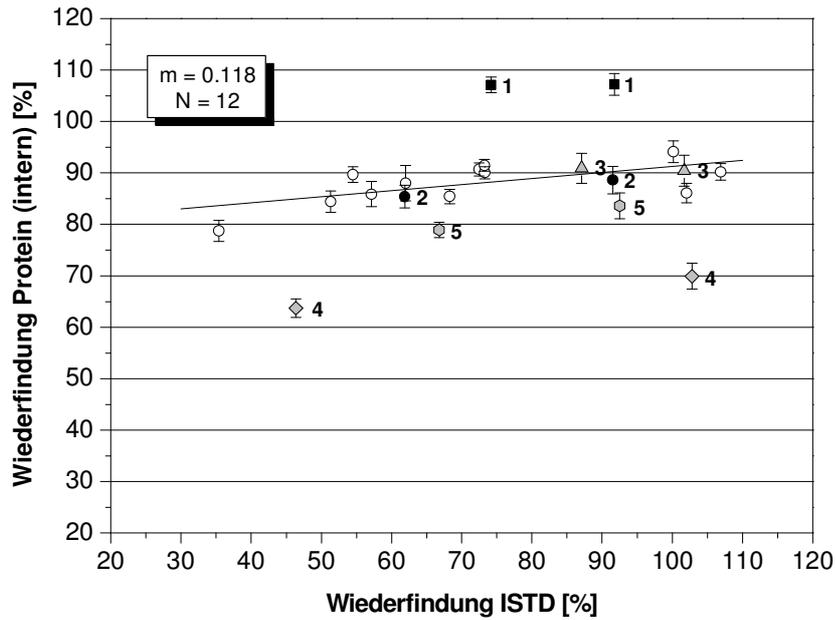


Abbildung 3.37: Korrelation der Wiederfindungen von BSA(▲, ◆, ○, ●)- und Nitro-(7.4)-BSA(■, ●) nach Korrektur des Proteinverlustes und der Wiederfindungen von Norvalin oder Norleucin.

Die Korrelationsparameter der Aminosäurewiederfindungen der 12 BSA-Proben und des Probenverlustes sind in *Tabelle 3.16* dargestellt. Alle Aminosäuren mit Ausnahme von Methionin, Serin und Glycin korrelieren mit der Wiederfindung von Norvalin sehr gut. Nach Korrektur des Probenverlustes ($x = 100\%$) ergeben sich Wiederfindungen von $>90\%$ für Aspartat/Asparagin, Phenylalanin, Glutamat/Glutamin, Alanin, Leucin, Arginin, Histidin und Lysin und von $<90\%$ für Valin, Isoleucin, Tyrosin und Glycin. Threonin und Serin werden deutlich unterbestimmt. Das in *Abbildung 3.38* gezeigte Korrelationsdiagramm von Serin verdeutlicht die Säurelabilität und die Problematik der korrekten Quantifizierung dieser Aminosäure.

Tabelle 3.16: Korrelationsparameter der extern bestimmten Aminosäurewiederfindungen von 12 BSA-Proben (○ in Abbildung 3.36, y-Achse) und der Wiederfindung von Norvalin (x-Achse) nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6). Angegeben sind Steigung m , Achsenabschnitt b und Bestimmtheitsmaß R^2 der Korrelationsgeraden $y = m \cdot x + b$ und die Wiederfindung für $x = 100$ %. Die Aminosäuren sind nach absteigendem R^2 aufgelistet.

AA	m	b	R^2	Wiederfindung [%]
Asx	0.965	-6.256	0.9939	90.2
Phe	0.965	-4.886	0.9929	91.6
Glx	0.999	-6.204	0.9925	93.7
Ala	0.955	-5.438	0.9923	90.1
Leu	0.970	-6.375	0.9918	90.6
Arg	1.135	-3.532	0.9862	110.0
His	1.106	-2.798	0.9851	107.8
Val	0.939	-5.697	0.9827	88.2
Ile	0.938	-4.141	0.9811	89.7
Lys	1.084	-7.362	0.9784	101.0
Tyr	0.947	-11.488	0.9681	83.2
Thr	0.792	-8.164	0.9574	71.0
Gly	0.775	10.304	0.9139	87.8
Ser	0.610	5.707	0.8760	66.7
Met	0.862	8.146	0.7324	-

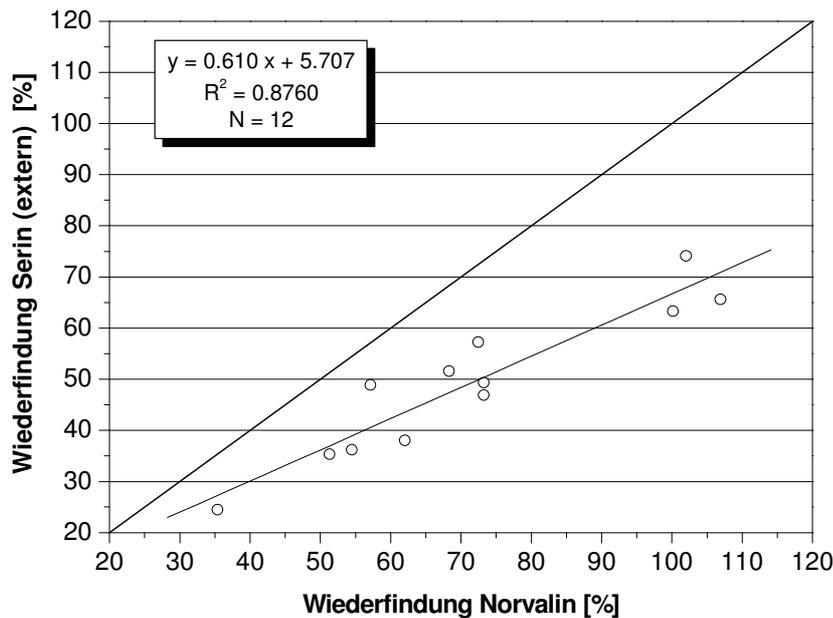


Abbildung 3.38: Korrelationsdiagramm der extern bestimmten Wiederfindungen von Serin von 12 BSA-Proben (○ in Abbildung 3.36) und der Wiederfindung von Norvalin.

In *Abbildung 3.39* sind die Steigungen der Korrelationsgeraden der Probenverlust-korrigierten Aminosäurewiederfindungen und der Wiederfindung von Norleucin dargestellt. Der Trend, der bereits bei den Proteinwiederfindungen aufgetreten ist, zeigt sich auch bei den Aminosäurewiederfindungen. Die Wiederfindungen von Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Alanin und Leucin mit unpolaren Seitenketten und der basischen Aminosäuren Histidin und Arginin sind gering abhängig vom Probenverlust. Die polaren Aminosäuren Threonin und Tyrosin zeigen die höchste Abhängigkeit. Die korrigierten Wiederfindungen von Serin streuen sehr diffus. Die Steigung von Glycin ist im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren negativ (*Abbildung 3.40*). Bei hohen Probenverlusten wird mehr Glycin gefunden als bei geringen. Diese Beobachtung kann auf Kontamination der Proben mit Glycin zurückgeführt werden, die bei geringen Glycinwiederfindungen einen zu der vorhandenen Menge höheren Anteil ausmacht. Bei hohen Probenverlusten wird diese Aminosäure daher überbestimmt. In diesen Fällen wird die Glycinwiederfindung jedoch bei Bildung des 25 %-getrimmten Mittelwertes durch die Trimmung eliminiert.

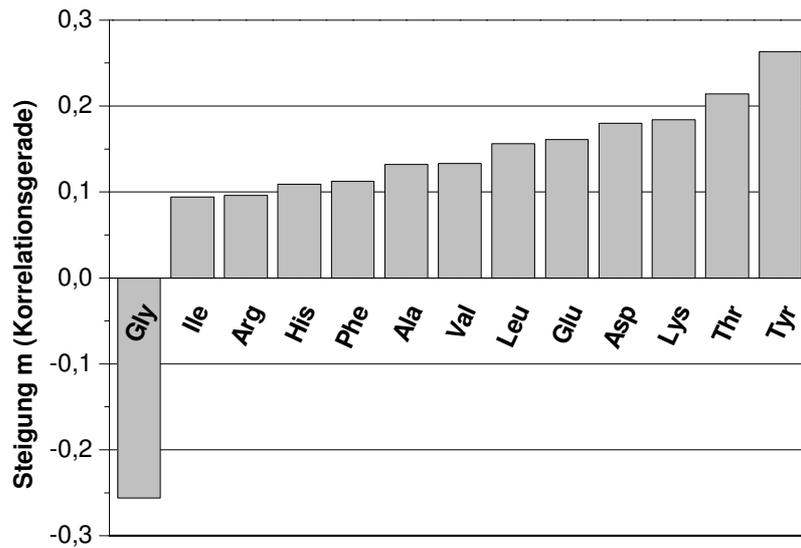


Abbildung 3.39: Steigungen m der Korrelationsgeraden der Aminosäurewiederfindungen (y -Achse) von 12 BSA-Proben (\circ in Abbildung 3.36) nach Korrektur von Proteinverlusten und der Wiederfindung von Norvalin (x -Achse in Abbildung 3.36).

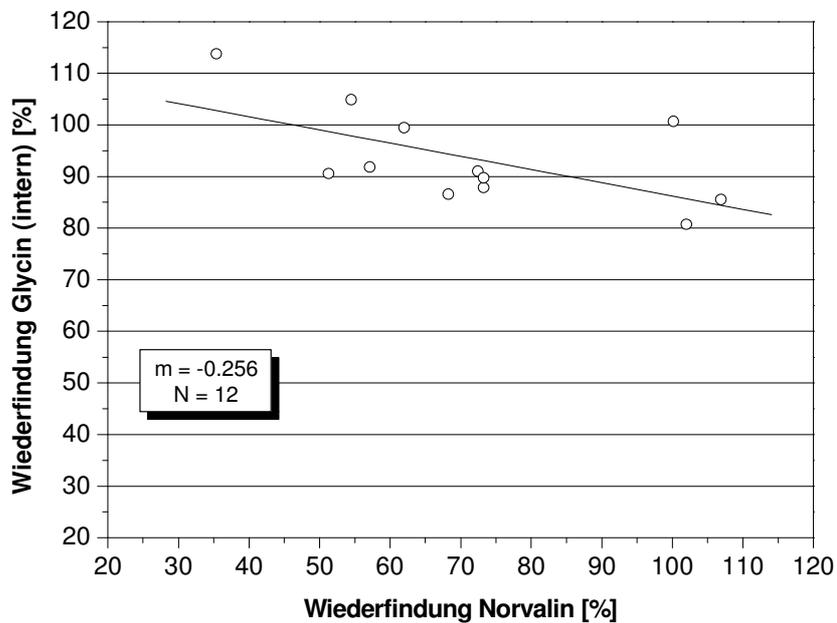


Abbildung 3.40: Wiederfindung von Glycin in 12 BSA-Proben (\circ in Abbildung 3.36) nach Korrektur von Probenverlusten und der extern bestimmten Wiederfindung von Norvalin.

Reproduzierbarkeit

Die Proteinwiederfindungen der Nitro-(7.4)-BSA-Proben der unteren und oberen Ebene des Hydrolyseeinsatzes I zeigten nach Hydrolyse HM5 einen signifikanten Unterschied von 10 %. Die Proben lagen vor der Hydrolyse nicht im Hydrolysemedium selbst vor, sondern in 100 µl Wasser und befanden sich ausschließlich im Gasphasenaustausch mit dem Hydrolysemedium. Dieser Trend wurde bei den Proteinhydrolysen in 4.7 M HCl (HM3, HM4), bei denen die Proben bereits vor der Durchführung im aciden Medium gelöst waren, nicht beobachtet. Die Reproduzierbarkeit der Hydrolysen mit Hydrolyseeinsatz II wurde durch die parallele Analyse von 12 BSA-Proben, die auf drei XP1500plus-Hochdruckbehälter verteilt wurden, überprüft. Die externen Proteinwiederfindungen dieser Proben wurden bereits mit der Wiederfindung von Norvalin korreliert (Abbildung 3.36) und werden in Abbildung 3.41 nach Korrektur des Probenverlustes nochmals im Detail aufgezeigt.

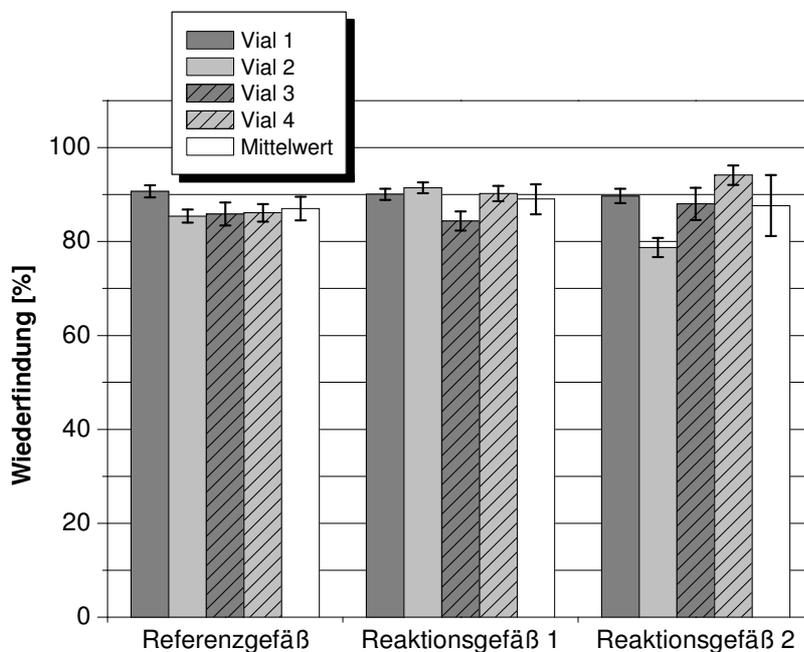


Abbildung 3.41: Wiederfindungen von $12 \times 103 \mu\text{g}$ BSA (○ in Abbildung 3.36) in XP1500plus-Referenzgefäß und XP1500plus-Reaktionsgefäßen der Mars5-Mikrowelle nach paralleler Proteinhydrolyse (HM6) in Hydrolyseeinsatz II. Angegeben sind 25%-getrimmte Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen.

Die Vial-zu-Vial-Reproduzierbarkeit der Hydrolyse im Referenzgefäß, das direkt druckkontrolliert wird, ist mit 2.8 % besser als in den nicht-kontrollierten Reaktionsgefäßen mit 3.6 bzw. 7.4 % (relative Standardabweichung des Mittelwertes der Proteinwiederfindungen eines Hochdruckbehälters). Die Reproduzierbarkeit von Hochdruck- zu Hochdruckbehälter ist mit einer Präzision von 1.2 % (relative Standardabweichung des Mittelwertes der drei Mittelwerte) ebenfalls zufriedenstellend.

3-Nitrotyrosin- und Norleucin/Norvalinwiederfindung

Die Wiederfindungen von 3-Nitrotyrosin aus Nitro-(7.4)-BSA wurden unter den Hydrolysebedingungen HM6 zu 113.9 ± 3.3 % ermittelt (Abbildung 3.42).

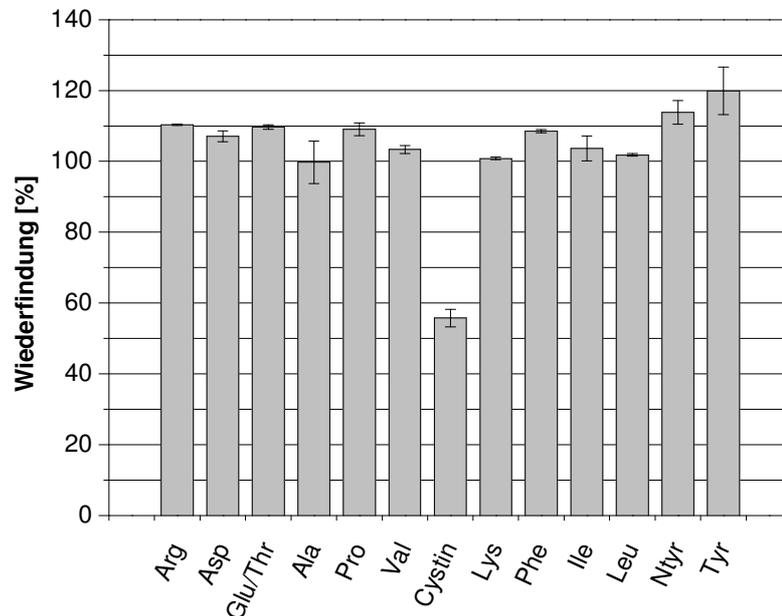


Abbildung 3.42: Aminosäurewiederfindungen von 99 µg Nitro-(7.4)-BSA nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10%(w/v) TFA, 0.1 %(w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen von zwei Proben, die durch je eine HPLC-Einzelbestimmung ermittelt wurden.

Die Wiederfindungen der proteinogenen Aminosäuren liegen ebenfalls z.T. >100 %. Die parallel analysierten Blindhydrolysate deuteten jedoch keinen signifikanten Beitrag des Aminosäurehintergrunds an. Die gefundenen Stoffmengen lagen im Bereich von 0.03-0.3 nmol, dies entspricht einem Anteil von 0.1-0.5 % der wiedergefundenen Stoffmengen der Nitro-(7.4)-BSA-Proben. Die Wiederfindungen von 95.4 nmol Norleucin in diesen Blindhydrolysaten lagen bei 74.5 ± 2.6 %, in den Proteinproben bei 83.0 ± 12.4 %. Die Wiederfindungen von Norvalin der Blindhydrolysate, die mit der OPA-Methode analysiert wurden, lagen stets im Bereich von 85-96 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Addition von Phenol Adsorptionseffekte minimiert und die Stabilität von 3-Nitrotyrosin unter sauren Hydrolysebedingungen in Borosilikatglas erhöht.

3.1.4.8 Hydrolysen in 6 M HCl, 10 % TFA, 1 % Phenol, 3 mM Ascorbinsäure

Es wurden 11 BSA-Proben in 8 Hydrolysen in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure zersetzt (*Tabelle 3.17*).

Tabelle 3.17: Übersicht der Proteinhydrolysen von BSA in 6 M HCl, 10% (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure bei 5 bar (152 °C, HM7, HM8 und HM9). Die HPLC-Analyse erfolgte mit Derivatisierung OPA-VD1 und Gradient OPA-G1.

HM	N ⁽²⁾	Protein	Menge [µg]	t _H [min]	Deriva- tisierung	Hydrolyse- einsatz	Symbol (Abbildung 3.43)
7, 8, 9	3	BSA	102	30, 45, 60 ⁽¹⁾	OPA	II	-, -, ○
9	5	BSA	102	60	OPA	II	●, ◆, ▲, ◆, ★

(1) - Hydrolysekinetik; (2) - Anzahl der durchgeführten Hydrolysen.

In den Reaktionsgefäßen befanden sich neben BSA als Hydrolysekontrolle Feinstaubextrakte, makromolekulare PM2.5-Fractionen bzw. Blindlösungen.

Protein- und Aminosäurewiederfindungen

In *Abbildung 3.43* ist die Korrelation der mit externer Kalibrierung bestimmten Wiederfindungen von BSA gegen die des Hydrolysestandards nach Proteinhydrolyse (HM9) aufgetragen. Die Proteinwiederfindungen liegen alle unterhalb der eingezeichneten 1:1-Linien. In diesem Fall traten in 3 von 11 hydrolysierten Proben Proteinverluste von 40-75 % auf, die durch die Verwendung des Hydrolysestandards korrigiert wurden (*Abbildung 3.44*). Nach Bereinigung des Proteinverlustes ($x = 100 \%$) ergibt sich unter den Bedingungen von HM9 aus der Korrelationsgeraden der extern bestimmten Wiederfindungen eine Proteinwiederfindung von 91.2 %. Die bereits in *Abschnitt 3.1.4.7* aufgezeigte Abhängigkeit der Proteinwiederfindungen nach Korrektur des Probenverlustes von der Wiederfindung des Hydrolysestandards zeigt sich auch bei diesen Hydrolysen (*Abbildung 3.44*).

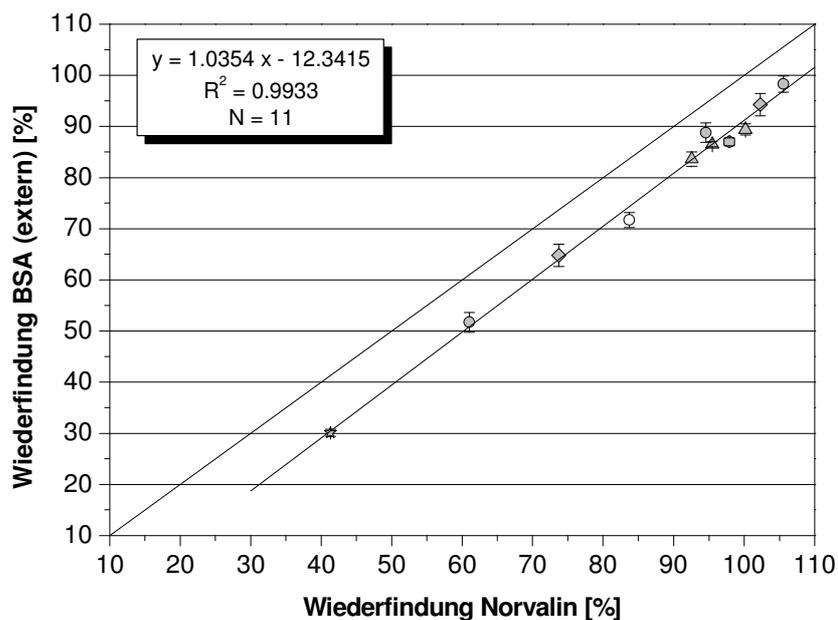


Abbildung 3.43: Korrelationsdiagramm der extern bestimmten Wiederfindungen von BSA (102 μg) und Norvalin (1.5 nmol) nach Hydrolyse in 6 M Salzsäure, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol, 3 mM Ascorbinsäure, 60 min, 5 bar (HM9). Dargestellt sind 25 %-getrimmte Mittelwerte und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen der Proben. Die Proteinwiederfindungen einer Hydrolyse werden durch das identische Symbol repräsentiert.

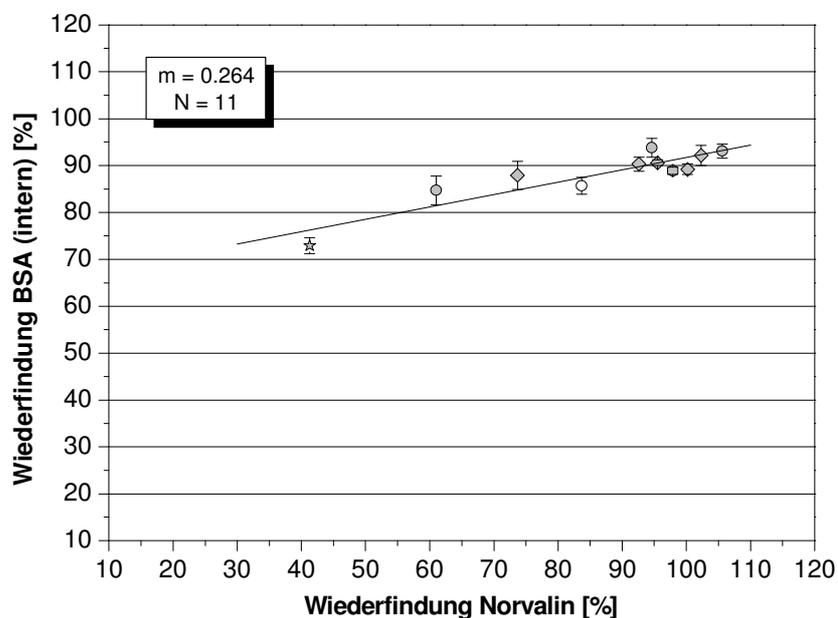


Abbildung 3.44: Korrelation der Wiederfindungen von BSA nach Korrektur des Proteinverlustes und der Wiederfindung von Norvalin.

Die Korrelationsparameter der Aminosäurewiederfindungen der BSA-Proben und des Probenverlustes sind in *Tabelle 3.18* dargestellt.

Tabelle 3.18: Korrelationsparameter der extern bestimmten Aminosäurewiederfindungen der 11 in Abbildung 3.43 dargestellten BSA-Proben (y-Achse) und der Wiederfindung von Norvalin (x-Achse) nach Hydrolyse in 6 M Salzsäure, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol, 3 mM Ascorbinsäure, 60 min, 5 bar (HM9). Angegeben sind Steigung m , Achsenabschnitt b , Bestimmtheitsmaß R^2 der Korrelationsgeraden $y = m \cdot x + b$ und die Wiederfindung für $x = 100$ %. Die Aminosäuren sind nach abnehmendem R^2 aufgelistet.

AA	m	b	R^2	N	Wiederfindung [%]
Leu	1.066	-13.022	0.9932	11	93.6
Phe	0.999	-9.468	0.9929	11	90.4
Ala	1.049	-12.315	0.9920	11	92.6
Ile	1.020	-10.768	0.9892	11	91.2
His	1.020	-8.570	0.9845	11	93.9
Asx	1.038	-11.164	0.9822	11	92.6
Val	1.027	-10.500	0.9810	11	92.2
Gly	0.970	-9.565	0.9703	11	87.3
Tyr	1.058	-19.892	0.9627	11	85.9
Thr	0.964	-14.419	0.9620	9 ⁽¹⁾	82.0
Arg	1.229	-21.280	0.9432	11	101.6
Ser	0.796	-17.897	0.9238	9 ⁽¹⁾	61.7
Glx	1.117	-13.296	0.9137	11	98.4
Lys	0.999	-8.462	0.6190	11	-
Met	0.941	-6.703	0.5226	9 ⁽¹⁾	-

(1) - Zwei Ausreisser wurden aus der Statistik entfernt.

Alle Aminosäuren mit Ausnahme von Serin, Glutamat/Glutamin, Lysin und Methionin korrelieren mit der Wiederfindung von Norvalin mit einem Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0.94$. Die sauren bzw. basischen Aminosäuren Aspartat/Asparagin, Glutamat/Glutamin, Arginin und Lysin zeigen in diesem Fall schlechtere Korrelationen als bei kürzeren Hydrolysezeiten unter den Bedingungen der Methode HM6 (Abschnitt 3.1.4.7). Glycin hingegen korreliert deutlich besser. Nach Korrektur des Probenverlustes ($x = 100$ %) ergeben sich Wiederfindungen von >90 % für Arginin, Glutamat/Glutamin, Histidin, Leucin, Aspartat/Asparagin, Alanin, Valin, Isoleucin und Phenylalanin, und von <90 % für Tyrosin und Glycin. Threonin und Serin werden analog zu Methode HM6 deutlich unterbestimmt. Im Vergleich zu Methode HM6 erhöht sich die Ausbeute der aliphatischen, säurestabilen Aminosäuren Leucin, Alanin, Isoleucin und Valin. Die Wiederfindung von Tyrosin erhöht sich trotz der 10-fachen Erhöhung der Phenolkonzentration im Hydrolysemedium bei Verdoppelung

der Hydrolysezeit nicht signifikant. Die Bestimmung von Serin und Threonin ist aufgrund ihrer Säurelabilität auch unter diesen Bedingungen unsicher.

Hydrolysekinetik

Im Rahmen des Standardadditionsexperimentes **B** wurde eine Kinetik der Hydrolyse von BSA zu drei Hydrolysezeitpunkten nach Methode HM7, HM8 und HM9 durchgeführt (Tabelle 3.17). Die BSA-Wiederfindungen belaufen sich bei einer Hydrolysedauer von 30, 45 und 60 min auf 84.1-85.7 % (Abschnitt 3.2.4.3). Die zeitabhängige Wiederfindung freier Aminosäuren im Proteinhydrolysat ist in Tabelle 3.19 aufgeführt.

Tabelle 3.19: Aminosäurewiederfindungen nach Hydrolyse von BSA (102 µg) in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9) und Extrapolation der Hydrolysekinetikdaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der HPLC-Doppelbestimmungen.

AA	Wiederfindung B(t) [%]					
	nach Extrapolation			Hydrolyse nach t_H		
	exponentiell: B(t → 0), B(t → ∞)	linear: B(t → 0) ⁽⁴⁾	MW ⁽⁵⁾	30 min	45 min	60 min
Asx	96.6 ⁽¹⁾	91.9	-	90.4 ± 0.2	87.1 ± 1.8	88.1 ± 0.3
Glx	93.0 ⁽¹⁾	92.9	-	90.5 ± 0.1	87.3 ± 0.2	87.5 ± 0.7
Ser	95.4 ⁽¹⁾	90.2	-	73.7 ± 2.3	63.1 ± 2.3	56.4 ± 2.3
His	-	-	95.1	95.3 ± 9.7	93.3 ± 4.1	96.8 ± 0.0
Gly	-	-	80.8	83.2 ± 3.4	79.1 ± 1.3	80.1 ± 5.2
Thr	83.2 ⁽¹⁾	82.9	-	77.9 ± 0.9	76.0 ± 0.6	73.1 ± 0.3
Arg	-	-	83.2	82.5 ± 14.0	83.2 ± 5.8	83.8 ± 10.0
Ala	91.9 ⁽¹⁾	91.9	-	90.4 ± 0.4	86.3 ± 0.0	87.9 ± 1.0
Tyr	88.3 ⁽²⁾	-	-	74.4 ± 2.4	85.5 ± 1.8	85.0 ± 0.4
Val	95.0 ⁽²⁾	-	-	84.7 ± 0.8	91.7 ± 0.9	93.8 ± 1.1
Met	-	-	83.5	84.2 ± 1.8	80.0 ± 2.0	86.3 ± 1.1
Phe	-	-	85.9	85.9 ± 1.8	85.3 ± 0.3	86.6 ± 0.4
Ile	86.9 ⁽²⁾	-	-	80.5 ± 3.5	85.4 ± 0.4	86.3 ± 0.3
Leu	89.4 ⁽³⁾	-	-	87.9 ± 0.4	88.5 ± 0.4	89.4 ± 1.1
Lys	78.3 ⁽¹⁾	78.2	-	77.6 ± 13.0	73.5 ± 2.5	75.8 ± 1.5

(1) - Regression (t → 0): Kinetik 1. Ordnung; (2) - exponentiell ansteigende Regression (t → ∞); (3) - B(60 min); (4) - Regression (t → 0): lineare Kinetik; (5) - Mittelwert von B(30 min), B(45 min) und B(60 min).

Zur Korrektur der resultierenden Unterbestimmung säurelabiler bzw. hydrolyseresistenter Aminosäuren, wurden die in *Abschnitt 2.2.5.4* beschriebenen Extrapolationsverfahren auf die Hydrolysedaten angewendet. Die Wiederfindungen von Aspartat/Asparagin, Glutamat/Glutamin, Serin, Threonin, Alanin und Lysin nehmen in Relation zu der Messunsicherheit der HPLC-Doppelbestimmung mit zunehmender Hydrolysezeit ab, während die von Valin, Isoleucin und Tyrosin ansteigen (*Abbildung 3.45* und *Abbildung 3.46*).

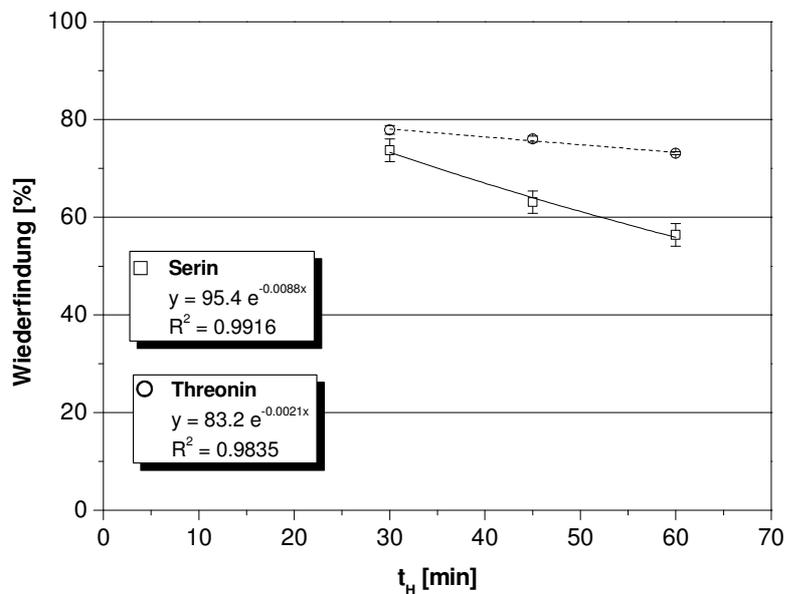


Abbildung 3.45: Wiederfindungen von Serin (□) und Threonin (○) nach Hydrolyse von BSA in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9) und ihre Regression unter Annahme einer Kinetik 1. Ordnung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der HPLC-Doppelbestimmung.

Bildet man den 25 %-getrimmten Mittelwert aus den höchsten in *Tabelle 3.19* aufgeführten Aminosäurewiederfindungen, die sich aus den unterschiedlichen Extrapolationsverfahren ergeben, ermittelt man eine BSA-Wiederfindung von 89.2 ± 2.6 %. Aus den Hydrolysekinetikdaten wurde außerdem die Aminosäurezusammensetzung von BSA ermittelt (*Tabelle 6.1*). Die Qualität der Daten wurde mit Hilfe der Größe der prozentualen Übereinstimmung von theoretischer und experimentell ermittelter Aminosäurezusammensetzung (CA = *compositional agreement*) bewertet. Es wird eine Abnahme von CA von 93.8 % auf 92.2 % mit zunehmender Hydrolysezeit beobachtet. Dieser Trend ist auf die Zerstörung der säurelabilen Aminosäuren Serin und Threonin zurückzuführen. Bei Anwendung der Extrapolationsverfahren erhöht sich CA auf 94.4 %. Die erhöhte Qualität der Daten wird außerdem in der erzielten Trefferpunktzahl für BSA in einer durchgeführten SWISS-PROT-Datenbankrecherche (AACompldent-Software, ExPASy-Server) bestätigt. BSA erscheint auf der Trefferliste vor HSA mit einer Trefferbewertung von 32 Punkten. Die nach 30-, 45- und 60-minütiger Hydrolyse ermittelten Aminosäurezusammensetzungen hingegen erhielten eine

schlechtere Trefferbewertung von 34, 35 und 37 Punkten für BSA. HSA erschien in diesen Fällen stets vor BSA in der Trefferliste.

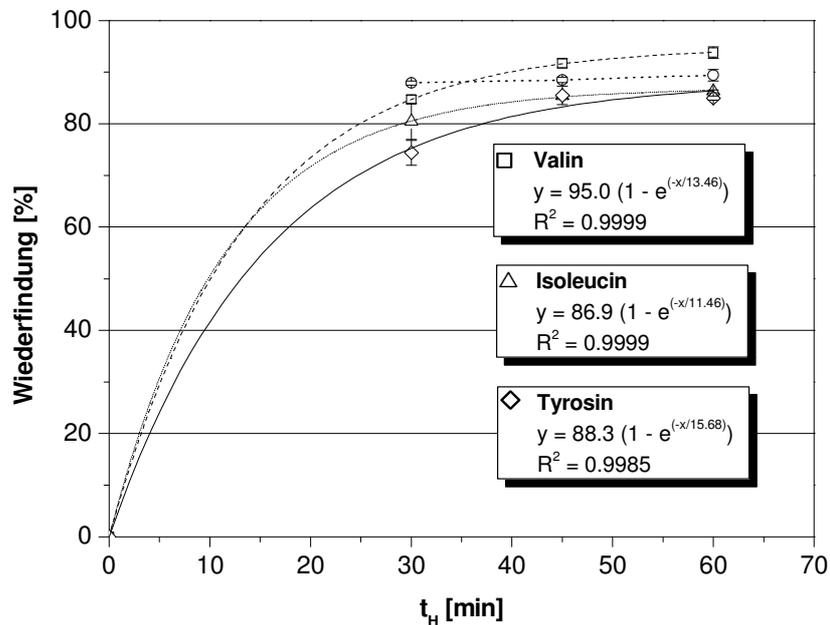


Abbildung 3.46: Absolute Wiederfindungen von Valin (\square), Isoleucin (\triangle) und Tyrosin (\diamond) nach Hydrolyse von BSA in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9) und ihre Regression unter Annahme einer exponentiell ansteigenden Kinetik. Leucin (\circ): keine Regression. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der HPLC-Doppelbestimmung.

Da die in *Tabelle 3.19* angegebenen Fehler der Aminosäurewiederfindungen lediglich die Unsicherheit der HPLC-Bestimmung widerspiegeln, und nicht die Wiederholpräzision der Hydrolyse repräsentieren, wurden zu Alanin relative Aminosäurewiederfindungen bestimmt (*Tabelle 3.20*). Es ergibt sich im Vergleich zu den Kinetikprofilen der absoluten Wiederfindungen ein etwas verändertes Bild. Phenylalanin und Leucin besitzen nun neben Tyrosin, Valin und Isoleucin ebenfalls ein exponentiell ansteigendes Kinetikprofil. Ihre relativen Wiederfindungen betragen nach 60-minütiger Hydrolyse bzw. Extrapolation 97-110 % (*Abbildung 3.47*). Ein signifikant abnehmendes Kinetikprofil hingegen besitzt nur noch Serin, während Threonin bei 45 min ein Maximum durchläuft.

Tabelle 3.20: Zu Alanin relative Aminosäurewiederfindungen von BSA (102 µg) nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9) und ihre extrapolierten Werte. Die absoluten Wiederfindungen von Alanin in Tabelle 3.19 wurden auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der HPLC-Doppelbestimmungen.

AA	Rel. Wiederfindung B(t) [%]			
	nach Extrapolation	Hydrolyse bei t _H		
	B(t → 0) B(t → ∞)	30 min	45 min	60 min
Asx	100.4 ⁽³⁾	100.0 ± 0.5	100.9 ± 2.1	100.3 ± 1.2
Glx	100.3 ⁽³⁾	100.2 ± 0.5	101.1 ± 0.3	99.6 ± 1.4
Ser	98.9 ⁽²⁾	81.5 ± 2.6	73.1 ± 2.7	64.2 ± 2.7
His	107.9 ⁽³⁾	105.4 ± 10.8	108.0 ± 4.7	110.2 ± 1.2
Gly	91.6 ⁽³⁾	92.1 ± 3.8	91.6 ± 1.5	91.2 ± 6.1
Thr	88.0 ⁽⁴⁾	86.2 ± 1.1	88.0 ± 0.7	83.2 ± 1.0
Arg	94.4 ⁽³⁾	91.3 ± 15.5	96.3 ± 6.7	95.4 ± 11.5
Ala	100.0 ⁽¹⁾	100.0 ± 0.7	100.0 ± 0.0	100.0 ± 1.6
Tyr	102.7 ⁽¹⁾	82.3 ± 2.7	99.0 ± 2.1	96.8 ± 1.2
Val	110.3 ⁽¹⁾	93.7 ± 1.0	106.2 ± 1.1	106.8 ± 1.7
Met	94.7 ⁽³⁾	93.1 ± 2.0	92.6 ± 2.3	98.3 ± 1.7
Phe	99.1 ⁽¹⁾	95.1 ± 1.0	98.8 ± 0.4	98.6 ± 1.2
Ile	100.6 ⁽¹⁾	89.0 ± 3.9	98.9 ± 0.5	98.2 ± 1.2
Leu	102.6 ⁽¹⁾	97.3 ± 0.7	102.4 ± 0.5	101.7 ± 1.7
Lys	85.8 ⁽³⁾	85.9 ± 14.4	85.1 ± 2.9	86.2 ± 2.0

(1) - exponentiell ansteigende Regression (t → ∞); (2) - Regression (t → 0): lineare Kinetik; (3) - Mittelwert von B(30 min), B(45 min) und B(60 min); (4) - Maximum B(45 min).

Die übrigen Aminosäuren besitzen im Rahmen der HPLC-Messunsicherheit eine konstante relative Wiederfindung.

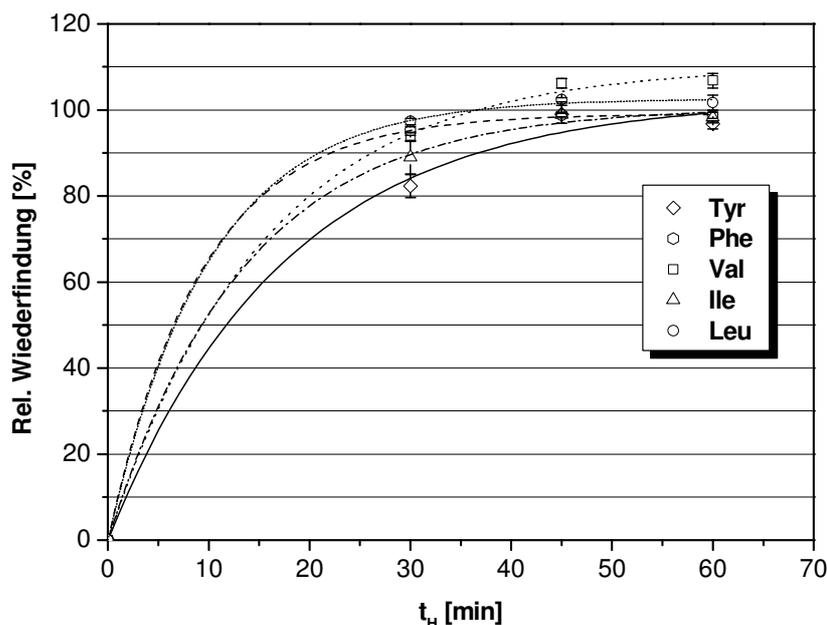


Abbildung 3.47: Zu Alanin relative Wiederfindungen von Tyrosin (\diamond), Phenylalanin (\circ), Valin (\square), Isoleucin (\triangle), und Leucin (\circ) nach Hydrolyse von BSA in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9). Die absoluten Wiederfindungen $B(t)$ von Alanin in Tabelle 3.19 wurden auf 100 % gesetzt.

3.1.5 BCA- und NanoOrange-Assay

Der Micro-BCA- und der NanoOrange-Assay dienen neben der Aminosäureanalytik in dieser Arbeit als Proteinbestimmungsmethoden für Proteine in atmosphärischen Feinstaubproben. In beiden Tests wurde BSA als Kalibrierstandard eingesetzt, die Durchführung erfolgte in Mikrotiterplatten (MTP) des 96er-Formats. Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Peptidbindung und der photometrischen Absorptionsmessung des entstehenden $\text{Cu}^+(\text{BCA})_2$ -Komplexes bei 550 nm. *Abbildung 3.48* stellt die lineare Kalibrierung des BCA-Assays in einem Konzentrationsbereich von 0-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dar. Die NWG und BG belaufen sich auf 1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.2 μg und 0.6 μg). Die Absorptionsmessung erfolgte in einem 8-Kanal-Photometer. Der NanoOrange-Assay verwendet einen Merocyanin-Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit Detergenzien-beschichteten Proteinen seine Fluoreszenzquantenausbeute stark erhöht. Die sigmoide Kalibrierkurve des NanoOrange-Assays in einem Konzentrationsbereich von 0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist in *Abbildung 3.49* dargestellt. Die NWG und BG belaufen sich auf 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.02 und 0.07 μg). Die Anregung und Messung des Farbstoff-Protein-Komplexes erfolgte mit dem Spektrofluorometer Viktor². Der NanoOrange-Assay ist um eine Größenordnung empfindlicher als der BCA-Assay. Der BCA-Assay ist jedoch deutlich einfacher zu handhaben.

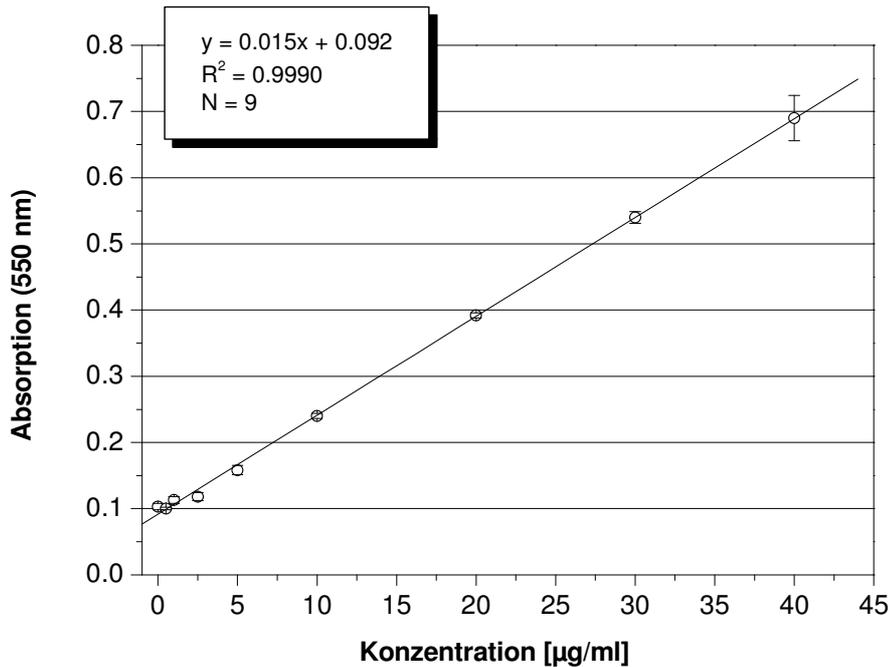


Abbildung 3.48: Kalibrierung des Micro-BCA-Assays (Uptima) mit BSA in den Konzentrationen 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 µg/ml ($N = 9$). NWG = 1,1 µg/ml, BG = 4,0 µg/ml (Blindwertmethode). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von je vier ($N' = 4$, Kalibrierlösung) bzw. acht Parallelmessungen ($N' = 8$, Blindlösung). Absorptionsmessung bei 550 nm.

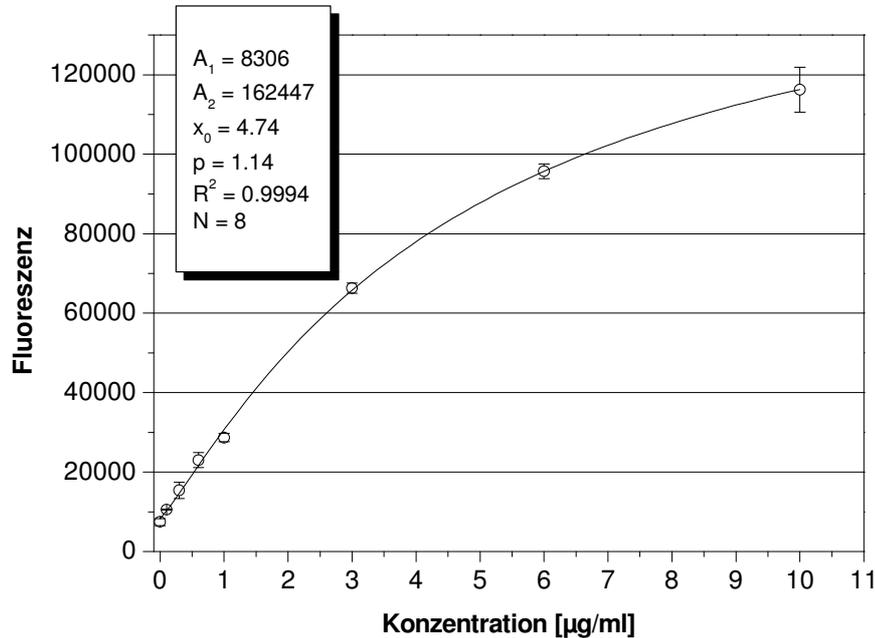


Abbildung 3.49: Kalibrierung des NanoOrange-Assays (Molecular Probes) mit BSA in den Konzentrationen 0, 0,1, 0,3, 0,6, 1,0, 3,0, 6,0, 10,0 µg/ml ($N = 8$). Sigmoidale Kalibrierfunktion: $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$, A_1 = minimale Absorption (untere Asymptote), A_2 = Maximale Absorption (obere Asymptote), x_0 = Testmittelpunkt (50 %-Wert), p = Steigung im Testmittelpunkt. NWG = 0,10 µg/ml, BG = 0,37 µg/ml (Blindwertmethode). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von je vier Parallelmessungen ($N' = 4$). Fluoreszenzanregung: 485 nm, Fluoreszenzdetektion: 590 nm.

3.1.6 Diskussion

Die mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol bei 5 bar für 30 min (HM6) und in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure bei 5 bar für 30, 45 oder 60 min (HM7, HM8 und HM9) in Kombination mit der OPA-HPLC-Methode (OPA-VD1/OPA-G1) ist für die Quantifizierung und Identifizierung von Proteinen in reinen Lösungen gut geeignet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens beträgt 1.3 µg/ml und 3.0 µg/ml (0.4 µg und 0.9 µg). Der Micro-BCA- und NanoOrange-Assay sind jedoch bzgl. der Proteinquantifizierung empfindlicher als die Aminosäureanalytik. Die Nachweisgrenze des BCA- und NanoOrange-Assays belaufen sich auf 1.1 µg/ml bzw. 0.1 µg/ml (0.2 bzw. 0.02 µg). Neben der höheren Empfindlichkeit ist die deutlich schnellere Probenvorbereitung und der dadurch höhere Probendurchsatz als weiterer Vorteil gegenüber der Aminosäureanalytik zu sehen. Aus den Aminosäure-Nachweisgrenzen der OPA-HPLC-Methode OPA-VD1/OPA-G1 (Abschnitt 3.1.2.2) kann eine auf die Proteinhydrolyse bezogene Nachweisgrenze, die potentiell durch vollständige Eliminierung des Eintrags von exogenen Aminosäuren erreicht würde, als BSA-Äquivalent berechnet werden. Diese ist um einen Faktor 80 niedriger als die Nachweisgrenze, die aus den Hydrolyseblindlösungen ermittelt wurde, und beträgt 5.0 ng Protein. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit könnte durch Reduzierung des Eintrages von proteinhaltigem Material aus der Laborumgebung wie z. B. Hautschuppen und Haaren sowie Staub aus der Laborluft und von Laboroberflächen erzielt werden. Auf die Verwendung von gepuderten Laborhandschuhen aus Latex (Latexproteine und Maisstärke) sollte aus prinzipiellen Erwägungen stets verzichtet und auf Vinylhandschuhe zurückgegriffen werden. Der Vorteil der Aminosäureanalytik gegenüber dem BCA- und NanoOrange-Assay besteht in dem zusätzlichen Informationsgehalt der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins bzw. Proteingemisches. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfordert Aminosäuredaten hoher Qualität. Es konnte anhand der BSA-Hydrolyse unter den Bedingungen von HM7, HM8 und HM9 (Hydrolysekinetik) gezeigt werden, dass kurze Hydrolysezeiten ($t_H = 30$ min) tendenziell eine höhere Qualität an Aminosäuredaten generieren als längere Hydrolysezeiten. Die Anwendung von Extrapolationsverfahren auf zeitabhängige Aminosäurewiederfindungen in Proteinhydrolysaten kompensiert außerdem den Hydrolyseartefakt und führt zu einer höheren Genauigkeit der experimentell ermittelten Aminosäurezusammensetzung. In diesem Zusammenhang erscheint es sinnvoll Hydrolysekinetiken durchzuführen, die zwei Hydrolysen zu mind. 4 Zeitpunkten beinhalten.

3.2 PROTEINBESTIMMUNG IM ATMOSPHERISCHEN AEROSOL

3.2.1 Terminologie

In atmosphärischen Aerosolpartikeln kommen Proteine in zellfragment- oder zellgebundener Form in PBAPs oder in freier auf organischen Partikeln adsorbierter Form vor. Sie stellen ein heterogenes Gemisch aus Proteinen mit einer hohen Diversität hinsichtlich Funktion, Struktur, Wasserlöslichkeit und Molekulargewicht dar. Das Ideal der atmosphärischen Proteinbestimmung ist daher *a priori* schwer zu realisieren. Zellfragment- oder zellgebundene Proteine werden durch eine Extraktion in Wasser oder Puffer auch mit Hilfe einer herkömmlichen Ultraschallanwendung im Wasserbad nur unzureichend gelöst. Ein großer Teil des Proteins bleibt gebunden und entzieht sich der Proteinbestimmung. Mit Hilfe der Proteinhydrolyse und Aminosäureanalytik ist man jedoch nach dem Probenvorbereitungsschema, das in *Abbildung 3.50* dargestellt ist, in der Lage, das Gesamtprotein (TP), wasserlösliches Protein (WSP) und makromolekulares wasserlösliches Protein (WSP(>5 kDa)) in atmosphärischen Feinstaubproben zu bestimmen. Die Berechnung des Proteingehaltes der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktion erfordert stets die Kenntnis der in ihr enthaltenen Menge an proteingebundenen Aminosäuren (CAA). Die Proteinmenge wird dann aus CAA als Proteinäquivalent berechnet (*Abschnitt 3.2.2*). CAA wird in der TP- und WSP-Fraktion aus dem Gesamtaminosäuregehalt (TAA) und dem Gehalt freier Aminosäuren (FAA) als Differenz $CAA = TAA - FAA$ ermittelt. Die Abkürzungen CAA, TAA und FAA wurden in Anlehnung an die Terminologie von ZHANG et al.^[36] gewählt. Der FAA-Gehalt einer PM_{2.5}-Probe ist aus der Aminosäureanalyse des nichthydrolysierten wässrigen Extraktes zugänglich (**B** in *Abbildung 3.50*). Der TAA-Gehalt der TP- und WSP-Fraktion geht aus der Proteinhydrolyse des PM_{2.5}-Glasfaserfilters bzw. des wässrigen Extraktes und der anschließenden Aminosäureanalytik hervor (**A** und **C** in *Abbildung 3.50*). Die Bestimmung des WSP(>5 kDa)-Gehaltes einer PM_{2.5}-Probe nach Größenfraktionierung des wässrigen Extraktes und Proteinhydrolyse der makromolekularen Fraktion benötigt die Information des FAA-Gehaltes nicht, da eine Abtrennung der freien Aminosäuren der Probe durch den Größenausschluss bereits erfolgte (**D** in *Abbildung 3.50*).

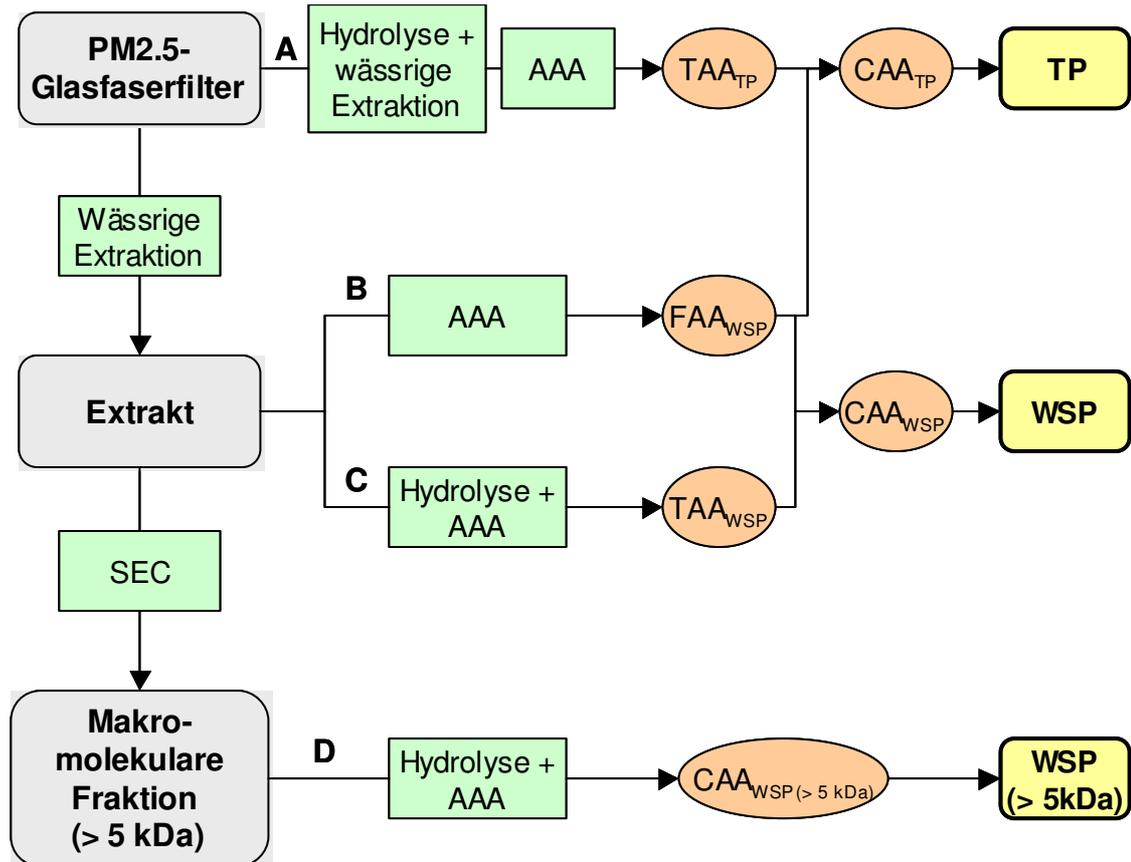


Abbildung 3.50: Probenvorbereitung zur Bestimmung von Gesamtprotein (TP = *total protein*), wasserlöslichem Protein (WSP = *water-soluble protein*) und wasserlöslichem, größenfraktioniertem Protein (WSP (>5 kDa)) in PM2.5. SEC = Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*), AAA = Aminosäureanalytik (*amino acid analysis*), TAA = Gesamtaminosäuregehalt (*total amino acids*), CAA = Gehalt proteingebundener Aminosäure (*combined amino acids*), FAA = freier Aminosäuregehalt (*free amino acids*), TAA = CAA + FAA.

3.2.2 Proteinberechnung aus Aminosäuredaten

Der Proteingehalt der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktion einer PM2.5-Probe wurde aus dem CAA-Gehalt der entsprechenden Hydrolysate ermittelt. Ein Protein setzt sich aus 20 proteinogenen Aminosäuren zusammen, die OPA-Methode (OPA-VD1/OPA-G1) und die NBD-F-Methode (NBD-F-VD2/NBD-F-G4) in Kombination mit der Proteinhydrolyse HM6-HM9 ermöglichen jedoch nur die zuverlässige Quantifizierung von meist 14 (16) bzw. 12 (15) proteinogenen Aminosäuren. Die Proteinmengen der untersuchten PM2.5-Fractionen wurden daher als BSA-Äquivalente aus den zur Verfügung stehenden Aminosäuredaten berechnet. BSA wurde als Referenz für die Aminosäureanalytik gewählt, weil bereits die Untersuchungen von FRANZE^[10] und Vergleichsmessungen mittels des BCA- und NanoOrange-Assays auf dieses Protein bezogen wurden und damit eine Vergleichbarkeit gewährleistet werden sollte. Die Stoffmengen von Cystin, Methionin, Serin, Threonin und Tyrosin, deren Bestimmung *a priori* mit systematischen methodischen Fehlern behaftet war,

wurden in der Berechnung des Proteingehaltes nicht berücksichtigt. Dies galt ebenfalls für Aminosäuren, die unterhalb der Nachweisgrenzen in den Proben vorlagen.

Die erste Berechnungsmethode bezieht sich auf den Stoffmengenanteil, die zweite Vorgehensweise auf den Massenanteil der in BSA vorkommenden Aminosäuren. Im ersten Fall werden sowohl die in der Realprobe gefundenen Stoffmengen n_{AA} , als auch die in einem BSA-Molekül vorkommende Anzahl A von N quantifizierten Aminosäuren, addiert und das Verhältnis aus beiden Werten mit der Molmasse von BSA multipliziert (*Gleichung 3.2*).

$$m_{\text{Protein, PM2.5}} = \frac{\sum_{AA=1}^N n_{AA, \text{PM2.5}}}{\sum_{AA=1}^N n_{AA, \text{BSA}}} \cdot M_{\text{BSA}}$$

Gleichung 3.2: Berechnung des Proteingehaltes $m_{\text{Protein, PM2.5}}$ als auf den BSA-Stoffmengenanteil bezogene Äquivalentmasse.

Im zweiten Fall wird für die Berechnung der Masse $m_{AA, \text{PM2.5}}$ einer Aminosäure die gefundene Stoffmenge mit der Molmasse multipliziert und aus N Werten die Summe gebildet. Die eingesetzte Molmasse entspricht dabei dem durchschnittlichen Molekulargewicht der Aminosäure in einem Protein, also dem Molekulargewicht der freien Aminosäure abzüglich der Molmasse von Wasser. Die Summe wird anschließend in Relation zu dem Massenanteil $\mu_{AA, \text{BSA}}$ der N Aminosäuren in BSA gesetzt und daraus die BSA-äquivalente Masse ermittelt (*Gleichung 3.3*).

$$m_{\text{Protein, PM2.5}} = \frac{\sum_{AA=1}^N n_{AA, \text{PM2.5}}}{\mu_{AA, \text{BSA}}} \quad \mu_{AA, \text{BSA}} = \left(\frac{\sum_{AA=1}^N m_{AA, \text{BSA}}}{M_{\text{BSA}}} \right)$$

Gleichung 3.3: Berechnung des Proteingehaltes $m_{\text{Protein, PM2.5}}$ als auf den BSA-Massenanteil bezogene Äquivalentmasse.

Beide Methoden der Bestimmung des Proteingehaltes aus Aminosäuredaten werden am Beispiel der PM2.5-Probe IWC05-51 erläutert (*Tabelle 3.21*).

Tabelle 3.21: Übersicht des Proteingehaltes $m_{\text{Protein, IWC05-51}}$ der WSP(>5 kDa)-Fraktion von IWC05-51 ermittelt mit Gleichung 3.2 und Gleichung 3.3.

Berechnung	$\sum_{AA=1}^{11(13)} n_{AA, \text{IWC05-51}}$	$\sum_{AA=1}^{11(13)} m_{AA, \text{IWC05-51}}$	$\sum_{AA=1}^{11(13)} A_{AA, \text{BSA}}$	$\mu_{AA, \text{BSA}}$	$m_{\text{Protein, PM2.5}}$
über	[nmol]	[μg]	-	[%]	[μg]
Stoffmengenanteil	226.6 \pm 12.6	-	432 (74.10%)	-	34.8 \pm 1.9
Massenanteil	-	19.09 \pm 0.74	-	75.39	25.3 \pm 1.0

Der Aminosäuregehalt der WSP(>5 kDa)-Fraktion dieser Probe wurde nach Proteinhydrolyse mit der OPA-Methode ermittelt. Aspartat/Asparagin, Glutamat/Glutamin, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Arginin, Alanin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Lysin wurden quantifiziert und für die Berechnung der BSA-Äquivalentmasse ohne Berücksichtigung von Serin und Threonin herangezogen. Das über den Stoffmengenanteil berechnete BSA-Äquivalent von $34.8 \pm 1.9 \mu\text{g}$ ist um einen Faktor 1.4 höher als der über den Massenanteil bestimmte Wert von $25.3 \pm 1.0 \mu\text{g}$ Protein pro Filter. Dieser Unterschied ist letztlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass die zweite Methode die Stoffmengenverteilung der Aminosäuren in der PM2.5-Probe und ihre individuellen Massen berücksichtigt. Glycin mit einem sehr niedrigen Molekulargewicht ist in der Realprobe verhältnismäßig häufig und im Gegensatz dazu die Aminosäuren mit sehr hohem Molekulargewicht (Histidin, Phenylalanin, Arginin) seltener als in BSA vorzufinden (Abbildung 3.51).

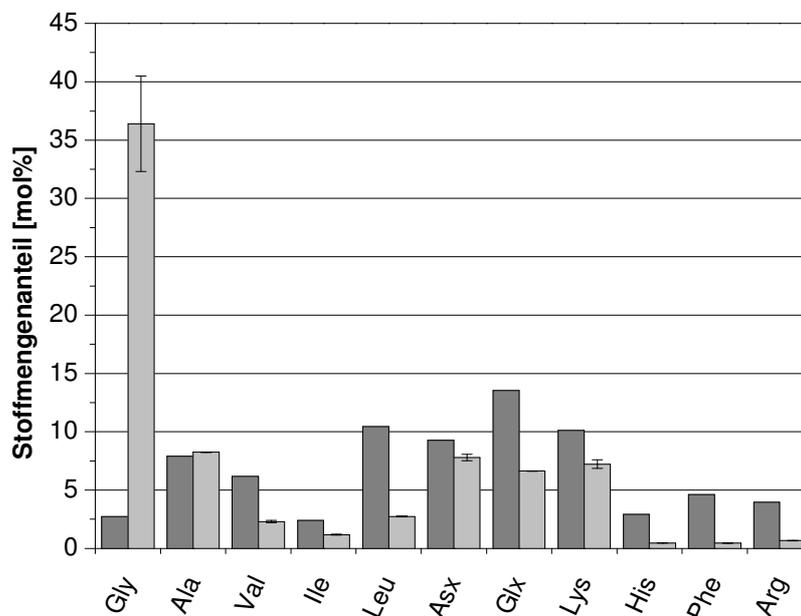


Abbildung 3.51: Aminosäurestoffmengenanteile von BSA (graue Balken) und der WSP(>5 kDa)-Fraktion von IWC05-51 (hellgraue Balken). Der durch die Analyse der 11 (13) Aminosäuren gesamte abgedeckte auf BSA bezogene Stoffmengenanteil beträgt 74.1%. Die Aminosäuren sind in der Reihenfolge ihres aufsteigenden Molekulargewichtes aufgelistet.

Eine alternative Vorgehensweise zur Berechnung des Proteingehaltes stellt folgende Berechnung dar. Die individuellen Stoffmengen von N Aminosäuren der Realproben werden experimentell ermittelt, anschließend aus diesen N verschiedene BSA-äquivalente Stoffmengen bestimmt (Gleichung 3.4).

$$m_{\text{Protein, PM2.5}} = n_{\text{BSA-Äq}} \cdot M_{\text{BSA}} \quad n_{\text{BSA-Äq}} = \frac{n_{\text{AA, PM2.5}}}{A_{\text{AA, BSA}}}$$

Gleichung 3.4: Berechnung von N Proteingehalten $m_{\text{Protein, PM2.5}}$ als BSA-Äquivalentmasse nach experimenteller Bestimmung der Stoffmengen $n_{\text{AA, PM2.5}}$ von N Aminosäuren.

Der Proteingehalt einer Probe wird nach Multiplikation der BSA-äquivalenten Stoffmengen mit der Molmasse von BSA als getrimmter Mittelwert ermittelt (*Abschnitt 3.1.4.3*). In *Tabelle 3.22* sind die nach dieser Methode berechneten 11 Proteingehalte von IWC05-51 dargestellt.

Tabelle 3.22: Bestimmung des Proteingehaltes $m_{\text{Protein, IWC05-51}}$ der WSP(>5 kDa) von IWC05-51 als 25%-getrimmter Mittelwert von $16.6 \pm 5.9 \mu\text{g}$. Fett gedruckte Daten wurden durch die Trimmung eliminiert.

AA	$n_{\text{AA, IWC05-51}}$ [nmol]	$A_{\text{AA, BSA}}$ -	$n_{\text{BSA-Äq}}$ [nmol]	$m_{\text{Protein, IWC05-51.s}}$ [μg]
Gly	111.3	16	6.96	462.02
Ala	25.2	46	0.55	36.35
Asx	23.8	54	0.44	29.28
Lys	22.1	59	0.37	24.88
Ile	3.6	14	0.26	17.08
Glx	20.2	79	0.26	17.01
Val	7.0	36	0.20	13.00
Leu	8.4	61	0.14	9.13
Arg	2.1	23	0.09	5.95
His	1.5	17	0.09	5.75
Phe	1.4	27	0.05	3.50

Die Werte von 3.5 bis 462.0 μg Protein pro Filter spiegeln die bereits in *Abbildung 3.51* gezeigten Unterschiede in der Stoffmengenverteilung von Feinstaubprobe und BSA wider. Es verdeutlicht, dass BSA offensichtlich kein gutes Standardprotein bzgl. seiner Aminosäurezusammensetzung für ein Feinstaubprotein darstellt (*Abschnitt 3.2.5*). Durch die 25 %-Trimmung zur Bestimmung eines gemittelten Proteingehaltes werden die zwei höchsten (Glycin, Alanin) und zwei niedrigsten (Histidin, Phenylalanin) Werte eliminiert, so dass sich ein gemittelter WSP(>5 kDa)-Gehalt von $16.6 \pm 5.9 \mu\text{g}$ der IWC05-51 ergeben würde. Aus dieser Gegenüberstellung der Bestimmung von BSA-Äquivalenten zeigt sich, dass sich der Proteingehalt einer Aerosolprobe je nach Methodik um das 2fache von 16.6 ± 5.9 , 25.3 ± 1.0 und $34.8 \pm 1.9 \mu\text{g}$ unterscheiden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Proteingehalt der untersuchten Proben mittels des BSA-Massenanteils bestimmt.

3.2.3 HPLC-Analyse

3.2.3.1 NBD-F-Vorsäulenderivatisierung

In *Abbildung 3.52* ist eine chromatographische Aminosäuretrennung der WSP(>5 kDa)-Fraktion einer atmosphärischen Feinstaubprobe nach Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol (HM6) und NBD-F-Derivatisierung dargestellt. Mit dieser Methode werden 12 (15) proteinogene Aminosäuren (Histidin, Arginin, Aspartat/Asparagin, Glycin, Glutamat/ Glutamin/Threonin, Alanin, Prolin, Valin, Lysin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin), Norleucin und Methyltyrosin gut von PM2.5-Matrixkomponenten getrennt. Aspartat lässt sich von einer Störkomponente nur bei Verwendung einer neueren C12-RP-Säule trennen. Im Elutionsbereich von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin wurde in den mit dieser Methode untersuchten PM2.5-Proben Coelution beobachtet. Ihre eindeutige quantitative und qualitative Bestimmung in Umweltproben erforderte daher die Anwendung eines anderen HPLC-Gradienten (*Abschnitt 3.3.6.3*).

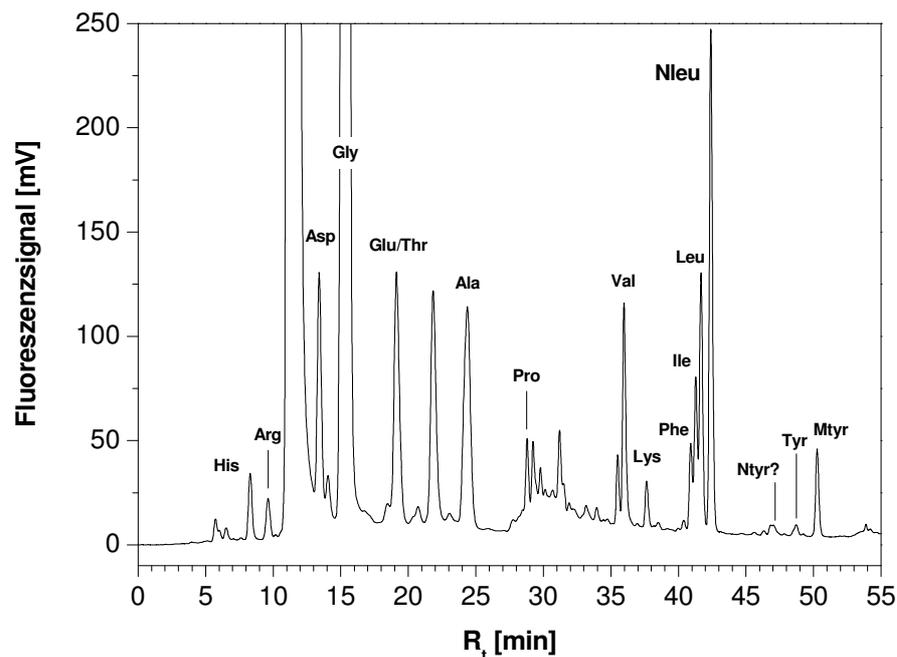


Abbildung 3.52: HPLC-FD-Chromatogramm der WSP(>5 kDa)-Fraktion der PM2.5-Probe MOHP04-31 nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6) mit Norleucin (1 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Extraktion EM1, Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Addition von 1 nmol α -Methyltyrosin und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

3.2.3.2 OPA-Vorsäulenderivatisierung

In folgenden Abbildungen sind HPLC-FD-Chromatogramme eines nichthydrolysierten Extraktes (*Abbildung 3.53*) sowie einer WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktion (*Abbildung 3.54*

und *Abbildung 3.55*) von atmosphärischen Feinstaubproben nach Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol (HM9) und OPA/MPA-Derivatisierung dargestellt. Ein HPLC-FD-Chromatogramm einer TP-Fraktion ist nicht abgebildet worden, da dies keine Unterschiede zu einem Chromatogramm einer WSP-Fraktion zeigte.

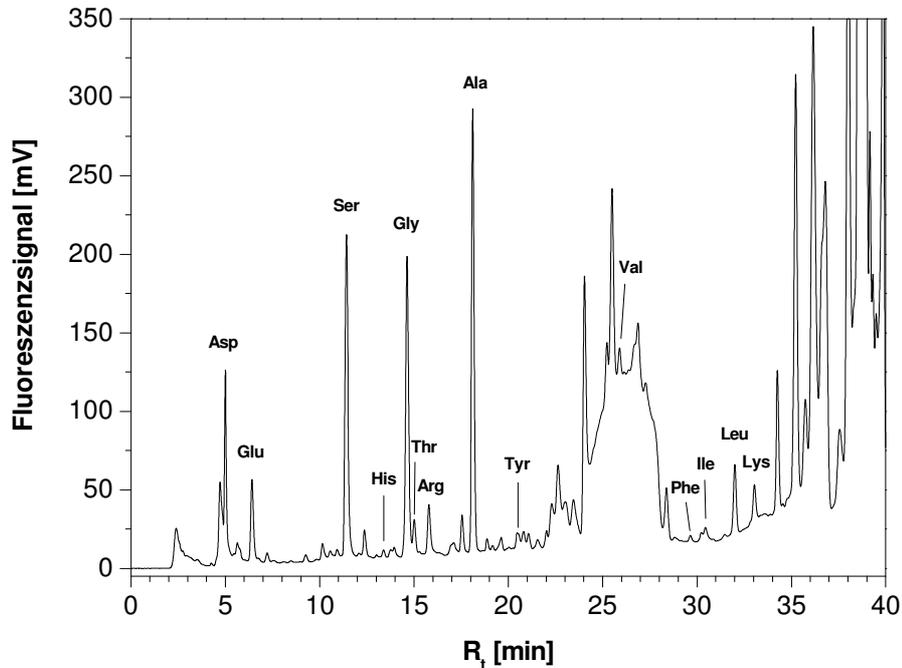


Abbildung 3.53: HPLC-FD-Chromatogramm des nichthydrolysierten PM2.5-Extraktes IWC05-48 ohne internen Standard. Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Extraktion EM2, Verdünnung 1:300 und Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Die Identifizierung von 14 (16) proteinogenen Aminosäuren (Aspartat/Asparagin, Glutamat/ Glutamin, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Arginin, Alanin, Tyrosin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Lysin) ist in den PM2.5-Fractionen möglich. Im R_t -Bereich von Tyrosin jedoch wurde eine partielle Coelution einer Matrixkomponente beobachtet. Tyrosin wurde daher nur in den Fraktionen quantifiziert, in denen die Tyrosin-Peakhöhe das 3fache der Peakhöhe der coeluiierenden Substanz betrug. Eine Trennung von Valin wurde nur bei Verwendung einer neuen Säule erreicht. Isoleucin konnte aufgrund einer Coelution in den nichthydrolysierten Extraktproben nicht bestimmt werden. Im R_t -Bereich von Ornithin wurde in den WSP(>5 kDa)-Fraktionen eine Elution einer Komponente beobachtet. Der entsprechende Peak wurde Ornithin aufgrund einer signifikanten R_t -Abweichung den Standardmessungen und dem Fehlen des zweiten OPA-Ornithin-Peaks nicht zugeordnet.

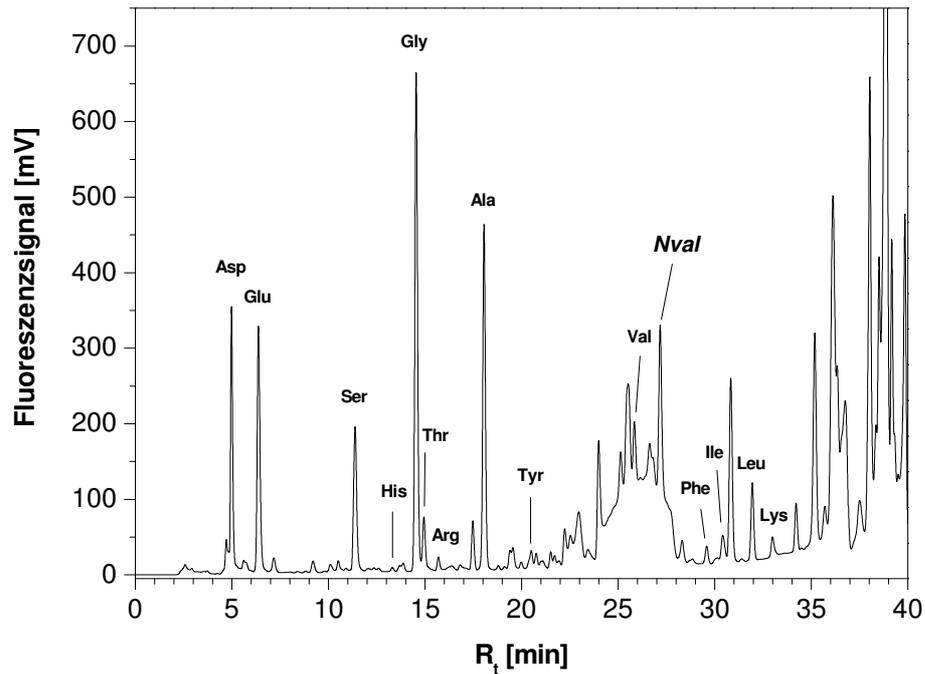


Abbildung 3.54: HPLC-FD-Chromatogramm der WSP-Fraktion der PM2.5-Probe IWC05-51 nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol, 3 mM Ascorbinsäure, 60 min, 5 bar (HM9) mit Norvalin (5 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Extraktion EM2, Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:30 und Derivatisierung OPA-G1 mit Gradient OPA-G1.

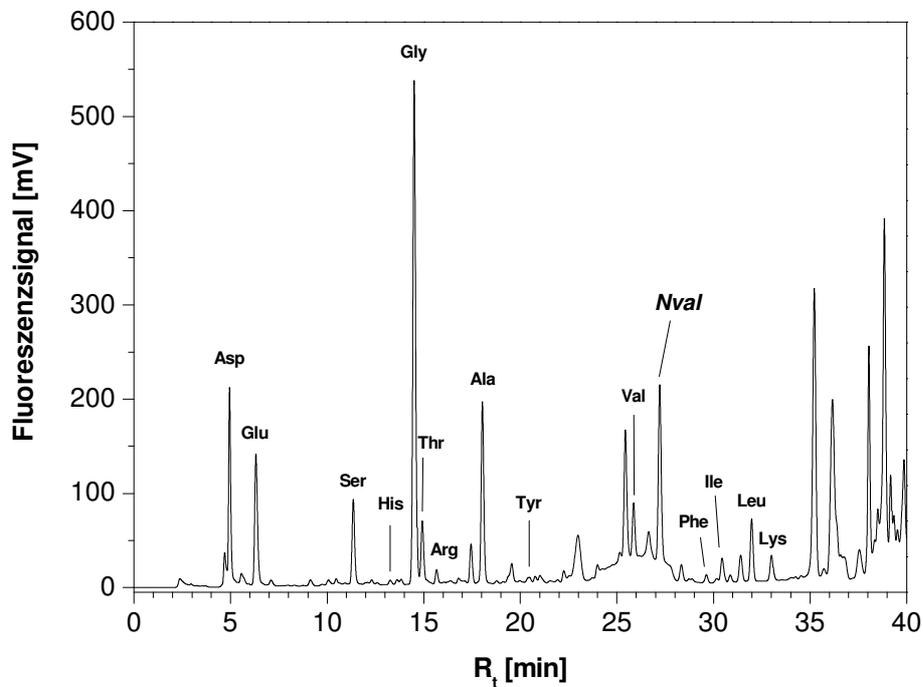


Abbildung 3.55: HPLC-FD-Chromatogramm der WSP(>5 kDa)-Fraktion der PM2.5-Probe IWC05-51 nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol, 3 mM Ascorbinsäure, 60 min, 5 bar (HM9) mit Norvalin (5 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Extraktion EM2, SEC, Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:30 und Derivatisierung OPA-G1 mit Gradient OPA-G1.

In den HPLC-FD-Chromatogrammen der nichthydrolysierten PM_{2.5}-Extrakte und WSP-Fractionen wurde im R_t-Bereich von 24-28 min eine sehr breit von der Säule schmierende Matrixkomponente beobachtet, die zu einem starken Anstieg und plötzlichen Abfall der Basislinie führte.

3.2.3.3 Methodenvergleich

Es wurden zwei WSP(>5 kDa)-Fraktionen von atmosphärischen Feinstaubproben mit der NBD-F- und der OPA/MPA-Vorsäulenderivatisierung analysiert. Diese Proben wurden nach Methode EM1 extrahiert, eine Größenfraktionierung durchgeführt und vor Proteinhydrolyse der WSP(>5 kDa)-Fraktion in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol bei 5 bar für 30 min (HM6) mit dem Hydrolysestandard Norleucin aufgestockt. Das Proteinhydrolysat einer Probe wurde im Anschluss auf dessen CAA- und Proteingehalt mit beiden Methoden untersucht (Tabelle 3.23).

Tabelle 3.23: Vergleich der OPA- (OPA-VD1/OPA-G1) und NBD-F-Methode (NBD-F-VD2/NBD-F-G4) zur Bestimmung von gebundenen Aminosäuren in der WSP(>5 kDa)-Fraktion von atmosphärischen Feinstaubproben.

AA	CAA _{WSP(>5 kDa)} /Filter					
	MOHP04-26			MOHP04-31		
	OPA ⁽¹⁾ [nmol]	NBD-F ⁽¹⁾ [nmol]	Verhältnis ⁽³⁾	OPA ⁽¹⁾ [nmol]	NBD-F ⁽¹⁾ [nmol]	Verhältnis ⁽³⁾
Asx	12.3	4.6	0.4	13.5	10.3	0.8
Glx/Thr	12.9	11.7	0.9	17.1	15.5	0.9
Ser	3.3	-(⁶)	-	3.8	-(⁶)	-
His	0.3	-(⁴)	-	0.6	0.4	0.8
Thr	3.7	-(⁵)	-	3.6	-(⁵)	-
Arg	0.8	1.8	2.2	1.8	2.7	1.5
Ala	9.3	8.0	0.9	10.3	9.7	1.0
Tyr	0.1	-(⁴)	-	0.5	1.4	3.1
Val	1.2	2.1	1.8	4.1	4.9	1.2
Phe	0.4	0.7	1.8	1.5	1.9	1.2
Ile	1.3	1.2	0.9	3.5	2.9	0.8
Leu	0.7 ⁽²⁾	1.8	2.5	4.8 ⁽²⁾	4.9	1.0
Lys	0.4	1.0	2.8	0.4	2.0	4.8
Pro	-(⁶)	1.2	-	-(⁶)	2.3	-

(1) - externe Kalibrierung; (2) - Coelution mit Norleucin, Wert wurde daher unter Annahme der gleichen Response von Nleu und Leu, die experimentell bestätigt wurde, korrigiert; (3) - NBD-F/OPA; (4) - <NWG (NBD-F-HPLC-Methode); (5) - als Glx/Thr; (6) - keine Bestimmung möglich.

Die CAA-Daten von Glutamat/Glutamin/Threonin, Alanin und Isoleucin von MOHP04-26 stimmen gut überein, während die von Aspartat/Asparagin, Histidin, Valin, Phenylalanin, Leucin, Arginin und Lysin deutlich voneinander abweichen. Die Übereinstimmung der gefundenen Stoffmengen in MOHP04-31 ist deutlich besser, signifikante Abweichungen werden in diesem Fall nur bei Arginin, Lysin und Tyrosin beobachtet. Die niedrigen mittels der NBD-F-Methode gefundenen Werte für Aspartat/Asparagin und Histidin können auf eine Kontamination von Metallionen nach *MIYANO* et al.^[129] zurückgeführt werden (*Abschnitt 2.2.3.1*). Die Tyrosinbestimmung kann in beiden Fällen aufgrund der bereits erwähnten Coelution als unsicher betrachtet werden. Der CAA-Wert von Leucin der OPA-Methode wurde korrigiert, da Norleucin als Hydrolysestandard verwendet wurde und dieser mit Leucin in OPA-G1 coeluiert. Die Abweichungen von Lysin und Arginin können teilweise auf die signifikant schlechtere Flächenreproduzierbarkeit dieser Aminosäuren in der NBD-F-Derivatisierung zurückgeführt werden. Die Unterschiede in den CAA-Daten machten sich auch in dem auf den als BSA-Äquivalent berechneten Proteingehalt der Proben bemerkbar. Der mittels OPA-Methode ermittelte Proteingehalt der WSP(>5 kDa)-Fraktion von MOHP04-26 beträgt 1.8 ng/m^3 , während der mit der NBD-F-Methode ermittelte sich auf 1.4 ng/m^3 beläuft. Dies entspricht einer Abweichung von 22 %. Der Proteingehalt von MOHP04-31 wurde nach der OPA-Methode zu 3.2 ng/m^3 bzw. mit der NBD-F-Methode zu 3.0 ng/m^3 mit einer Abweichung von 6 % ermittelt.

3.2.4 Probenvorbereitung

3.2.4.1 Extraktion

Atmosphärische Aerosolpartikel wurden auf Glasfaserfiltern mittels des Hochdurchsatz-Partikelsammlers (High Volume Sampler) Digital DHA80, der mit einem PM2.5-Probenahmekopf ausgestattet wurde, abgeschieden. Im Anschluss wurden Proteine der WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktion wässrig extrahiert. In einem Standardadditionsexperiment sollte überprüft werden, ob sich ein Unterschied in den Proteinwiederfindungen beim Eindampfen der Extrakte unter Druckluft bzw. Stickstoff ergeben. Zwei wässrige PM2.5-Extrakte, die aus 2.3 mg Feinstaub (IWC05-33 und IWC05-34) gemäß EM1 gewonnen wurden, sind hierfür mit 498 μg BSA (Protein/PM2.5 = 22 %) aufgestockt worden. Die Abtrennung des zerkleinerten Filtermaterials und unlöslicher Komponenten erfolgte zuvor über Zentrifugation und Filtration (0.45 μm). Die aufgestockten Extrakte wurden anschließend unter Druckluft bzw. Stickstoff eingedampft. Nach Isolierung der WSP(>5 kDa)-Fraktionen wurden diese in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (HM 9) hydrolysiert. Die mittels Aminosäureanalytik ermittelten BSA-Wiederfindungen belaufen sich nach der

Probenvorbereitung inkl. Eindampfen des Extraktes unter Druckluft bzw. Stickstoff, Proteingrößenfraktionierung und Proteinhydrolyse auf 2.4 ± 0.1 % bzw. 2.2 ± 0.1 % (ca. 11.5 μg BSA). Dieses Ergebnis zeigt, dass kein Einfluss der Eindampfmethode auf die Proteinwiederfindungen gegeben ist, allerdings werden bei Berücksichtigung der Wiederfindungen der Proteingrößenfraktionierung und der Proteinhydrolyse signifikante PM2.5-Matrixinterferenzen während der Extraktion bzw. des Eindampfens deutlich (*Abschnitt 3.2.4.4*).

3.2.4.2 Größenausschlusschromatographie

Die Proteingrößenfraktionierung wässriger PM2.5-Extrakte wurde mit einer PD10-Säule der Fa. Amersham Biosciences durchgeführt. Diese Säulen erlauben eine Gruppenseparation von Proteinen mit einem Molekulargewicht >5 kDa von niedermolekularen Komponenten. Der Hersteller empfiehlt stets einen gewissen Salzgehalt der in der Größenausschlusschromatographie verwendeten Lösungen, um eine Adsorption von Proteinen an die Sephadex-Phase zu vermeiden. Bei Verwendung der empfohlenen 25 mM Natriumchloridlösung würde in der makromolekularen Fraktion eine hohe Salzfracht von 5.8 g NaCl anfallen. Dies würde die nachfolgende Proteinhydrolyse und das Probenhandling stören, so dass Wasser zur Elution der makromolekularen Fraktion verwendet wurde. Zur Bestimmung der Proteinwiederfindung unter diesen Bedingungen wurden jeweils ein wässriger PM2.5-Extrakt, der aus 1.98 mg Feinstaub (MOHP04-25) gemäß EM1 gewonnen wurde, mit 11.9, 119.5 bzw. 557.5 μg BSA (Protein/PM2.5 = 0.6, 6.0 bzw. 28.2 %) aufgestockt und die Größenfraktionierung durchgeführt. Der Proteingehalt der Proben wurde anschließend mit dem BCA-Assay bestimmt. Die BSA-Wiederfindungen sind in *Abbildung 3.56* dargestellt. Im Bereich des gemäß Literatur erwarteten Proteingehaltes von atmosphärischen Aerosolproben (Protein/PM2.5 = 0.6-6.0) ist mit Verlusten von 50-75 % zu rechnen. BSA-Wiederfindungen nach Größenfraktionierung mit PD10-Säulen und PBS-Puffer in Abwesenheit von PM2.5-Matrix wurden auf Werte von 87-115 % bestimmt.^[10]

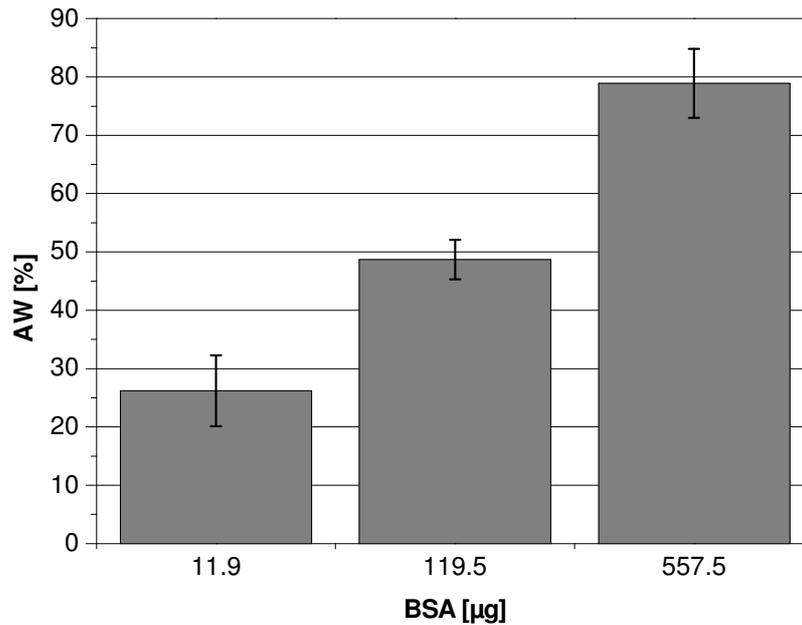


Abbildung 3.56: Aufstockungswiederfindungen (AW) von BSA in PM_{2.5}-Extrakt nach Größenausschlusschromatographie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung im BCA-Assay.

3.2.4.3 Proteinhydrolyse

Um den Einfluss von nieder- und makromolekularen PM_{2.5}-Komponenten auf die Aminosäurewiederfindung während der Proteinhydrolyse abzuschätzen, wurden Standardadditionsexperimente durchgeführt (Tabelle 3.24). WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktionen wurden mit BSA als Standardprotein aufgestockt und der mikrowelleninduzierten Proteinhydrolyse unterzogen. Eine unabhängige Verifizierung der Proteinhydrolyse als Probenvorbereitungsschritt sollte somit gewährleistet werden. Da kein repräsentativer PM_{2.5}-Standard verfügbar war, wurden unterschiedliche Aerosolproben zur Gewinnung der Matrix verwendet. Als Hydrolysemedium wurde eine Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol (HM6) oder 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (HM7, HM8 und HM9) eingesetzt. Das Verhältnis von addiertem Protein zur Gesamtpartikelmasse, aus der die entsprechenden Fraktionen isoliert wurden, lag im oberen ppm- bis unteren %-Bereich. Damit wurde der aus der Literatur bekannte Proteingehalt in atmosphärischen Aerosolpartikeln abgedeckt. Als Kontrolle wurde BSA in Wasser parallel unter gleichen Hydrolysebedingungen zersetzt. Die Aufstockungswiederfindung (AW) von BSA in den Realproben wurde nach Subtraktion des Aminosäuregehaltes der nichtaufgestockten von der aufgestockten Realprobe als 25 %-getrimmter Mittelwert ($M_{t,25}$) berechnet.

Tabelle 3.24: Übersicht der durchgeführten Standardadditionsexperimente. Angegeben sind addierte BSA-Menge, Hydrolysemethode (HM) und Hydrolysezeit (t_H), extrahierte PM2.5-Menge und BSA/PM2.5.

Exp.	BSA [μg]	HM	t_H	Extrakt		Fraktion (>5 kDa)	
				PM2.5 [mg]	BSA/PM2.5 [%]	PM2.5 [mg]	BSA/PM2.5 [%]
A	1, 10, 103	6	30	-	-	3.4	0.03, 0.3, 3.0
B	-, 10, 103	7, 8, 9	30, 45, 60	-	-	1.9	-, 0.5, 5.3
C	1, 11, 103	9	60	3.2	0.03, 0.3, 3.2	6.5	0.02, 0.2, 1.6

Standardaddition von BSA in PM2.5-Matrix (A)

Für die Durchführung von Standardadditionsexperiment **A** wurden wasserlösliche Matrixbestandteile aus 3.4 mg einer atmosphärischen Feinstaubprobe vom Hohenpeißenberg (MOHP04-22) nach wässriger Extraktion (EM1) und Proteinfractionierung isoliert. Die makromolekulare PM2.5-Fraktion wurde mit 1, 10 und 103 μg BSA aufgestockt. Dies entspricht einem BSA/PM2.5-Verhältnis von 0.03, 0.3 und 3.0 %. Die Proben wurden in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol bei 5 bar für 30 min (HM6) hydrolysiert.

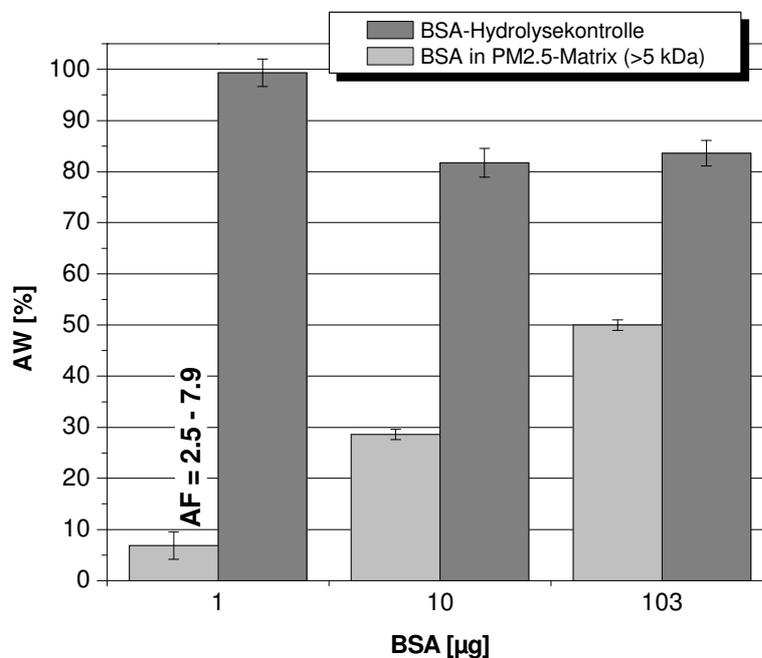


Abbildung 3.57: Aufstockungswiederfindungen (AW) von BSA nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6). BSA-Kontrolle in Wasser (dunkelgraue Balken) und BSA in makromolekularer PM2.5-Matrix (>5 kDa, hellgraue Balken). Dargestellt sind 25 %-getrimmte Mittelwerte ($M_{t,25}$) und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1. AF = Aufstockungsfaktor.

Unter den Hydrolysebedingungen von HM6 zeigt sich ein deutlicher Einfluss der makromolekularen PM2.5-Matrix auf die Wiederfindungen von BSA. Die Kontrollen konnten zu 81.7-99.3 % wiedergewonnen werden (*Abbildung 3.57*). Die Wiederfindungen in den mit 10 und 103 µg BSA aufgestockten Realproben lagen jedoch bei 28.6 und 50.0 %. Bei einem Proteingehalt von 0.03 % in der mit 1 µg BSA aufgestockten PM2.5-Fraktion betrug die Wiederfindung 6.9 %. Der Aufstockungsfaktor (AF) beschreibt in letzterem Fall das Verhältnis der gefundenen Stoffmenge einer Aminosäure in der aufgestockten und der nicht-aufgestockten Probe. In *Tabelle 3.25* sind die AF-Werte der einzelnen Aminosäuren dargestellt. Valin, Lysin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Methionin und Tyrosin mit positiven Aufstockungswiederfindungen von 2-12 % wurden im Vergleich zu der bereits in der Realprobe vorhandenen Menge im Überschuss zugegeben (AF >2). Glycin, Aspartat/Asparagin, Alanin, Glutamat/Glutamin, Serin, Isoleucin, Arginin und Threonin wurden im Unterschuss (AF <2) eingesetzt und zeigen negative Aufstockungswiederfindungen.

Tabelle 3.25: Aminosäurestoffmengen der nichtaufgestockten WSP(>5 kDa)-Fraktion und der in Form von BSA zu ihr addierten Aminosäuren und ihre Aufstockungswiederfindung (AW) in der mit 1 µg BSA aufgestockten WSP(>5 kDa)-Fraktion (Standardadditionsexperiment A). Die Aminosäuren sind nach aufsteigendem Aufstockungsfaktor (AF) in der Tabelle aufgeführt.

AA	Stoffmenge		AF ⁽¹⁾	AW
	BSA (1 µg) [nmol]	MOHP04-22 [nmol]		BSA (1 µg) [%]
Gly	0.29	9.36	1.03	-814 ± 51
Asx	0.98	2.41	1.41	-39 ± 4
Ala	0.83	1.80	1.46	-48 ± 4
Glx	1.43	2.25	1.63	-32 ± 2
Ser	0.51	0.61	1.83	-23 ± 3
Ile	0.25	0.30	1.84	-17 ± 3
Arg	0.42	0.44	1.94	-20 ± 10
Thr	0.61	0.64	1.97	-12 ± 2
Val	0.65	0.41	2.57	2 ± 2
Lys	1.07	0.54	2.99	12 ± 7
Leu	1.10	0.47	3.33	3 ± 1
His	0.31	0.13	3.37	10 ± 1
Phe	0.49	0.15	4.32	5 ± 1
Tyr	0.36	0.05	7.92	8 ± 3
Met	0.07	-	-	-

(1) - Verhältnis der gefundenen Stoffmenge einer Aminosäure in der aufgestockten und der nichtaufgestockten Probe.

Diese Beobachtung spiegelt letztlich die Unsicherheit in der Durchführung der Größenausschlusschromatographie und der Hydrolyse wider. Die Wiederfindung von 1 µg BSA in der makromolekularen PM2.5-Matrix wurde daher aus den Wiederfindungen der erstgenannten Aminosäuren (AF = 2.6-7.9) ermittelt.

Hydrolysekinetik von BSA in PM2.5-Matrix (B)

In Standardadditionsexperiment **B** wurden Proteinwiederfindungen in makromolekularer PM2.5-Matrix nach Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (HM7, HM8 und HM9) bei 5 bar für 30, 45 und 60 min bestimmt. Zur Isolierung wasserlöslicher Matrixbestandteile wurden 1.9 mg atmosphärischer Feinstaub aus München-Großhadern (IWC05-33 und IWC05-34) wässrig extrahiert (EM1) und der Extrakt größenfraktioniert. Die WSP(>5 kDa)-Fraktionen wurden entsprechend einem BSA/PM2.5-Verhältnis von 0.5 und 5.3 % mit 10 und 103 µg BSA aufgestockt. Unter den Bedingungen von HM7, HM8 und HM9 ist ein Einfluss der makromolekularen PM2.5-Matrix auf die Proteinwiederfindungen entscheidend geringer als unter den Bedingungen von HM6 (Standardadditionsexperiment **A**). Die Wiederfindungen der Kontrollproben (102 µg BSA in Wasser) belaufen sich auf 84.1-85.7 % (Abbildung 3.58).

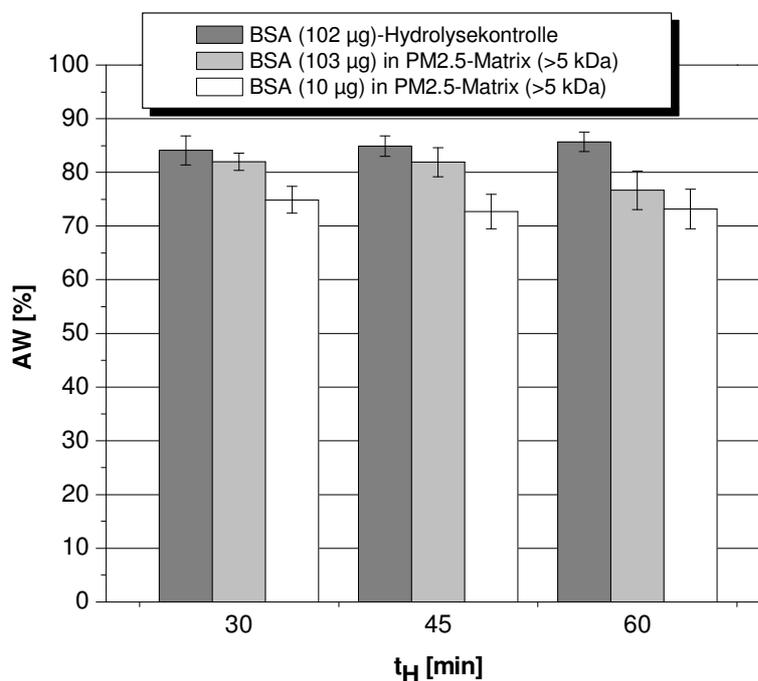


Abbildung 3.58: Aufstockungswiederfindungen (AW) von BSA nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9). BSA-Kontrolle in Wasser (102 µg, dunkelgraue Balken) und BSA in makromolekularer PM2.5-Matrix (>5 kDa; 103 µg, hellgraue Balken; 10 µg, weiße Balken). Dargestellt sind 25 %-getrimmte Mittelwerte ($M_{t,25}$) und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Die Wiederfindung von 103 und 10 µg BSA in Anwesenheit der PM_{2.5}-Matrix beträgt 76.7-82.0 % bzw. 72.7-74.9 %. Diese fallen somit deutlich höher aus als die Wiederfindungen in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol (HM 6). Eine Hydrolysezeitabhängigkeit der Proteinwiederfindungen ist im Rahmen der Standardabweichungen nicht gegeben. Die Tendenz einer Konzentrationsabhängigkeit jedoch ist aus der Darstellung ersichtlich. Im Vergleich zu Standardadditionsexperiment **A** ist diese weniger ausgeprägt. Eine unmittelbare Vergleichbarkeit ist allerdings nicht gegeben, da die Matrix von Aerosolpartikeln unterschiedlicher Probenahmeorte verwendet wurde und mit einer naturgemäßen Variabilität der chemischen Zusammensetzung zu rechnen ist. Ein repräsentativer PM_{2.5}-Standard ist nicht verfügbar gewesen. Die Zeitabhängigkeit der individuellen Aminosäurewiederfindungen von BSA in PM_{2.5}-Matrix ist im Gegensatz zu den BSA-Kontrollen, die in *Abschnitt 3.1.4.8* diskutiert wurden, mit Ausnahme von Glycin, Valin, Serin und Threonin indifferent (*Tabelle 6.2* und *Tabelle 6.3*). Die zu Alanin relativen Glycin-, Serin- und Threoninwiederfindungen nehmen mit zunehmender Hydrolysezeit und abnehmender Konzentration signifikant ab, während die von Valin zunimmt. In *Abbildung 3.59* ist die hydrolysezeitabhängige Proteinwiederfindung der nichtaufgestockten Feinstaubprobe dargestellt.

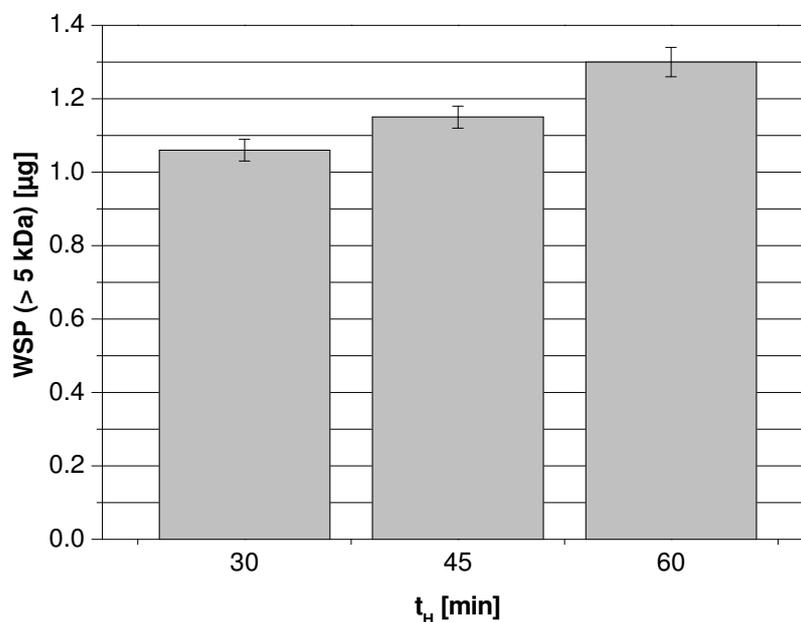


Abbildung 3.59: Wasserlösliches Protein (WSP(>5 kDa)) in 1.9 mg PM_{2.5} (IWC05-33 und IWC05-34) nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 30, 45 und 60 min, 5 bar (HM7, HM8 und HM9). Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Der Proteingehalt steigt signifikant von 1.06 auf 1.30 µg nach 30-60 min an und beträgt nach 90 min rund 0.07 % der Gesamtpartikelmasse. Die Aminosäurekinetikprofile der nichtaufge-

stockten Realproben zeigen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Zeitabhängigkeit (*Tabelle 6.4*). Die Wiederfindungen der Aminosäuren inkl. Serin und Threonin steigen im Rahmen der Wiederholpräzision der HPLC-Doppelbestimmung mit zunehmender Hydrolysezeit an.

Standardaddition von BSA in PM2.5-Matrix (C)

In Standardadditionsexperiment **C** wurde die Bestimmung von Proteinwiederfindungen nach Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (HM9) für 60 min auf die WSP-Fraktion von PM2.5 ausgeweitet. Zur Isolierung wasserlöslicher nieder- und makromolekularer Matrixbestandteile wurde atmosphärischer Feinstaub aus München-Großhadern (IWC05-50) wässrig extrahiert (EM2) und ein Teil des Extraktes größenfraktioniert. Die WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktion wurde aus 3.2 bzw. 6.5 mg der Aerosolpartikel gewonnen und entsprechend einem BSA/PM2.5-Verhältnis von 0.03, 0.3 und 3.2 % bzw. 0.02, 0.2 und 1.6 % mit 1, 11 und 103 µg BSA aufgestockt. Die Wiederfindungen der BSA-Kontrollen und von 11 und 103 µg BSA in makromolekularer PM2.5-Matrix bestätigen die Ergebnisse des Standardadditionsexperimentes **B** (*Abbildung 3.60*).

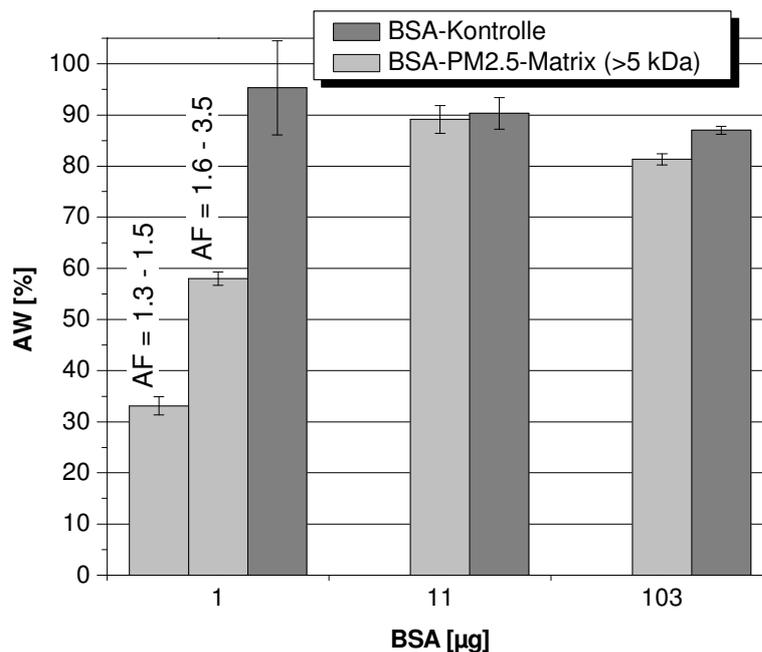


Abbildung 3.60: Aufstockungswiederfindungen (AW) von BSA nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 60 min, 5 bar (HM9). BSA-Kontrolle in Wasser (dunkelgraue Balken) und BSA in makromolekularer PM2.5-Matrix (>5 kDa, graue Balken). BSA/PM2.5: 0.02 (1 µg BSA), 0.2 (11 µg BSA) und 1.6 % (103 µg BSA). Dargestellt sind 25 %-getrimmte Mittelwerte ($M_{t,25}$) und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Die Wiederfindungen von 1 µg BSA wurden entsprechend des Aufstockungsfaktors berechnet. Glutamat/Glutamin, Valin, Arginin, Histidin, Leucin und Phenylalanin (AF = 1.6-

3.5) konnten im Mittel zu 58.8 % und Alanin, Aspartat/Asparagin, Serin, Isoleucin, Threonin und Lysin (AF = 1.3-1.5) zu 33.1 % wiedergewonnen werden. Glycin (AF = 1.02) wurde als einzige Aminosäure um den Faktor 6.4 unterbestimmt (Tabelle 3.26).

Tabelle 3.26: Aminosäurestoffmengen der nichtaufgestockten WSP(>5 kDa)-Fraktion und der in Form von BSA zu ihr addierten Aminosäuren und ihre Aufstockungswiederfindung (AW) in der mit 1 µg BSA aufgestockten WSP(>5 kDa)-Fraktion (Standardadditionsexperiment C). Die Aminosäuren sind nach aufsteigendem Aufstockungsfaktor (AF) in der Tabelle aufgeführt.

AA	Stoffmenge		AF ⁽¹⁾	AW
	BSA (1 µg) [nmol]	IWC05-50 [nmol]		
Gly	0.29	13.06	1.02	-640 ± 30
Ala	0.83	3.15	1.26	30 ± 3
Asx	0.97	3.20	1.30	35 ± 5
Ser	0.50	1.24	1.41	8 ± 24
Ile	0.25	0.57	1.44	34 ± 3
Thr	0.61	1.28	1.48	33 ± 3
Lys	1.06	2.20	1.48	34 ± 7
Glx	1.42	2.56	1.55	61 ± 3
Val	0.65	0.91	1.71	64 ± 7
Arg	0.40	0.41	2.04	58 ± 3
His	0.31	0.27	2.15	49 ± 10
Leu	1.10	0.93	2.18	59 ± 1
Phe	0.49	0.19	3.50	57 ± 3
Met	0.07	-	-	-
Tyr	0.36	-	-	-

(1) - Verhältnis der gefundenen Stoffmenge einer Aminosäure in der aufgestockten und der nichtaufgestockten Probe.

Die Wiederfindungen von 10 und 103 µg BSA der aufgestockten WSP-Fractionen decken sich mit Werten von 79.7 und 92.6 % mit dem Wiederfindungsbereich der BSA-Kontrollen (Abbildung 3.61). Die Wiederfindung von 1 µg BSA von 77.5 % wurde aus den Wiederfindungen von Leucin, Arginin, Histidin und Phenylalanin (RGS = 0.6-1.0) ermittelt und ist im Vergleich zu der Wiederfindung in der makromolekularen PM2.5-Matrix von 33.1 % (AF = 1.3-1.5) um mehr als das 2fache höher (Tabelle 3.27).

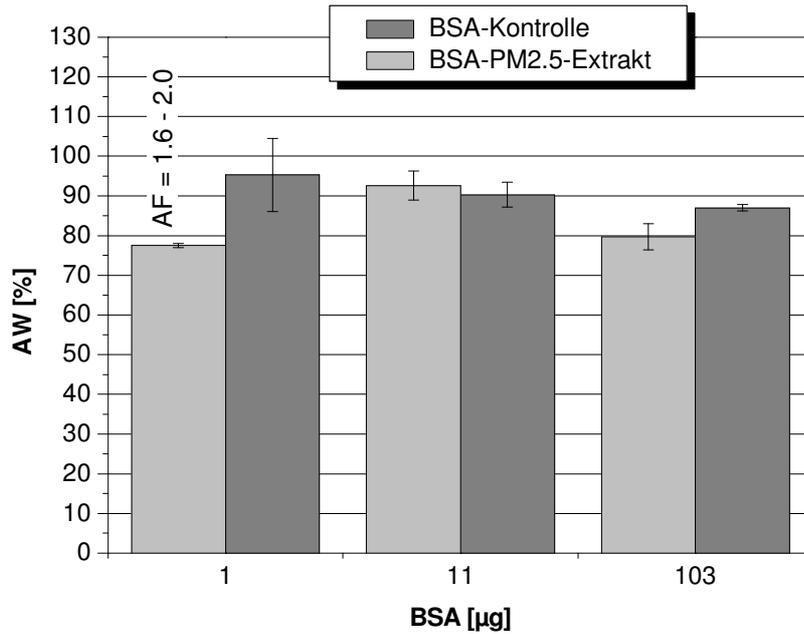


Abbildung 3.61: Proteinwiederfindungen nach Hydrolyse in 6 M HCl. 10 % (w/v) TFA. 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure, 60 min, 5 bar (HM9). BSA-Kontrolle in Wasser (dunkelgraue Balken) und BSA in PM2.5-Extrakt (graue Balken). Dargestellt sind 25 %-getrimmte Mittelwerte ($M_{t,25}$) und Standardabweichungen der Aminosäurewiederfindungen. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Die Wiederfindungen der Aminosäuren mit einem AF-Wert von 1.2-1.4 (Tyrosin, Glutamat/Glutamin, Isoleucin, Threonin und Lysin) sind ebenfalls positiv, streuen jedoch stärker als die der Aminosäuren mit einem entsprechenden Aufstockungsfaktor von 1.3-1.5, die zu der makromolekularen PM2.5-Fraktion addiert wurden.

Tabelle 3.27: Aminosäurestoffmengen der nichtaufgestockten WSP-Fraktion und der in Form von BSA zu ihr addierten Aminosäuren und ihre Aufstockungswiederfindung (AW) in der mit 1 µg BSA aufgestockten WSP-Fraktion (Standardadditionsexperiment C). Die Aminosäuren sind nach aufsteigendem Aufstockungsfaktor (AF) in der Tabelle aufgeführt.

AA	Stoffmenge		AF	AW BSA (1 µg) [%]
	BSA (1 µg) [nmol]	IWC05-50 [nmol]		
Gly	0.29	39.64	1.01	-2077 ± 800
Ala	0.83	10.73	1.08	-103 ± 52
Ser	0.50	5.29	1.10	-551 ± 174
Asx	0.97	7.08	1.14	-26 ± 27
Tyr	0.36	2.07	1.17	129 ± 7
Glx	1.42	6.83	1.21	6 ± 12
Ile	0.25	0.92	1.27	125 ± 10
Thr	0.61	1.76	1.35	49 ± 20
Lys	1.06	2.94	1.36	13 ± 55
Val	0.65	1.27	1.51	-
Leu	1.10	1.71	1.64	87 ± 3
Arg	0.41	0.64	1.65	78 ± 8
His	0.31	0.43	1.71	64 ± 8
Phe	0.49	0.50	1.96	77 ± 5
Met	0.07	-	-	-

3.2.4.4 Diskussion

Die durchgeführten Standardadditionsexperimente zur Validierung der Extraktion bzw. des Eindampfens von Extrakten atmosphärischer Feinstaubpartikel, der Größenausschlusschromatographie und der Proteinhydrolyse zeigen die kritischen Stufen der Probenvorbereitung auf. Unter Berücksichtigung der Proteinwiederfindungen der Größenfraktionierung von ca. 25 % (Abschnitt 3.2.4.2) und der Hydrolyse von ca. 85 % (Standardadditionsexperiment C, Abschnitt 3.2.4.3) können aus dem in Abschnitt 3.2.4.1 beschriebenen Standardadditionsexperiment rund 89 % des gesamten Proteinverlustes auf Wechselwirkungen von Protein mit wasserlöslicher PM2.5-Matrix und auf Adsorptionseffekte mit Oberflächen von Laborgeräten während des Eindampfens und Wiederaufnehmens eines Extraktes zurückgeführt werden. Die Wiederfindung von 498 µg BSA beträgt nach dieser Abschätzung 10.8 % (Abbildung 3.62).

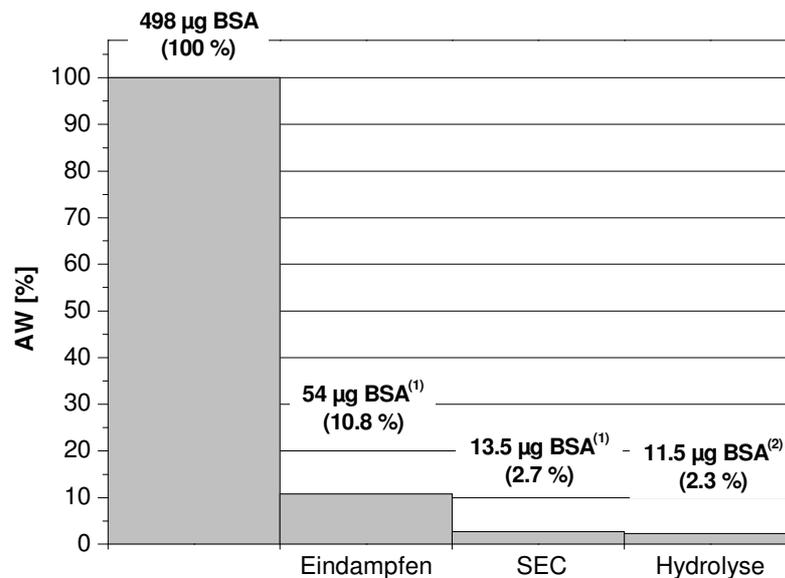


Abbildung 3.62: Aufstockungswiederfindungen (AW) von 498 µg BSA in einem aufgestockten PM2.5-Extrakt (EM1) nach Eindampfen (Abschnitt 3.2.4.1), Größenausschlusschromatographie (Abschnitt 3.2.4.2) und Proteinhydrolyse (HM9, Abschnitt 3.2.4.3). (1) - aus Standardadditionsexperiment abgeschätzt, (2) - mittels OPA-HPLC-Analyse ermittelt.

FRANZE^[10] hat in Standardadditionsexperimenten eine ähnliche Beobachtung gemacht. Es wurden 20, 50, 100, 200 und 600 µg BSA auf Glasfaserfilter pipettiert und Wiederfindungen von jeweils 8, 16, 20, 37 und 46 % ermittelt. In den analysierten Feinstaubproben wurde ein absoluter Proteingehalt von 50-200 µg nach einem zu EM1 analogen Extraktionsverfahren in PBS-Puffer (pH = 7.4) mittels BCA-Assay ermittelt. Die Anwesenheit von Matrixkomponenten jedoch hatte dabei nach Aussagen des Autors keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis. Die Abklärung der beobachteten Effekte von Filtermaterial und PM2.5-Matrix während der Extraktion und des Eindampfens erfordert daher weitere systematische Untersuchungen auf Basis des Standardadditionsverfahrens. Die folgenden Erläuterungen sollen die Aufmerksamkeit auf mögliche Interaktionen von Proteinen mit PM2.5-Komponenten fokussieren. Aus der Lebensmittelanalytik sind kovalente und nichtkovalente Wechselwirkungen von Pflanzen(poly-)phenolen mit Proteinen hinreichend bekannt.^[176,332-334] Zu den Pflanzenphenolen zählen Hydroxybenzoesäuren mit C₆-C₁-, Hydroxyzimtsäuren mit C₆-C₃- und Flavonoide (Flavone, Isoflavone, Flavonole usw.) mit C₆-C₃-C₆-Grundkörper. Pflanzenphenole enthalten u. a. *o*- und *p*-Diphenol-Struktureinheiten als Vorläufer chinoider Systeme und 2-Methoxy- und 2-,3-Dimethoxyphenolstrukturen (Guajacyl- und Syringyl-Typ). Chinoide Systeme reagieren leicht mit nukleophilen Seitenketten von Cystein, Methionin und Lysin (Thiol- und Aminogruppen) in Proteinen unter Ausbildung von kovalenten Bindungen. Radikalische Reaktionswege wurden für die Guajacyleinheiten als möglicher Interaktionsmechanismus vorgeschlagen.^[332] Die Interaktionen von Pflanzenphenolen mit Proteinen modifizieren Seitenketten von Aminosäuren, ändern ihre Sekundär- und

Tertiärstruktur und bilden schwerlösliche, kolloidale Pflanzenphenol-Protein-Komplexe.^[334] Die Isolierung von Enzymen aus Pflanzen wird durch diese Wechselwirkungen erheblich erschwert.^[335] In atmosphärischen Aerosolpartikeln sind Lignin, dessen Pyrolyseprodukte, Lignane und HULIS pflanzlicher Herkunft und besitzen vergleichbare strukturelle Eigenschaften wie genannte (Poly-)Phenole. HULIS enthalten phenolische und chinoiden Systeme. Bei der Verbrennung von Lignin entstehen aromatische Derivate des Guajacyl- und Syringyl-Typs mit aliphatischen Substituenten und reaktiven Aldehyd-, Carboxyl-, Alkyl- und Alkanonseitenketten.^[26] *p*-Hydroxybenzoesäure und *p*-Hydroxybenzaldehyd sind ebenfalls ein wesentlicher Bestandteil von Gräserrauch. Lignane sind Dimere von *p*-Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohole, die ähnlich wie Flavonoide aus zwei aromatischen Systemen (C₆-C_x-C₆-Grundkörper) aufgebaut sind und Guajacyl- und Syringylstrukturen besitzen. Elementarer Kohlenstoff (Ruß) besitzt eine hohe spezifische Oberfläche und kann Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen binden. Zur Reduzierung der beschriebenen Effekte können Additive, die in der Lage sind phenolische Verbindungen zu absorbieren, zu den Extrakten gegeben werden. Prinzipiell kommen hier Polyvinylpyrrolidon (PVPP), Polystyrol- (XAD-4) oder Anionenaustauscherharze (AG1-X8, AG2-X8) in Frage.^[335-337] Die Oxidation von *o*- und *p*-Diphenolen zu reaktiven Chinonen lässt sich durch Zugabe von Ascorbinsäure verhindern.^[337,338] Dieser Effekt konnte auch im Rahmen der Standardadditionsexperimente der Proteinhydrolyse beobachtet werden. Die Zugabe von 3 mM Ascorbinsäure und die Erhöhung der Phenolkonzentration im Hydrolysemedium erhöhten die BSA-Wiederfindungen in WSP(>5 kDa)-Fraktionen von PM2.5-Proben um das 2-3fache. Eine Verbesserung der moderaten Proteinwiederfindungen der mit Wasser durchgeführten Größenfraktionierung könnte durch die Verwendung von leichtflüchtigen Puffersalzen wie z. B. Ammoniumhydrogencarbonat oder einem Puffersystem aus Ammoniak und Ameisensäure erzielt werden. Die Salzfracht in den Proben würde durch das Verdampfen des Puffersalzes beim Eindampfen der makromolekularen Fraktion minimiert und eine Kompatibilität mit der Proteinhydrolyse gewährleistet werden.

3.2.5 Atmosphärischer Feinstaub Hohenpeißenberg

3.2.5.1 Überblick

In *Tabelle 6.5* und *Tabelle 6.7* sind atmosphärische PM_{2.5}-Konzentrationen des Probenahmeortes Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg (MOHP) der Jahre 2003 und 2004 aufgelistet. 22 Blindfilter und 42 mit PM_{2.5} belegte Realfilter des Jahres 2003 wurden nach der Extraktions- und Größenfraktionierungsmethode von *FRANZE*^[10] in PBS-Puffer behandelt und deren Proteingehalt als BSA-Äquivalent mittels BCA-Assay ermittelt. Außerdem wurden 6 Blindfilter und 14 beströmte PM_{2.5}-Realfilter des Jahres 2004 auf ihren Proteingehalt sowohl mit Mitteln der Aminosäureanalytik als auch des BCA-Assays analysiert (*Tabelle 3.28* und *Tabelle 3.29*).

Tabelle 3.28: Sechs auf ihren WSP(>5 kDa)-Gehalt untersuchte Blindfilter. Probenahmeort: Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg (MOHP), Probenahmejahr: 2004.

PM _{2.5} -Probe	Zeitraum am Probenahmeort	Tage am Probenahmeort	Beladung/Filter [mg]
MOHP04 - B01	15.01.04 - 04.02.04	20	-0.01
MOHP04 - B04	04.02.04 - 18.02.04	14	0.15
MOHP04 - B05	18.02.04 - 05.03.04	16	0.46
MOHP04 - B11	02.04.04 - 22.04.04	20	0.34
MOHP04 - B13	22.04.04 - 05.05.04	13	0.23
MOHP04 - B22	01.07.04 - 14.07.04	13	0.43

Die letztgenannten Filter wurden wässrig extrahiert (EM1) und anschließend die WSP(>5 kDa)-Fraktion nach Größenausschlusschromatographie isoliert. Die Proteinfraction wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol bei 5 bar für 30 min (HM6) in der *Mars5*-Mikrowelle hydrolysiert. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit HPLC-Gradient OPA-G1. Es wurden jeden Monat des Jahres mit Ausnahme des Monats Juni atmosphärische Partikel analysiert. Die Blindfilter hingegen decken nur den Zeitraum bis Juli 2004 mit Ausnahme der Monate Mai und Juni ab. 5 der 6 Blindfilter zeigen eine Massenzunahme, die auf eine Belegung von Partikeln während der Probenahme aufgrund der Handhabung (Wägung, Transport, Lagerung etc.) der Filter zurückzuführen sind.

Tabelle 3.29: 14 auf ihren WSP(>5 kDa)-Gehalt untersuchte PM2.5-Glasfaserfilter. Probenahmeort: Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg (MOHP), Probenahmejahr: 2004. V_n = Probenahmevolumen.

PM2.5-Probe	Probenahme	V_n [m ³]	PM2.5/Filter [mg]	PM2.5 [µg/m ³]
MOHP04-01	04.01.04 - 09.01.04	3208.4	11.1	3.5
MOHP04-07	08.02.04 - 13.02.04	3235.9	20.1	6.2
MOHP04-12	04.03.04 - 09.03.04	3207.9	66.2	20.6
MOHP04-14	14.03.04 - 19.03.04	3157.0	24.1	7.6
MOHP04-19	08.04.04 - 13.04.04	3196.6	32.2	10.1
MOHP04-22	23.04.04 - 28.04.04	3171.4	33.9	10.7
MOHP04-26	13.05.04 - 18.05.04	3175.0	25.0	7.9
MOHP04-34	02.07.04 - 07.07.04	3139.0	16.9	5.4
MOHP04-37	17.07.04 - 22.07.04	3102.9	31.8	10.2
MOHP04-40	06.08.04 - 11.08.04	3095.5	45.0	14.5
MOHP04-46	05.09.04 - 10.09.04	3138.7	38.6	12.3
MOHP04-52	05.10.04 - 10.10.04	3124.6	26.0	8.3
MOHP04-58	09.11.04 - 14.11.04	3206.8	28.2	8.8
MOHP04-64	09.12.04 - 14.12.04	3173.8	18.0	5.7

3.2.5.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die auf den Blindfiltern der MOHP 2004-Messserie gefundene Proteinmenge betrug bis zu 4.4 µg (Tabelle 3.30). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Analyseverfahrens liegen bei 6.6 und 14.5 µg WSP(>5 kDa)/Filter bzw. 2.1 und 4.6 ng/m³ ($V_n = 3166.7$ m³). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Blindfilter unterschiedlich lange an den Probenahmeorten (13-20 d) im Partikelsammler aufbewahrt wurden. Eine Korrelation zwischen gefundenem Protein und Anzahl der Tage am Probenahmeort wurde nicht festgestellt.

Tabelle 3.30: WSP(>5 kDa)-Gehalt, Mittelwert und Standardabweichung der untersuchten Blindfilter (MOHP 2004) nach Aminosäureanalytik. Die NWG und BG der Analyse wurden mit der Blindwertmethode ermittelt.

PM2.5-Probe	WSP(AAA)/Filter [µg]	Mittelwert [µg]	NWG [µg]	BG [µg]
MOHP04 - B01	2.24			
MOHP04 - B04	4.14			
MOHP04 - B05	2.87	3.22±1.12	6.58	14.44
MOHP04 - B11	4.36			
MOHP04 - B13	4.02			
MOHP04 - B22	1.66			

3.2.5.3 WSP(>5 kDa)-Gehalt

In *Tabelle 3.31* und *Tabelle 3.32* sind die mittels der Aminosäure- und der BCA-Analytik bestimmten atmosphärischen WSP(>5 kDa)-Konzentrationen und der WSP(>5 kDa)-Anteil an der Gesamtaerosolpartikelmasse tabelliert. 10 der 14 untersuchten PM2.5-Filter liegen über der NWG und nur 4 über der BG. Die durchschnittliche atmosphärische WSP(>5 kDa)-Konzentration beläuft sich gemäß Aminosäureanalytik auf $5.0 \pm 2.1 \text{ ng/m}^3$ ($2.8\text{-}8.8 \text{ ng/m}^3$, $N = 10$) entsprechend einer Proteinfraction von $0.05 \pm 0.02 \%$ ($0.02\text{-}0.08 \%$) in PM2.5. Der BCA-Assay ermittelt einen signifikant höheren Proteingehalt von $269 \pm 110 \text{ ng/m}^3$ ($120\text{-}463 \text{ ng/m}^3$, $N = 9$) entsprechend einer Proteinfraction von $2.8 \pm 0.7 \%$ ($1.5\text{-}3.8 \%$) der Gesamtpartikelmasse. Das Verhältnis $\text{WSP}_{\text{AAA}}(>5 \text{ kDa})/\text{WSP}_{\text{BCA}}(>5 \text{ kDa})$ von sieben PM2.5-Proben beträgt durchschnittlich $1.9 \pm 0.5 \%$ ($1.6\text{-}2.8 \%$, 53fache Überbestimmung mit BCA gegenüber AAA). Diese Werte sind jedoch durch das Hydrolyseartefakt fehlerbehaftet (*Abschnitt 3.2.4.3*).

Tabelle 3.31: WSP(>5 kDa)-Gehalt der untersuchten PM2.5-Realfilter nach Aminosäureanalytik und BCA-Assay. Angegeben sind Werte einer HPLC-Einzel- bzw. - sofern durchgeführt - Mittelwert und Standardabweichung einer HPLC-Doppelbestimmung (Aminosäureanalytik) oder Mittelwert und Standardabweichung einer Dreifachbestimmung (BCA-Assay). Fett gedruckte Proben liegen über der NWG.

PM2.5-Probe	WSP _{AAA} (>5 kDa) /Filter [µg]	WSP _{AAA} (>5 kDa) [ng/m ³]	WSP _{BCA} (>5 kDa) [ng/m ³]	WSP _{AAA} (>5 kDa) /WSP _{BCA} (>5 kDa) [%]
MOHP04-01	3.9 ± 0.1	1.2 ± 0.0	81.2 ± 4.7	1.5
MOHP04-07	4.4 ± 0.1	1.4 ± 0.0	107.0 ± 0.0	1.3
MOHP04-12	11.4	3.5	-	-
MOHP04-14	10.4	3.3	-	-
MOHP04-19	9.6 ± 0.2	3.0 ± 0.1	286.8 ± 1.8	1.1
MOHP04-22	27.4 ± 0.8	8.8 ± 0.2	313.6 ± 1.3	2.8
MOHP04-26	12.7	4.1	-	-
MOHP04-34	6.4	2.0	120.3 ± 1.1	1.7
MOHP04-37	18.8 ± 0.3	6.1 ± 0.1	280.3 ± 0.9	2.2
MOHP04-40	21.6	7.0	374.7 ± 11.9	1.9
MOHP04-46	23.3	7.4	463.4 ± 10.5	1.6
MOHP04-52	13.3	4.2	246.0 ± 1.5	1.7
MOHP04-58	8.9	2.8	132.0 ± 4.5	2.1
MOHP04-64	6.0	1.9	199.8 ± 3.0	1.0

Die Proteinwiederfindung lässt sich aus dem Standardadditionsexperiment **A** anhand des ermittelten Verhältnisses WSP_{AAA}(>5 kDa)/PM2.5 der Realproben auf rund 10-30 % abschätzen. Das Verhältnis WSP_{AAA}(>5 kDa)/WSP_{BCA}(>5 kDa) beträgt in diesem Fall 6-19 % (5-16fache Überbestimmung). Weitere Untersuchungen hinsichtlich der beobachteten Überbestimmung durch den BCA-Assay werden in *Abschnitt 3.2.7* dargestellt. Der tatsächliche Proteinanteil WSP_{AAA}(>5 kDa) in den untersuchten atmosphärischen Partikeln kann außerdem unter weiterer Berücksichtigung der Wiederfindungen der Größenfraktionierung (ca. 25 %) und der wässrigen Extraktion (ca. 10 %) aus dem Wert von 0.05±0.02 % (0.02-0.08 %) auf 20±8 % (8-32 %, 10 %ige Hydrolysewiederfindung) bzw. auf 6.0±2.4 % (2.7-10.7 %, 30 %ige Hydrolysewiederfindung) abgeschätzt werden.

Tabelle 3.32: WSP(>5 kDa)-Fraktion in atmosphärischem Feinstaub nach Aminosäureanalytik und BCA-Assay.

PM2.5-Probe	WSP _{BCA} (>5 kDa)/PM2.5 [%]	WSP _{AAA} (>5 kDa)/PM2.5 [%]
MOHP04-01	2.3	0.03
MOHP04-07	1.7	0.02
MOHP04-12	-	0.02
MOHP04-14	-	0.04
MOHP04-19	2.8	0.03
MOHP04-22	2.9	0.08
MOHP04-26	-	0.05
MOHP04-34	2.2	0.04
MOHP04-37	2.7	0.06
MOHP04-40	2.6	0.05
MOHP04-46	3.8	0.06
MOHP04-52	3.0	0.05
MOHP04-58	1.5	0.03
MOHP04-64	3.5	0.03

Die ermittelte atmosphärische WSP_{AAA}(>5 kDa)-Konzentration von $5.0 \pm 2.1 \text{ ng/m}^3$ ($2.8\text{-}8.8 \text{ ng/m}^3$) erhöht sich nach entsprechender Korrektur auf $2.0 \pm 0.8 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ ($1.1\text{-}3.5 \text{ } \mu\text{g/m}^3$, 10 %ige Hydrolysewiederfindung) bzw. $0.60 \pm 0.24 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ ($0.37\text{-}1.17 \text{ } \mu\text{g/m}^3$, 30 %ige Hydrolysewiederfindung). Der abgeschätzte tatsächliche Proteinanteil WSP_{BCA}(>5 kDa) in PM2.5 beläuft sich nach Korrektur der Größenfraktionierung (Wiederfindung ca. 25 %) und der Extraktion (Wiederfindung ca. 10 %) auf $5.6 \pm 1.4 \text{ } \%$ ($3.0\text{-}7.7 \text{ } \%$, 20fache Überbestimmung) bzw. $1.8 \pm 0.5 \text{ } \%$ ($1.0\text{-}2.5 \text{ } \%$, 30fache Überbestimmung). Die Korrekturfaktoren der BCA-Überbestimmung stammen aus *Abschnitt 3.2.7*. Die ermittelte atmosphärische WSP_{BCA}(>5 kDa)-Konzentration von $269 \pm 110 \text{ ng/m}^3$ ($120\text{-}463 \text{ ng/m}^3$) erhöht sich nach entsprechender Korrektur auf $0.54 \pm 0.22 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ ($0.24\text{-}0.93 \text{ } \mu\text{g/m}^3$, 20fache Überbestimmung) bzw. $0.17 \pm 0.07 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ ($0.08\text{-}0.30 \text{ } \mu\text{g/m}^3$, 30fache Überbestimmung). Eine gute Übereinstimmung der mittels Aminosäureanalytik und BCA-Assay ermittelten atmosphärischen Konzentrationen ergeben sich also für die Annahme einer 30 %igen Hydrolysewiederfindung und einer 20fachen Überbestimmung (*Abbildung 3.63*).

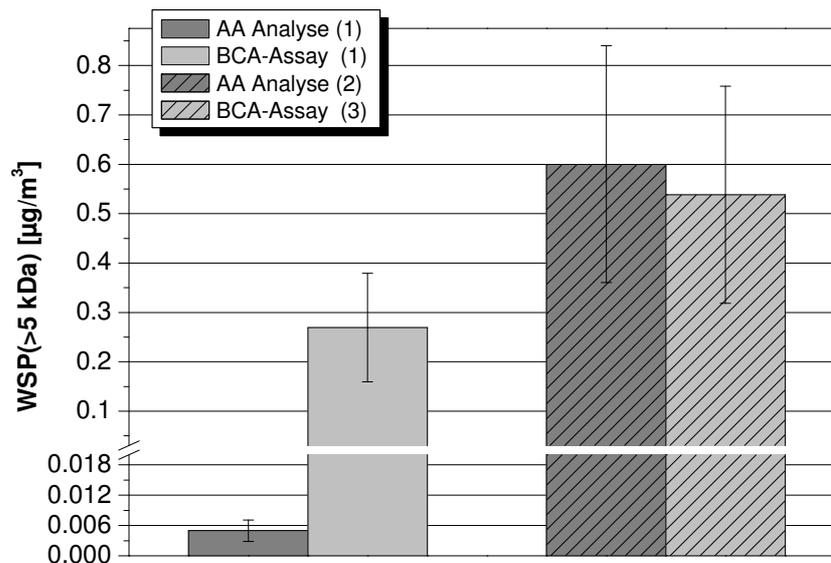


Abbildung 3.63: Abschätzung der durchschnittlichen atmosphärischen $WSP(>5 \text{ kDa})$ -Konzentrationen der atmosphärischen $PM_{2.5}$ -Proben vom Meteorologischen Observatorium Hohenpeißenberg (2004) nach Korrektur der Wiederfindungen der Probenvorbereitung (Aminosäureanalytik) und der Überbestimmung (BCA-Assay). (1) - unkorrigierter Wert, (2) - korrigierter Wert mit Wiederfindungen: Hydrolyse 30 %, SEC 25 %, Extraktion 10 %, (3) - korrigierter Wert mit Wiederfindungen: SEC 25 %, Extraktion 10 % und Überbestimmung: Faktor 20.

In Tabelle 6.8 und Tabelle 6.9 sind die auf den untersuchten Blind- und Realfiltern gefundenen Aminosäurestoffmengen und die aminosäurespezifischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einzeln tabelliert. Der Proteinanteil $WSP_{BCA}(>5 \text{ kDa})/PM_{2.5}$ der 42 atmosphärischen $PM_{2.5}$ -Proben der MOHP 2003-Messserie liegt durchschnittlich bei $4.3 \pm 1.7 \%$ (2.0-10.5 %, N = 42) bzw. die atmosphärische $WSP_{BCA}(>5 \text{ kDa})$ -Konzentration bei $0.48 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.10 - $1.49 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Diese Werte sind jedoch nicht wie oben beschrieben korrigiert worden (Tabelle 6.5).

3.2.5.4 Aminosäurezusammensetzung

Im Folgenden wird die proteinogene Aminosäureverteilung der $WSP(>5 \text{ kDa})$ -Fraktion von fünf Feinstaubproben (MOHP 2004) erläutert. Der $WSP_{AAA}(>5 \text{ kDa})$ -Gehalt dieser Proben mit Ausnahme von MOHP04-52 liegt über der entsprechenden BG von $14.4 \mu\text{g}$ Protein pro Filter. In Abbildung 3.64 sind alle proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Tryptophan, Cystein, Methionin und Prolin, die durch die Methode nicht erfasst werden, dargestellt. Die Daten sind im Tabelle 6.11 tabelliert.

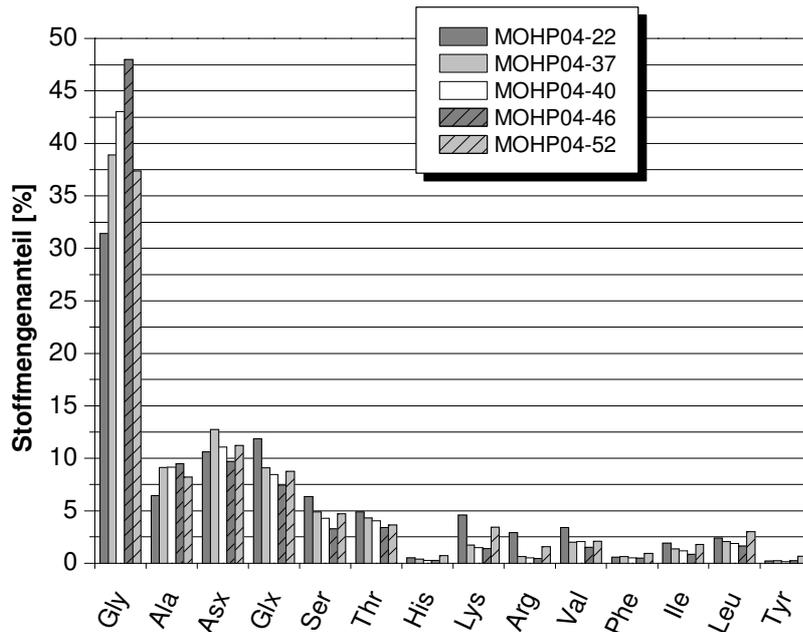


Abbildung 3.64: Stoffmengenanteil proteinogener Aminosäuren der WSP(>5 kDa)-Fraktion atmosphärischer Feinstaubproben (MOHP 2004). Der Gesamtanteil von Tryptophan, Cystein, Methionin und Prolin in PM_{2.5} wurde als BSA-Äquivalent von 11.8 mol% angenommen. Der Gehalt folgender Aminosäuren <Blindfilter-NWG: MOHP04-40: Tyr, MOHP04-46: Ser, Ile; MOHP04-52: Ser.

Die Berechnung der Stoffmengenanteile erfolgte unter der Annahme, dass die Summe der Anteile der letztgenannten Aminosäuren der in BSA von 11.8 mol% entsprechen. Außerdem wurden Aminosäureverluste, die auf die Proteinhydrolyse zurückzuführen sind, korrigiert. Als Korrekturfaktoren wurden die zu Alanin relativen Wiederfindungen der BSA-Hydrolysekontrollen herangezogen (Tabelle 3.16). Die häufigste Aminosäure in der WSP(>5 kDa)-Fraktion ist demnach Glycin mit einem Stoffmengenanteil von 31-48 mol%. Danach folgen Aspartat/Asparagin, Alanin, Glutamat/Glutamin mit je 6-13 mol% und Serin und Threonin mit je 3-6 mol%. Insgesamt tragen diese Aminosäuren 72-81 mol% zu der gesamten Stoffmenge proteinogener Aminosäuren in den untersuchten Proteinfractionen bei (Abbildung 3.65). Tyrosin und Histidin sind Aminosäuren mit der geringsten Häufigkeit von <1.5 mol%. Die unpolaren Aminosäuren dominieren mit einem 46-62 mol%-igen Stoffmengenanteil gegenüber den polaren Aminosäuren (26-42 mol%). Die Gesamtheit der basischen und unpolaren Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Valin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin) besitzen Stoffmengenanteile von je z. T. deutlich unter 10 mol%. Die sauren Aminosäuren Aspartat/Asparagin und Glutamat/Glutamin sind im Vergleich zu den basischen Aminosäuren um den Faktor 2-10 häufiger anzutreffen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchten atmosphärischen Proteine tendenziell saure Eigenschaften besitzen, allerdings ist keine Differenzierung von Aspartat und Glutamat von ihren Säureamiden Asparagin und Glutamin bei Anwendung der sauren Proteinhydrolyse möglich.

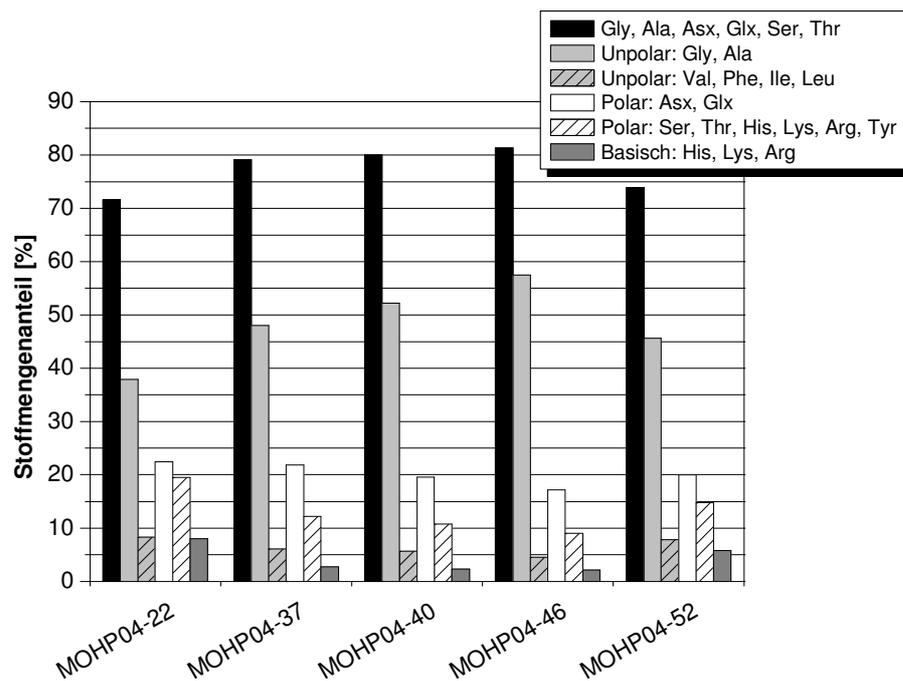


Abbildung 3.65: Stoffmengenanteile der häufigsten, unpolaren, polaren und basischen Aminosäuren der WSP(>5 kDa)-Fraktion atmosphärischer Feinstaubproben (MOHP, 2004). Siehe auch Abbildung 3.64.

In einer Studie von ZHANG et al.^[36] wurde eine ähnliche Verteilung von Aminosäuren in städtischen PM_{2.5}-Proben gefunden. Die häufigsten Aminoverbindungen waren in abnehmender Reihenfolge Serin, Glycin/Threonin, Alanin, Ornithin, Glutamat/Glutamin, Aspartat/Asparagin und Lysin. Ein Unterschied bestand darin, dass die basischen Aminosäuren (inkl. Ornithin) gegenüber den sauren dominierten. Ornithin wurde in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Realproben hingegen nicht gefunden.

Aus den in Abbildung 3.64 dargestellten Aminosäureverteilungen atmosphärischer WSP(>5 kDa)-Fraktionen wurde die Aminosäurezusammensetzung eines durchschnittlichen atmosphärischen WSP(>5 kDa)-Proteins berechnet (Abbildung 3.66, Tabelle 6.12). Das Hauptcharakteristikum der gefundenen Aminosäureverteilung ist - wie bereits erwähnt - der sehr hohe Gehalt von Glycin von 39.8 mol%. Der durchschnittliche Glycingehalt von Proteinen liegt deutlich unter diesem Wert bei 7.2 %.^[197] Die WSP(>5 kDa)-Fraktion der untersuchten Proben wird offensichtlich von Glycin-reichen Proteinen (GRP) dominiert. GRPs sind als strukturelle Komponenten von pflanzlichen Zellwänden bekannt. Sie besitzen einen hohen Glycinanteil bis zu 68 % aufgrund des hochrepetitiven Sequenzmotivs [Gly_m-X]_n.^[339] Glutamat (17 %), Serin (16 %) und Alanin (7 %) sind ebenfalls sehr häufige Aminosäuren in GRPs.^[340,341]

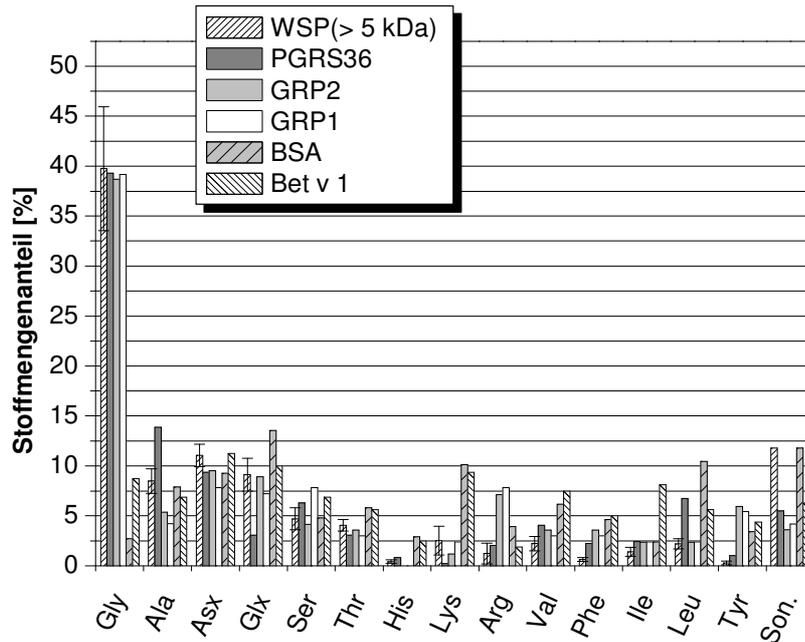


Abbildung 3.66: Stoffmengenanteil proteinogener Aminosäuren von durchschnittlichem WSP(>5 kDa)-Protein, PE-PGRS-Protein 36 (PGRS-36, P0A689) aus *Mycobacterium bovis*, Glycin-reichem RNA-Bindungsprotein 2 (GRP2, Q99070) aus *Sorghum bicolor* (Mohrenhirse) und RNA-Bindungsprotein 1 (GRP1, P49310) aus *Sinapis alba* (weißer Senf), Rinderserumalbumin (BSA, AAN17824, AA 25-607) und dem Allergen Bet v 1-A aus *Betula pendula* (Birke, P15494). In Klammern ist die accession number der NCBI-Datenbank des Proteins angegeben.^[325] Son. = Cys, Met, Trp, Pro.

Das Molekulargewicht von GRPs kann 60-75 kDa betragen. Arabinogalactan-Proteine (AGP) zeichnen sich ebenfalls durch einen hohen Anteil an Glycin, Glutamat, Aspartat, Serin und Alanin aus. Die Aufgabe von GRPs und AGPs besteht offensichtlich im *cross-linking* von Pektinen.^[342] Pektine sind Polysaccharidgeflechte, die neben Cellulose-Mikrofibrillen das pflanzliche Primär- und Sekundärzellwandsystem aufbauen und stützen.^[307] GRPs und AGPs sind allerdings nur proteinhaltige Nebenkomponenten in pflanzlichen Zellwänden, ihr Massenanteil beträgt in Leinenfasern 0.1-0.4%.^[340] Die proteinhaltigen Hauptkomponenten von Zellwänden sind Hydroxyprolin-reiche Extensine und Prolin-reiche Proteine (PRPs). Diese Glycoproteine zeichnen sich - wie die Namen bereits implizieren - durch einen hohen Prolin- bzw. Hydroxyprolingehalt aus. Prolin wurde mittels NBD-F-HPLC-Analyse in den atmosphärischen Feinstaubproben MOHP04-26 und MOHP04-31 bestimmt. Sein Gehalt in der WSP(>5 kDa)-Fraktion ist vergleichbar mit der von Arginin, Lysin und Isoleucin (Abschnitt 3.2.3.3). Insekten, die Seide produzieren können, sind neben pflanzlichem Material ebenfalls als weitere potentielle Quellen von Glycin anzusehen. Die Zugleinen- und Fangfasern von Spinnenseide bestehen ebenfalls aus hochrepetitiven Glycin-reichen Motiven, die für ihre Zugfestigkeit und Elastizität entscheidend sind.^[343] Auf der Suche nach einem geeigneten Referenzprotein mit einem PM2.5-Aminosäureprofil wurde die durchschnittliche WSP(>5 kDa)-Aminosäureverteilung einer SWISS-PROT-Datenbanksuche unter-

zogen. Die Ergebnisse sind neben der Aminosäurezusammensetzung von BSA und des Hauptallergens Bet v 1 aus Birke in *Abbildung 3.66* dargestellt. Die höchste Ähnlichkeit hat ein Protein der mykobakteriellen PE-PGRS-Familie. Proteine diesen Typs besitzen im Bereich ihrer PGRS-Domäne hochrepetitive GGAGGX-Sequenzen und einen Glycin- und Alaninanteil von 40-50 % bzw. 25 %. Sie sind in Zellwänden und Zellmembranen ausschließlich von Mykobakterien lokalisiert. Sie werden ebenfalls als strukturelle Proteine angesehen, die eine entscheidende Rolle für die Überlebensfähigkeit von Mykobakterien spielen könnten.^[344,345] Andere bekannte Glycin-reiche Proteine sind die intrazellulären RNA-Bindungsproteine. Diese zeigen ebenfalls eine hohe Übereinstimmung mit dem durchschnittlichen WSP(>5 kDa)-Aminosäureprofil.

3.2.6 Atmosphärischer Feinstaub München-Großhadern

3.2.6.1 Übersicht

In *Tabelle 6.13* sind atmosphärische PM_{2.5}-Konzentrationen des Probenahmeortes Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC) in München-Großhadern der Jahres 2005 aufgelistet. 3 Blindfilter und 5 beströmte PM_{2.5}-Realfilter wurden auf ihren TAA_{TP}-Gehalt mit Mitteln der Aminosäureanalytik analysiert (*Tabelle 3.33* und *Tabelle 3.34*).

Tabelle 3.33: Übersicht der auf ihren Aminosäure- und/oder Proteingehalt untersuchten Blindfilter. Probenahmeort: Institut für Wasserchemie, München-Großhadern (IWC), Probenahmejahr: 2005.

PM _{2.5} -Probe	Zeitraum am Probenahmeort	Tage am Probenahmeort	Beladung/Filter [mg]
IWC05-B19	25.05.05 - 10.06.05	17	0.97
IWC05-B21	10.06.05 - 02.07.05	22	1.92
IWC05-B25	01.08.05 - 09.09.05	31	1.18

Die ermittelte Belegung der Blindfilter deutete analog der MOHP-Filter 2004 (*Abschnitt 3.2.5.1*) eine Kontamination der Aerosolproben mit exogenem Material an, die auf die Handhabung zurückzuführen ist. Die Beströmung eines Glasfaserfilters mit Aerosolpartikeln erfolgte an 4, 5 bzw. 10 Tagen. Es wurden jeweils 2 cm² der bestörmten Realfilter in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure bei 5 bar für 60 min (HM9) in der Mars5-Mikrowelle hydrolysiert und anschließend wässrig extrahiert (EM3). Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1. Die Proben IWC05-48 und IWC05-50 und IWC05-51 wurden zusätzlich auf ihren wasserlöslichen

Proteingehalt WSP und WSP(>5 kDa) untersucht (EM2, HM9). Außerdem wurden Blindproben analysiert, um den Eintrag exogener Aminosäuren abschätzen zu können.

Tabelle 3.34: Übersicht der auf ihren Aminosäure- und/oder Proteingehalt untersuchten atmosphärischen PM2.5-Proben. Probenahmeort: Institut für Wasserchemie (IWC), München-Großhadern, Probenahmejahr: 2005. V_n = Probenahmenvolumen.

PM2.5-Probe	Probenahme	V_n [m ³]	PM2.5/Filter [mg]	PM2.5 [µg/m ³]
IWC05-37	25.05.05 - 29.05.05	2551.5	26.8	10.5
IWC05-40	08.06.05 - 13.06.05	3225.5	28.0	8.7
IWC05-43	23.06.05 - 28.06.05	3160.8	46.1	14.6
IWC05-48	03.07.05 - 08.07.05	6350.1	60.2	9.5
IWC05-50	12.08.05 - 22.08.05	6411.4	65.7	10.2
IWC05-51	22.08.05 - 01.09.05	6394.8	68.7	10.7

3.2.6.2 TAA_{TP}-Gehalt

In *Tabelle 3.35* ist der Gesamtaminosäuregehalt TAA_{TP} der untersuchten PM2.5-Proben, der sich auf 40.0-62.8 ng/m³ beläuft, aufgelistet. Der TAA_{TP}-Anteil in PM2.5 beträgt 0.4-0.6 %.

Tabelle 3.35: Gesamtaminosäuregehalt der TP-Fractionen (TAA_{TP}) der untersuchten atmosphärischen PM2.5-Proben. Dargestellte TAA_{TP}-Werte sind aus der Summe von N Aminosäuren bestimmt und nicht durch Blindwerte korrigiert worden.

PM2.5-Probe	N (AA)	TAA _{TP} /Filter [µg]	TAA _{TP} [ng/m ³]	TAA _{TP} /PM2.5 [%]
IWC05-37	15	160.3 ± 8.8	62.8 ± 3.4	0.60
IWC05-40	14	129.1 ± 9.4	40.0 ± 2.9	0.46
IWC05-43	15	191.1 ± 15.2	60.4 ± 4.8	0.41
IWC05-48	16	351.2 ± 19.8	55.3 ± 3.1	0.58
IWC05-51	16	382.4 ± 21.9	59.8 ± 3.4	0.56

Eine Hydrolyse- und Extraktionswiederfindung wurde nicht bestimmt. In *Tabelle 3.36* sind außerdem die TAA_{TP}-Gehalte verschiedener Blindproben tabelliert. Aus den Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass rund 12-18 % des ermittelten TAA_{TP}-Gehaltes der beströmten Realfilter dem Aminosäurehintergrund zugeordnet werden kann.

Tabelle 3.36: Gesamtaminosäuregehalt der TP-Fractionen (TAA_{TP}) der untersuchten Blindfilter und Blindproben.

PM2.5-Probe	N ⁽¹⁾ (AA)	TAA _{TP} /Filter [µg]
IWC05-B19	16	26.1 ± 0.2
IWC05-B21	16	23.2 ± 0.2
IWC05-B25	16	56.8 ± 0.7
Methodenblindwert ⁽²⁾	16	12.0 ± 0.1
Extraktionsblindwert ⁽³⁾	15	2.4 ± 0.0

(1) - Anzahl der zur TAA-Berechnung quantifizierten Aminosäuren;
 (2) - Blindhydrolyse (HM9, *Abschnitt 5.8.4.3*) und Blindextraktion (EM3, *Abschnitt 5.6.3*); (3) - Blindextraktion (EM3).

Eine methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze, wie sie in *Abschnitt 3.2.5* für wasserlösliches Protein ermittelt wurde, ist in diesem Fall nicht bestimmt worden, da der TAA_{TP}-Gehalt des Blindfilters IWC05-B25 signifikant von den anderen untersuchten Blindfiltern abweicht. Eine Anzahl von drei analysierten Blindfiltern erschien daher als eine nicht ausreichend große Stichprobe. Die Werte der untersuchten Blindproben (Blindfilter, Methoden- und Extraktionsblindproben) sind in sich jedoch konsistent. Aus dem Vergleich von Methoden- und Blindfilterblindwert lässt sich ableiten, dass 21-52 % von TAA_{TP} der Blindfilter auf den Eintrag von Aminosäuren während der kompletten Probenvorbereitung (Proteinhydrolyse und Extraktion) zurückzuführen sind. Die Aminosäuredaten, aus denen TAA_{TP} berechnet wurde, sind in *Tabelle 6.11-Tabelle 6.19* zusammengefasst.

3.2.6.3 TP- und WSP-Gehalt

Atmosphärische WSP-, WSP(>5 kDa)- und TP-Konzentrationen der PM2.5-Proben IWC05-48, IWC05-50 und IWC05-51 sind - sofern ermittelt - in *Abbildung 3.67* dargestellt. Der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Anteil an der Gesamtpartikelmasse beträgt jeweils rund 0.5, 0.2 und 0.04 % (*Tabelle 3.37*). Diese Werte sind jedoch mit methodischen Artefakten behaftet, da die Proteinwiederfindungen der Extraktion, Größenfraktionierung und Proteinhydrolyse nicht einbezogen worden sind. Unter Berücksichtigung der Wiederfindung der Proteinhydrolyse in makromolekularer PM2.5-Matrix (60 %) und der Größenfraktionierung (max. 30 %) ergibt sich ein WSP(>5 kDa)/PM2.5-Verhältnis von 0.2 %. Der ermittelte WSP- und WSP(>5 kDa)-Gehalt gleicht sich somit an. Eine Aussage über die Größenverteilung atmosphärischer Proteine lässt sich daher mit den angewendeten Methoden der Größen-

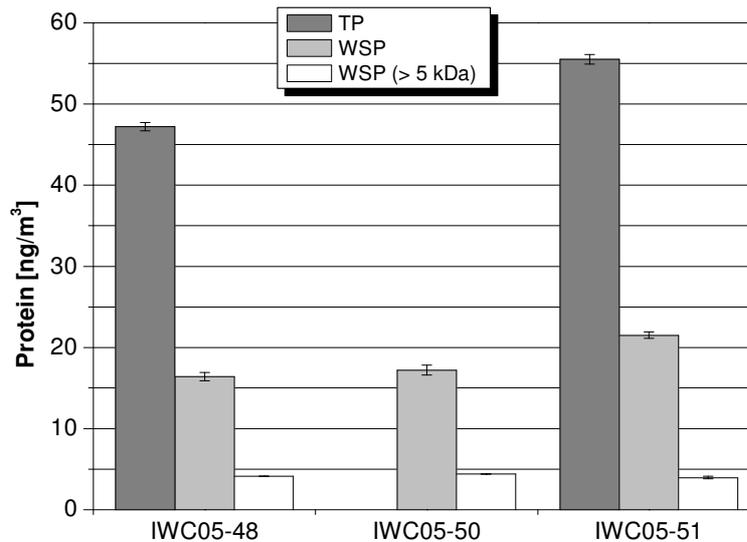


Abbildung 3.67: Atmosphärische Gesamtprotein- (TP) und wasserlösliche Proteinkonzentrationen (WSP). Probenahme: Institut für Wasserchemie (IWC), München-Großhadern, 2005. Die dargestellten Werte sind durch entsprechende Blindwerte nicht korrigiert worden.

fraktionierung und Proteinhydrolyse nicht treffen. Unter Annahme einer 10 %-igen Extraktionseffizienz ergeben sich eine TP- und WSP-Fraktion in PM_{2.5} von 5 % bzw. 2 %. Daraus folgt, dass 60 % der Gesamtproteinfraktion in PM_{2.5} gebundenes Protein sein muss. In *Tabelle 3.38* sind die TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Gehalte der untersuchten Blindproben dargestellt.

Tabelle 3.37: TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Anteile in atmosphärischen PM_{2.5}-Proben.

PM _{2.5} -Probe	TP/PM _{2.5}	WSP/PM _{2.5}	WSP(>5 kDa)/PM _{2.5}
	[%]	[%]	[%]
IWC05-48	0.50	0.17	0.04
IWC05-50	-	0.17	0.04
IWC05-51	0.52	0.20	0.04

Bei Betrachtung der Blindwerte von IWC05-B25 ist jedoch zu beachten, dass bei der Bestimmung von WSP und WSP(>5 kDa) während der Probenvorbereitung ein Rundkolben bei Gefriertrocknung des Extraktes gebrochen ist. Daher sind die WSP- und WSP(>5 kDa)-Blindwerte tendenziell zu hoch und ihre Aufführung lediglich als Orientierung gedacht. Nach Vergleich der WSP(>5 kDa)-Fraktion des Blindfilters mit den Werten aus *Abschnitt 3.2.5* dürften die tatsächlichen WSP-Werte um rund die Hälfte niedriger liegen.

Tabelle 3.38: Vergleich des TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Gehaltes der PM2.5-Probe IWC05-51 mit methodischen Blindwerten.

PM2.5-Probe	TP/Filter [µg]	WSP/Filter [µg]	WSP(>5 kDa)/Filter [µg]
IWC05-51	352.1 ± 4.0	137.2 ± 2.7	25.3 ± 1.0
IWC05-B25	35.6 ± 0.8	33.0 ± 0.8	6.0 ± 0.8
Extraktions- blindwert ⁽⁴⁾	12.0 ± 0.1 ⁽²⁾	7.6 ± 0.0 ⁽¹⁾	1.1 ± 0.0
SEC-Blindwert	-	-	1.6 ± 0.0
Hydrolyse- blindwert	2.4 ± 0.0 ⁽³⁾	-	0.8 ± 0.0

(1) - BSA-Äquivalent aus TAA; (2) - entspricht Methodenblindwert aus *Tabelle 3.36*; (3) - entspricht Extraktionsblindwert aus *Tabelle 3.36*; (4) - TP-Bestimmung: siehe (2), WSP-Bestimmung: Blindextraktion und Blindhydrolyse, WSP(>5 kDa)-Bestimmung: Blindextraktion, Blind-SEC und Blindhydrolyse.

Die Aminosäuredaten, aus denen der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Gehalt berechnet wurden, sind in *Tabelle 6.15-Tabelle 6.19* zusammengefasst.

3.2.6.4 Aminosäurezusammensetzung

In *Tabelle 6.20* sind die Aminosäurezusammensetzungen der WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktionen der IWC-Proben IWC05-48, IWC05-50 und IWC05-51 aufgeführt. Die Berechnung der Stoffmengenanteile erfolgte unter der Annahme, dass die Summe der Anteile der nicht bestimmbareren Aminosäuren der in BSA entsprechen. Als Korrekturfaktoren wurden die zu Alanin relativen Wiederfindungen der BSA-Hydrolysekontrollen herangezogen (*Tabelle 3.18*). Die häufigste Aminosäure in der WSP(>5 kDa)-Fraktion ist Glycin mit einem Stoffmengenanteil von 34-40 mol%. Danach folgen Aspartat/Asparagin, Alanin, Glutamat/Glutamin mit je 6-9 mol% und Serin, Threonin, und Lysin mit je 3-7 mol%. Diese Verteilung entspricht der beobachteten Aminosäurezusammensetzung des durchschnittlichen WSP(>5 kDa)-Proteins aus *Abschnitt 3.2.5.4*. Die Aminosäurezusammensetzung der WSP-Fraktion ist in etwa der zuvor erwähnten Verteilung identisch, eine klare Aussage über einen möglichen Unterschied lässt sich jedoch aufgrund der geringen Anzahl analysierter Proben nicht treffen.

3.2.7 Vergleich von BCA- und NanoOrange-Assay

Die atmosphärischen PM2.5-Proben IWC05-47, IWC05-48 und IWC05-51 wurden auf ihren Proteingehalt mit Mitteln der Aminosäureanalytik, des BCA- und NanoOrange-Assays analysiert. Die Aerosolpartikel auf den Filtern wurden wässrig extrahiert (EM2) und

anschließend die WSP(>5 kDa)-Fraktion isoliert. Die unfraktionierten Extrakte wurden auf ihren FAA- und TAA-Gehalt vor bzw. nach Proteinhydrolyse untersucht. Die Proteinhydrolyse des unfraktionierten Extraktes und der WSP(>5 kDa)-Fraktion wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure bei 5 bar für 60 min (HM9) in der Mars5-Mikrowelle durchgeführt. Der Proteingehalt beider Fraktionen wurden ebenfalls mit dem BCA- und dem NanoOrange-Assay als BSA-Äquivalentmasse bestimmt. In den untersuchten unfraktionierten Proben wurden nach Aminosäureanalytik 16.4, 21.5 und 29.5 ng/m³ in der Atmosphäre gefunden (Abbildung 3.68).

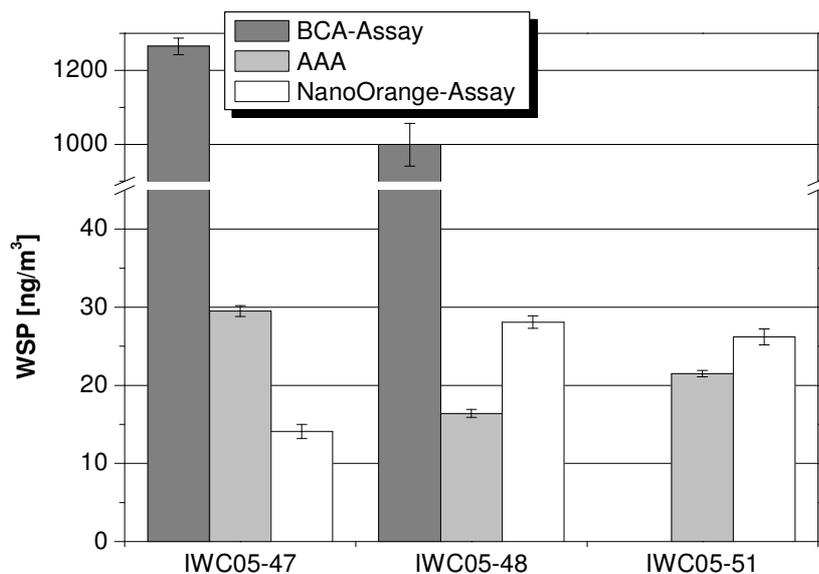


Abbildung 3.68: Atmosphärische WSP-Konzentration nach Bestimmung mit BCA-Assay, Aminosäureanalytik und NanoOrange-Assay. Probenahme: Institut für Wasserchemie (IWC), München-Großhadern, 2005. IWC05-47: nur TAA-Bestimmung, CAA = TAA·0.818 aus Literaturdaten von ZHANG et al.^[36].

Der BCA-Assay bestimmt das Protein in Relation zur Proteinhydrolyse/Aminosäureanalytik-Methode um das 43 und 61fache bzw. nach Korrektur des Hydrolyseartefakts um das 37 und 52fache über. Der NanoOrange-Assay zeigt im Vergleich zum BCA-Assay keine ausgeprägte Kreuzreaktivität gegenüber niedermolekularer PM_{2.5}-Matrix. In den Proben wird das Protein um das 2fache über- bzw. unterbestimmt. Ein analoges Bild ergibt sich für das Protein in der makromolekularen PM_{2.5}-Fraktion, das in *Abbildung 3.69* dargestellt ist. Der BCA-Assay ermittelt in Relation zu dem Ergebnis der Aminosäureanalytik einen um den Faktor 34-52 zu hohen Wert. Unter Berücksichtigung der Hydrolysewiederfindung (58 %) beläuft sich die Überbestimmung auf das 20-30fache. Der NanoOrange-Assay hingegen bestimmt in allen drei Proben das Protein um einen Faktor 1.7, 2.2 und 3.3 bzw. nach Korrektur des Hydrolyseartefakts um das 3-6fache unter.

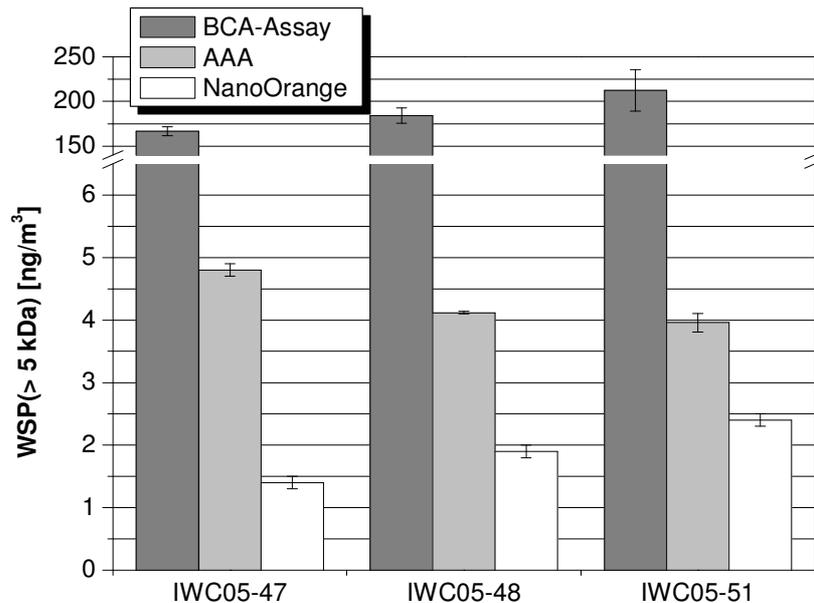


Abbildung 3.69: Atmosphärische Proteinkonzentration ($WSP(>5 \text{ kDa})$) nach Bestimmung mit BCA-Assay, Aminosäureanalytik und NanoOrange-Assay. Probenahme: Institut für Wasserchemie (IWC), München-Großhadern, 2005.

3.2.8 Diskussion

Die durchgeführten Vergleichsmessungen von BCA-, NanoOrange-Assay und der Aminosäureanalytik belegen einen signifikanten Einfluss der $PM_{2.5}$ -Matrix auf das Messergebnis. Der BCA-Assay bestimmt das Protein sowohl der WSP - als auch der $WSP(>5 \text{ kDa})$ -Fraktion erheblich über. Die Ursache für diese Beobachtung ist im Einfluss von nieder- und makromolekularen $PM_{2.5}$ -Komponenten wie z. B. HULIS, die mit Pflanzenphenolen vergleichbare Strukturen besitzen, zu sehen (Abschnitt 3.2.4.4). Kreuzreaktivitäten von HULIS wurden von FRANZE^[10] im BCA-Assay festgestellt und wurden bereits in Abschnitt 2.1.5.4 diskutiert. Außerdem sind Interferenzen von Pflanzenphenolen wie Gallen-, Tannin- und Pyrogallensäure und Pyrocatechol im BCA-Assay von KAMATH^[233] untersucht worden. Pyrocatechol (*o*-Hydroxyphenol) z. B. zeigt eine um das 106fach höhere Absorption als BSA. Möglicherweise bilden *o*-Diphenole bidentale Komplexe mit Cu^{2+} aus und sind in der Lage dieses zu reduzieren.^[232] Der NanoOrange-Assay, der überwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Fluoreszenzfarbstoff basiert, erweist sich hingegen als deutlich unsensibler gegenüber $PM_{2.5}$ -Matrixkomponenten, allerdings bestimmt er das Protein der makromolekularen Fraktion tendenziell unter. Diese Abweichungen können auf die Berechnungsmethode der BSA-äquivalenten Proteinmenge aus Aminosäuredaten und der Abweichung der Aminosäurezusammensetzungen eines durchschnittlichen $WSP(>5 \text{ kDa})$ -Proteins und BSA zurückgeführt werden. Die an dieser Stelle getroffenen

Schlussfolgerungen gelten jedoch nur unter der Annahme, dass die Aminosäureanalytik den wahren Proteingehalt in den Proben besser abzuschätzen vermag. Diese Annahme wird durch die Wiederfindungen von BSA in PM2.5-Matrix unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse gestützt. Eine genaue Aussage über atmosphärische Proteinkonzentrationen und der Proteinanteile an der Gesamtmasse atmosphärischer Feinstaubpartikel lässt sich aufgrund der methodischen Limitierungen (*Abschnitt 3.2.4*) nicht treffen. Es sind lediglich Abschätzungen der TP- und WSP-Konzentrationen und ihrer Anteile aus den Aminosäure- und BCA-Daten möglich. Die abgeschätzten Werte liegen im Größenordnungsbereich von Literaturdaten (*Abschnitt 2.1.5.4*). Unter Berücksichtigung der Proteinwiederfindungen der Hydrolyse und der Proteinüberbestimmung im BCA-Assay ergeben sich identische Proteingehalte der untersuchten MOHP04-Proben. Eine Aussage über die Größenverteilung atmosphärischer Proteine ist aufgrund des beschriebenen Artefaktes der Größenfraktionierung nicht möglich gewesen. Die Aminosäureanalytik ermöglicht die Bestimmung einer durchschnittlichen Aminosäurezusammensetzung von atmosphärischen Proteinen. Es ist davon auszugehen, dass diese eine gewisse Abhängigkeit von der Extraktionseffizienz zeigen, so dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Aminosäurezusammensetzungen der Proben nicht unbedingt repräsentativ sein müssen. Aus den Untersuchungen zeichnet sich jedoch ein sehr hoher Glycinanteil von 40 mol% in atmosphärischen Proteinen ab. **Das Kalibrierprotein BSA ist aufgrund seiner deutlich differierenden Aminosäurezusammensetzung ein schlechter Repräsentant atmosphärischer Proteine und ist daher als Standardprotein für die Proteinquantifizierung im atmosphärischen Aerosol schlecht geeignet.** Atmosphärische Proteine sind vermutlich überwiegend strukturelle Proteine aus pflanzlichen und möglicherweise auch bakteriellen Zellwandsystemen. Aus der nativen Funktion dieser Proteine kann geschlossen werden, dass es sich hierbei um gegenüber mechanischer Beanspruchung (also auch meteorologischen Einflüssen wie z.B. Wind, Gewitter und Regen) robuste Proteine handeln muss. **Bei weiteren Optimierungen der HPLC-Methoden wäre es sinnvoll, die Bestimmung von Prolin und Hydroxyprolin in die Analytik einzubeziehen, denn Prolin- und Hydroxyprolin-reiche Proteine sind ebenfalls proteinhaltige Komponenten pflanzlicher Zellwandsysteme und könnten als Tracer von Pflanzenbruchstücken dienen.**

3.3 NITROTYROSIN- UND NITROPROTEINANALYTIK

3.3.1 Allergenes Potential von Nitroproteinen

Im Rahmen einer Kooperation mit der Forschungsgruppe von Prof. Albert Duschl der Universität Salzburg (Division Allergie und Immunologie der Abteilung für Molekularbiologie) wurden Ovalbumin und Bet v 1 *in vitro* mit Tetranitromethan nitriert (*Abschnitt 5.9.1*). Es wurden Zell- und Tierexperimente u. a. mit Nitro-(3.4)-Bet v 1 und Nitro-(4.6)-OVA von dem Kooperationspartner durchgeführt, um das allergieverstärkende Potential der Protein-nitrierung abzuklären. Die Ergebnisse dieser Studie sind veröffentlicht und bereits in *Abschnitt 2.1.7* kurz dargestellt worden.^[83]

3.3.2 Spektrophotometrische Charakterisierung

Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Nitrierte Proteine jedoch weisen aufgrund der gegenüber Tyrosin veränderten absorptiven Eigenschaften von 3-Nitrotyrosin eine weitere Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich auf. Diese Absorptionsbande zeigt eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit, die bereits hinreichend beschrieben wurde (*Abschnitt 2.4.2.3*). Ein Absorptionsspektrum von 3-Nitrotyrosin und Nitro-(7.4)-BSA in 0.05 N NaOH ist in *Abbildung 3.70* gezeigt.

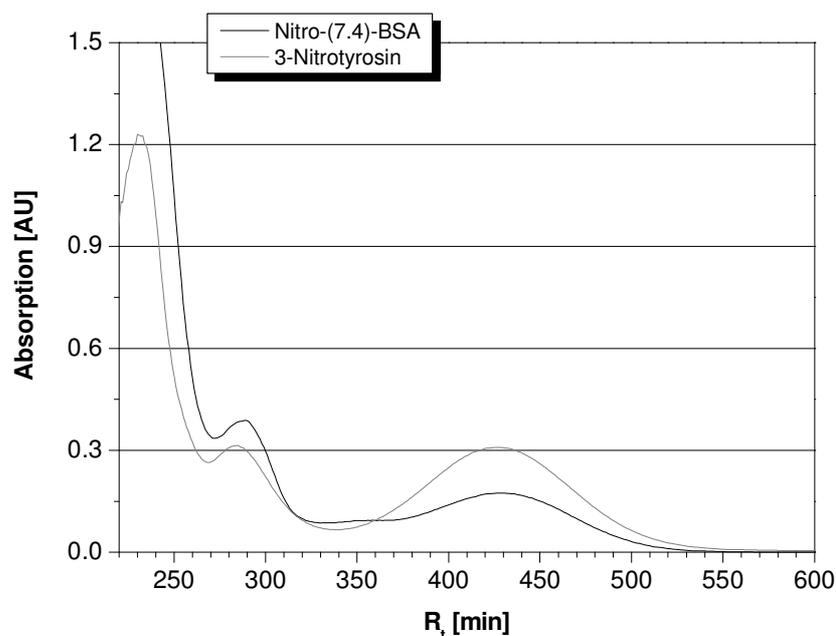


Abbildung 3.70: UV/VIS-Spektrum von 75 μ M 3-Nitrotyrosin und 380 mg/l Nitro-(7.4)-BSA in 0.05 N NaOH.

Der Nitrotyrosingehalt von Nitroproteinen lässt sich mittels einer spektrophotometrischen Absorptionsmessung bei 428-430 nm im Alkalischen bestimmen. Das Spektrophotometer wird in diesem Fall mit freiem 3-Nitrotyrosin in 0.05 N NaOH kalibriert. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für 3-Nitrotyrosin betragen 0.4 μM und 1.8 μM in einem Probenvolumen von 500 μl (Kalibriermethode, $N = 7$, $N' = 3$, Kalibrierbereich: 5-150 μM , *Abschnitt 5.4.2*). Aus diesen Messungen wurde für Nitro-(7.4)-BSA, das als Proteinstandard für die Proteinhydrolyse eingesetzt wurde, ein durchschnittlicher Nitrotyrosingehalt von 7.4 pro BSA-Molekül ermittelt. Unter den Hydrolysebedingungen HM6 hingegen wurde mittels NBD-F-HPLC-Analyse ein um rund ein Molekül höherer Gehalt von 8.3 ± 0.3 pro BSA-Molekül gefunden. Dies entspricht der Beobachtung, die bereits von *FRANZE*^[10] beschrieben wurde. Hier wurde der Nitrotyrosingehalt eines TNM-nitrierten BSA-Standards mittels der konventionellen Proteinhydrolyse und RP-HPLC-Analytik mit UV/VIS-Detektion bestimmt und mit dem Ergebnis der spektrophotometrischen Methode verglichen.

3.3.3 Enzymimmunoassays

In experimentellen Arbeiten von *FRANZE*^[10,11] sind einseitige nichtkompetitive und Sandwich-Enzymimmunoassays zur Detektion und Quantifizierung von Nitroproteinen entwickelt worden. Der polyklonale Antikörper Oxis 24312 aus Schaf erwies sich in zahlreichen kompetitiven Immunoassays als derjenige mit den höchsten Affinitätskonstanten gegenüber Nitro-BSA verschiedenster Nitrierungsgrade und 3-Nitrotyrosin.

3.3.3.1 Einseitiger nichtkompetitiver und Sandwich-Immunoassay

Eine sigmoidale Kalibrierkurve des einseitigen nichtkompetitiven Enzymimmunoassays unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers Oxis 24312 von *FRANZE* ist in *Abbildung 3.71* dargestellt. Seine Empfindlichkeit wurde durch eine verlängerte Reaktionszeit leicht gesteigert. Die Nachweisgrenze beträgt 0.001 mg/l. Der von *FRANZE* beschriebene Sandwich-Immunoassay unter Verwendung des pAk Oxis 24312 aus Schaf als 1. Primärantikörper und mAk 39B6 aus Maus als 2. Primärantikörper wurde modifiziert, um einen Empfindlichkeitsgewinn zu erzielen. Hierfür wurde ein Fängerantikörper, dessen Paratop gegen das Fc-Fragment von Schafantikörpern gerichtet ist, verwendet. Es sollte eine gezielte Ausrichtung der Paratope des 1. Primärantikörpers mit Hilfe der Bindung an den Fängerantikörper erreicht werden. In *Abbildung 3.72* ist eine sigmoidale Kalibrierkurve aufgezeichnet. Eine niedrigere Nachweisgrenze wurde jedoch nicht erzielt.

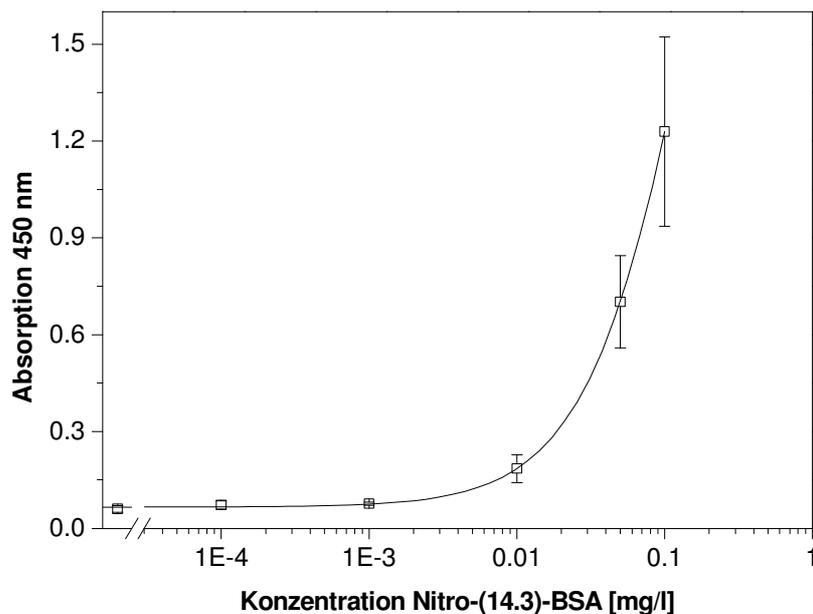


Abbildung 3.71: Einseitiger Enzymimmunoassay mit pAk Oxis 24312 aus Schaf (1:2 500) und Anti-Schaf IgG-POD (1:10 000). Dargestellt sind Median und Spannweite. Kalibrierparameter: maximale Absorption: 3.85, minimale Absorption: 0.07, Testmittelpunkt: 0.20 mg/l, Steigung am Testmittelpunkt: 1.14, $R^2 = 0.9999$, $N = 6$. NWG = 0.001 mg/l, BG = 0.004 mg/l (Blindwertmethode).

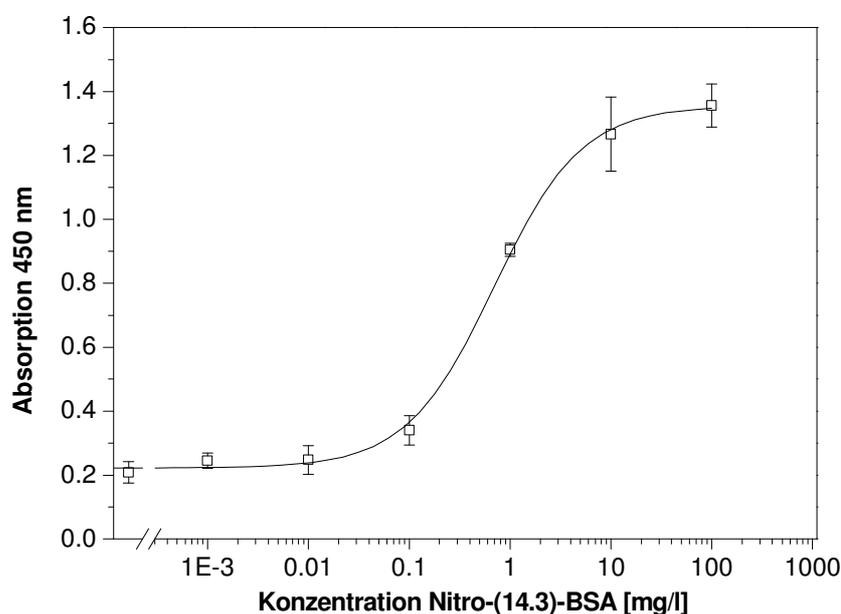


Abbildung 3.72: Sandwich-Enzymimmunoassay mit Fängerantikörper Anti-Schaf-IgG (1:2 500), 1. Primäantikörper pAk Oxis 24312 (1:2 500), 2. Primäantikörper mAk 39B6 (1:10 000), Anti-Maus-IgG-POD (1:20 000). Dargestellt sind Median und Spannweite. Kalibrierparameter: maximale Absorption: 1.36, minimale Absorption: 0.22, Testmittelpunkt: 0.70 mg/l, Steigung am Testmittelpunkt: 1 (fixiert), $R^2 = 0.9988$, $N = 7$. NWG = 0.02 mg/l, BG = 0.07 mg/l (Blindwertmethode).

3.3.3.2 Indirekter kompetitiver Immunoassay

Der polyklonale Antikörper Oxis 24312 aus Schaf wurde für die Entwicklung einer Immunitätschromatographie(IAC)-Säule zur Abtrennung von 3-Nitrotyrosin von Matrixkomponenten aus Fein- und Straßenstaub verwendet. Die Affinität des Antikörpers zu 3-Nitrotyrosin wurde in Abhängigkeit des Gehaltes an ACN und des pH-Wertes mittels eines kompetitiven Immunoassays getestet. Die Affinität in PBS-Puffer wurde in Übereinstimmung mit Literaturdaten auf 1.1×10^6 l/mol bestimmt.^[10] Die Affinitätskonstanten K ergeben sich aus dem Kehrwert des Testmittelpunktes nach WELLER^[346]. Der Einfluss einer pH-Wertänderung wird aus *Abbildung 3.73* deutlich.

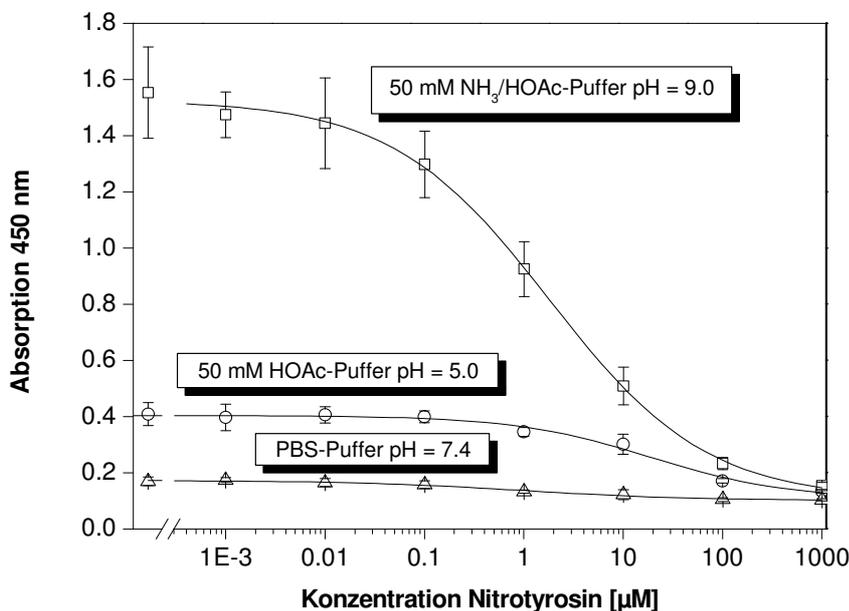


Abbildung 3.73: Kompetitiver Enzymimmunoassay mit pAk Oxis 24312 aus Schaf (1:2 500) und Anti-Schaf IgG-POD (1:10 000). Dargestellt sind Median und Spannweite. Beschichtung: 0.05 mg/l Nitro-(14.3)-BSA, Konkurrenz in (a) 50 mM Ammoniak/Essigsäure-Puffer pH = 9.0 (b) 50 mM HOAc-Puffer pH = 5.0 (c) PBS-Puffer, pH = 7.4. Inhibitionskurven: (a) maximale Absorption: 1.53, minimale Absorption: 0.10, Testmittelpunkt: 1.81 µM, Steigung am Testmittelpunkt: 0.55, $R^2 = 0.9991$, $N = 8$ (b) maximale Absorption: 0.40, minimale Absorption: 0.11, Testmittelpunkt: 18.90 µM, Steigung am Testmittelpunkt: 0.63, $R^2 = 0.9893$, $N = 8$ (c) maximale Absorption: 0.17, minimale Absorption: 0.10, Testmittelpunkt: 0.95 µM, Steigung am Testmittelpunkt: 0.5, $R^2 = 0.9887$, $N = 8$.

Die Affinität des pAk Oxis 24312 zu 3-Nitrotyrosin ist bei pH = 5.0 mit einer Affinitätskonstanten von 0.05×10^6 l/mol um eine Größenordnung kleiner als bei pH-Wert = 9.0 mit einem Wert von 0.6×10^6 l/mol. Die Bindung von 3-Nitrotyrosin an den Antikörper wird als anionisches Phenolat bevorzugt. Eine Elution von 3-Nitrotyrosin, das auf einer Oxis-IAC-Säule an Antikörpern mit geringer Affinität gebunden ist, könnte daher mit Hilfe einer pH-Werterniedrigung erreicht werden.

Eine direkte Vergleichbarkeit der Inhibitionskurve in PBS-Puffer mit den anderen in *Abbildung 3.73* dargestellten Kalibrierkurven ist nicht gegeben, da der PBS-Puffer eine höhere Ionenstärke besitzt. Die Beobachtung der höheren Affinität des pAk zu 3-Nitrotyrosin in PBS-Puffer gegenüber der in 50 mM NH₃/HOAc-Puffer (niedrigerer Testmittelpunkt) ist auf die geringere maximale Absorption zurückzuführen. Der Einfluss eines geringen Anteils von ACN während der Konkurrenz wird anhand des Anstiegs der maximalen Absorption der Inhibitionskurven in *Abbildung 3.74* deutlich.

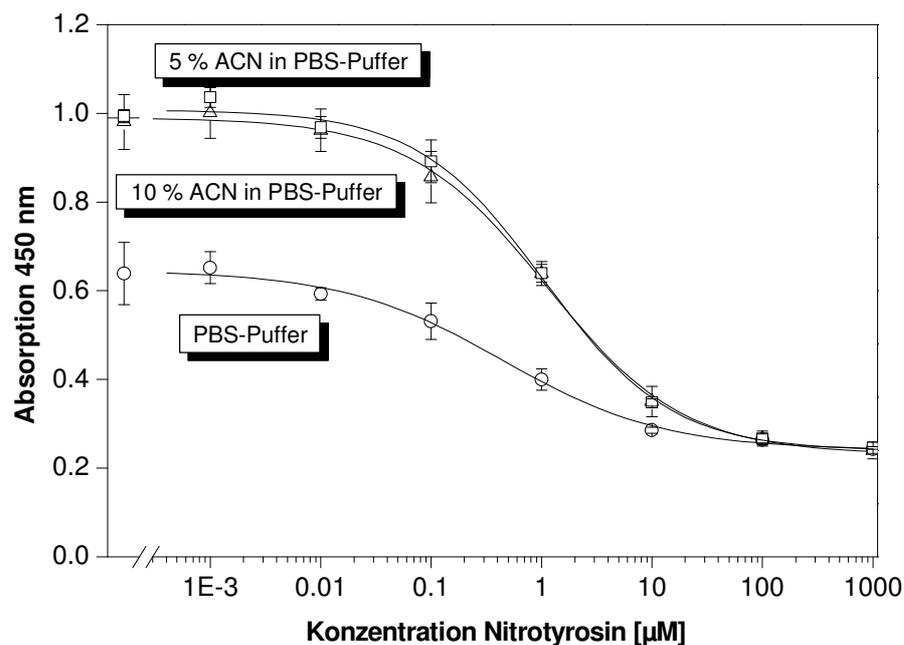


Abbildung 3.74: Kompetitiver Enzymimmunoassay mit pAk Oxis 24312 aus Schaf (1:2 500) und Anti-Schaf IgG-POD (1:10 000). Dargestellt sind Median und Spannweite. Beschichtung: 0.05 mg/l Nitro-(14.3)-BSA, Konkurrenz in (a) PBS-Puffer (b) 5 % ACN in PBS-Puffer (c) 10 % ACN in PBS-Puffer. Inhibitionskurven: (a) maximale Absorption: 0.65, minimale Absorption: 0.24, Testmittelpunkt: 0.45 µM, Steigung am Testmittelpunkt: 0.60, $R^2 = 0.9966$, $N = 8$ (b) maximale Absorption: 1.01, minimale Absorption: 0.24, Testmittelpunkt: 1.05 µM, Steigung am Testmittelpunkt: 0.75, $R^2 = 0.9987$, $N = 8$ (c) maximale Absorption: 0.99, minimale Absorption: 0.23, Testmittelpunkt: 1.11 µM, Steigung am Testmittelpunkt: 0.70, $R^2 = 0.9966$, $N = 8$.

Offensichtlich werden nitririerte Strukturelemente in hydrophoben Proteinbereichen durch die Erniedrigung der Polarität des Puffers durch eine Konformationsänderung für den Antikörper zugänglich. Es können somit mehr Primärantikörper und damit ebenfalls mehr farbgebende Peroxidase-markierte Sekundärantikörper binden. Eine signifikante Affinitätsänderung ist unter den untersuchten Bedingungen nicht beobachtet worden.

Die Identifizierung von 3-Nitrotyrosin in Umweltproben mittels NBD-F-HPLC-Analyse würde ausschließlich anhand der Übereinstimmung der Retentionszeiten des Analyten einer Amino-

säurestandardlösung und der Realprobe erfolgen. Die Beobachtung einer im R_f -Bereich von 3-Nitrotyrosin eluierenden Verbindung in HPLC-FD-Chromatogrammen würde keine definitive Auskunft über die Präsenz von 3-Nitrotyrosin liefern. Eine zweite Analyse mittels einer anderen Methode (MS) müsste durchgeführt werden. Als einfache und sehr schnelle Alternative hat sich die Kombination der NBD-F-HPLC-Methode mit dem kompetitiven Enzymimmunoassay angeboten. Die entsprechende Analyse einer Aminosäurestandardlösung ist in *Abbildung 3.75* dargestellt.

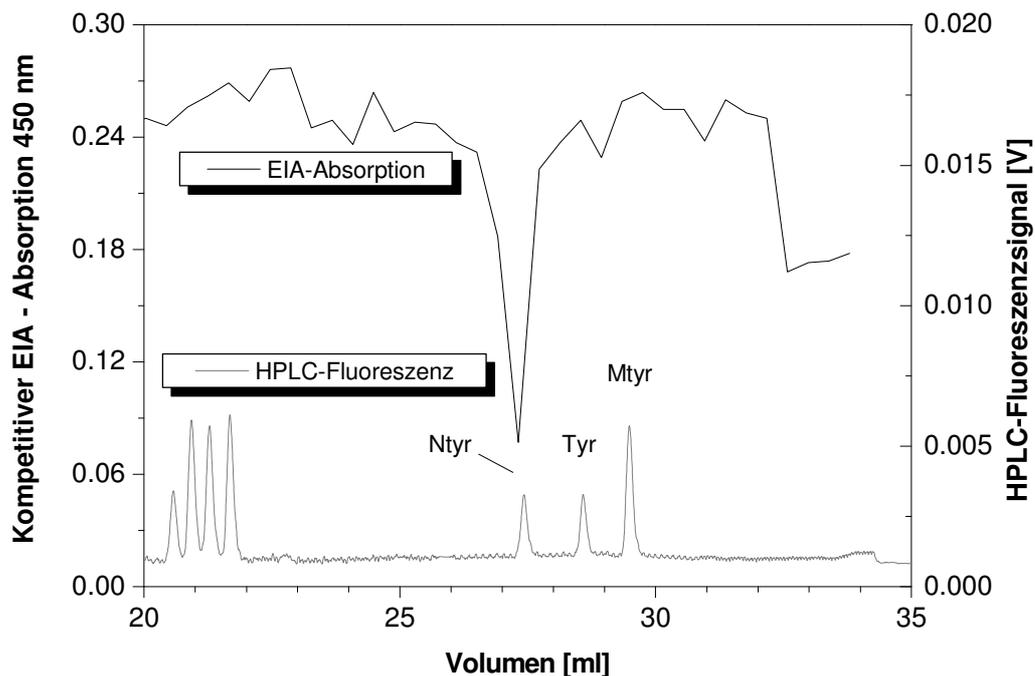


Abbildung 3.75: HPLC-FD-Standardchromatogramm und Absorption bei 450 nm im kompetitiven Enzymimmunoassay (EIA) einer Aminosäurestandardlösung (0.3 μ M AA-S-18, 3-Nitrotyrosin und 1 μ M α -Methyltyrosin) nach Derivatisierung NBD-F-VD1 und HPLC-Trennung. HPLC-Parameter (Shimadzu-HPLC-System): Injektionsvolumen: 20 μ l, Säule Nucleodur (250x4 mm, 100 Å , 5 μ m, C18-RP, ec), Säulentemperatur: 30 $^{\circ}$ C, Flussrate: 0.5 ml/min. Eluent A: 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.2), Eluent B: MeOH, Gradient: 0-2 min 15 % B, 2-5 min 15-30 % B, 5-65 min 30-68 % B, 65-68 min 68-100 % B, 68-81 min 100 % B, 81-82 min 100-15 % B, 82-95 min 15 % B. Fluoreszenzanregung: 470 nm, Fluoreszenzdetektion: 530 nm. EIA-Parameter: Beschichtung: 0.1 mg/l Nitro-(14.3)-BSA, Primärantikörper: mAk 39B6 (1:20 000), Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG-POD (1:40 000). Das HPLC-Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte zu Fraktionen von 0.4 ml (48 sec Eluat/Fraktion) gesammelt. 35 μ l einer Fraktion wurden zu 65 μ l PBS-Azid-Puffer in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte als Inhibitionslösung für den kompetitiven EIA pipettiert.

Das aus dem Fluoreszenzdetektor austretende Eluat wurde nach HPLC-Trennung auf einer Mikrotiterplatte fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf eine für den kompetitiven Enzymimmunoassay vorbeschichtete Mikrotiterplatte transferiert. Es ist eine deutliche Absorptionsabnahme (Inhibition) durch das NBD-F-Derivat von 3-Nitrotyrosin zu beobachten.

Diese fällt unter Annahme der Elution der gesamten injizierten 3-Nitrotyrosinmenge in dieser Fraktion sogar höher aus, als für nichtderivatisiertes 3-Nitrotyrosin der gleichen Konzentration zu erwarten gewesen wäre. Die Affinität des eingesetzten monoklonalen Antikörpers 39B6 zu dem NBD-F-Derivat von 3-Nitrotyrosin ist offensichtlich höher als die mit freier Aminogruppe. Diese Beobachtung könnte jedoch auch auf den Methanolanteil im HPLC-Eluat zurückzuführen sein.

3.3.4 Anionenaustauschextraktion

Das Anionenaustauscherharz AG1-X8 wurde von CROWLEY^[306] und FRANZE^[10] zur Anreicherung von 3-Nitrotyrosin aus Gewebelysaten bzw. Standardlösungen angewendet. Es wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Nitrophenoleinheit des Analyten einen niedrigeren pK_s -Wert besitzt als die Phenoleinheit von Tyrosin. Die Nitrierung hat eine pK_s -Verringerung von 10 auf 7.5 zur Folge.^[279] Die Aufgabe von 3-Nitrotyrosin auf das Harz erfolgt daher mit Ammoniumacetat-Puffer (pH = 7.5). Die Elution durch Protonierung wird mit Essigsäure durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wiederfindungen von 3-Nitrotyrosin aus Standardlösungen und aus aufgestockten Straßenstaubextrakten bestimmt. Die Wiederfindung von 180 nmol 3-Nitrotyrosin in 2 ml 50 mM Ammoniumacetat-Puffer beträgt in der Essigsäurefraktion 84.6 % und die Gesamtwiederfindung 95.3 % (Tabelle 3.39).

Tabelle 3.39: Wiederfindung von 180 nmol 3-Nitrotyrosin nach Anionenaustauschextraktion mittels AG1-X8-Harz. Auf 1.5 g Harz wurden nacheinander 2 ml einer Lösung von 90 μ M 3-Nitrotyrosin in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer, 6 ml Wasser, 6 ml 1 M Essigsäure und 2 ml Wasser aufgetragen. Die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in den einzelnen Fraktionen erfolgte nach Eindampfen im Druckluftstrom und Wiederaufnahme in 0.05 N NaOH spektrophotometrisch bei 428 nm.

Fraktion	Puffer/Lösung	Wiederfindung 3-Nitrotyrosin [%]
I	2 ml 50 mM NH ₄ Ac-Puffer	1.6
II	6 ml Wasser	0.5
III	6 ml 1 M HOAc	84.6
IV	2 ml Wasser	8.6

In weiteren Experimenten wurden 12.5 und 1.25 nmol 3-Nitrotyrosin zu Hydrolysaten makromolekularer Fraktionen der Straßenstaubprobe K101 (<63 μ m) gegeben. Diese Probe wurde zuvor von FRANZE^[10] im Enzymimmunoassay negativ auf Nitroproteine getestet. Im ersten Fall konnten die zuvor genannten Wiederfindungen mit Werten von 82 % in der Essigsäurefraktion (Fraktion III) und 7 % in Fraktion IV mittels NBD-F-HPLC-Analyse

bestätigt werden, obwohl sich bereits Matrixinterferenzen im R_f -Bereich von 3-Nitrotyrosin zeigten (Abbildung 3.76).

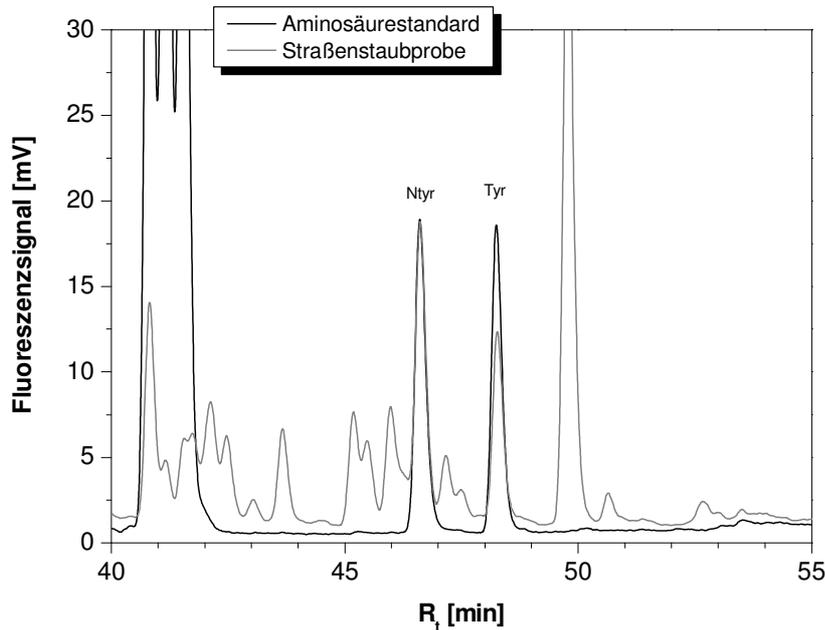


Abbildung 3.76: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung ($0.3 \mu\text{M}$ AA-S-18 und 3-Nitrotyrosin) und der Fraktion III der Straßenstaubprobe K101 ($<63 \mu\text{M}$) nach AG1-X8-Anreicherung. 200 mg Straßenstaubprobe wurden zuvor analog Methode EM1 in 6 ml PBS-Azid-Puffer extrahiert, die makromolekulare Fraktion ($>5 \text{ kDa}$) isoliert und in 6 M HCl bei 140°C für 10 min (Mikrowelle DAP-30) hydrolysiert. Das eingedampfte Hydrolysat wurde in 2.5 ml 50 mM Ammoniumacetat-Puffer aufgenommen. 2 ml dieser Lösung wurden mit 12.5 nmol 3-Nitrotyrosin angereichert und auf eine 1.5 g AG1-X8 enthaltende Glassäule aufgetragen. Es wurde mit 8 ml Wasser (Fraktion II), 8 ml Essigsäure (Fraktion III) und 3 ml Wasser (Fraktion IV) gespült. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Aufnahme der eingedampften Fraktion III in 2 ml Wasser, Verdünnung 1:20 und Derivatisierung NBD-F-VD1 mit einem zu NBD-F-G4 analogen Gradienten mit dem Dionex-GP50-System.

Im zweiten Fall betrug die Wiederfindung von 3-Nitrotyrosin rund 8 nmol anstelle von 1.25 nmol. Die NBD-F-HPLC-Analyse einer analog behandelten BSA-Probe verdeutlichte, dass diese Überbestimmung vermutlich auf unzureichend hydrolysierte Oligopeptide aus BSA zurückzuführen war. Die in Abschnitt 3.3.6.2 diskutierte BSA-Hydrolysekinetik bestätigte diese Vermutung.

3.3.5 Immunaffinitätschromatographie (IAC)

Der polyklonale Antikörper Oxis 24312 aus Schaf wurde für die Entwicklung einer Immunaffinitätschromatographie(IAC)-Säule zur Abtrennung von 3-Nitrotyrosin von Matrixkomponenten aus Fein- und Straßenstaub verwendet. Der Antikörper wurde auf einer HiTrap-Säule (Amersham Biosciences) für Niederdruckflüssigchromatographie-Systeme immobilisiert. Die Matrix der Säule besteht aus NHS-aktivierter Sepharose. Außerdem wurde für Vergleichsexperimente eine γ -Rinderimmunglobulin-Säule hergestellt.

3.3.5.1 Kopplungseffizienz

Um eine Aussage über die Effizienz der Immobilisierung treffen zu können, wurden mittels NanoOrange-Assay die Proteinkonzentrationen der auf die HiTrap-Säule aufgetragenen und nach Kopplung eluierten Proteinlösungen bestimmt (*Tabelle 3.40*).

Tabelle 3.40: Für die Ligandenkopplung auf die HiTrap-Säulen aufgetragenen und nach der Ligandenkopplung eluierten Proteinmengen und die resultierenden Kopplungseffizienzen

Proteinlösung	Protein		Kopplungseffizienz [%]
	vor Kopplung [mg]	nach Kopplung [mg]	
γ -Globulin (Rind)	3.2	0.1	97
pAk Oxis 24312 (Schaf) ⁽²⁾	7.7	1.4	82

(2) - nach Größenausschlusschromatographie (>5 kDa)

Die Kopplungseffizienz von γ -Globulinen an die NHS-aktivierte Sepharose-Matrix lag bei 97 %, die von Proteinen im Schafserum Oxis 24312 bei 82 %. Die Proteinkonzentration für das gelieferte Schafserum wurde auf 29 g/l ermittelt.

3.3.5.2 Experimentelle Kapazitätsbestimmung

Die Nitrotyrosinkapazität der Oxis-IAC-Säule wurde auf zwei verschiedenen Wegen ermittelt. Im ersten Fall wurde eine Durchbruchkurve für 3-Nitrotyrosin sowohl auf der γ -Globulin-Säule als auch auf der Oxis-IAC-Säule mittels kompetitivem EIA erstellt. Im zweiten Fall wurde nur die Oxis-IAC-Säule verwendet und eine Durchbruchkurve für 3-Nitrotyrosin und Norleucin mittels NBD-F-HPLC-Analyse ermittelt. Durch Vergleich der Durchbruchkurven wurden zwei Kapazitäten der Oxis-IAC-Säule berechnet. In *Abbildung 3.77* sind Durchbruchkurven von 3-Nitrotyrosin der γ -Globulin- und der Oxis-IAC-Säule dargestellt.

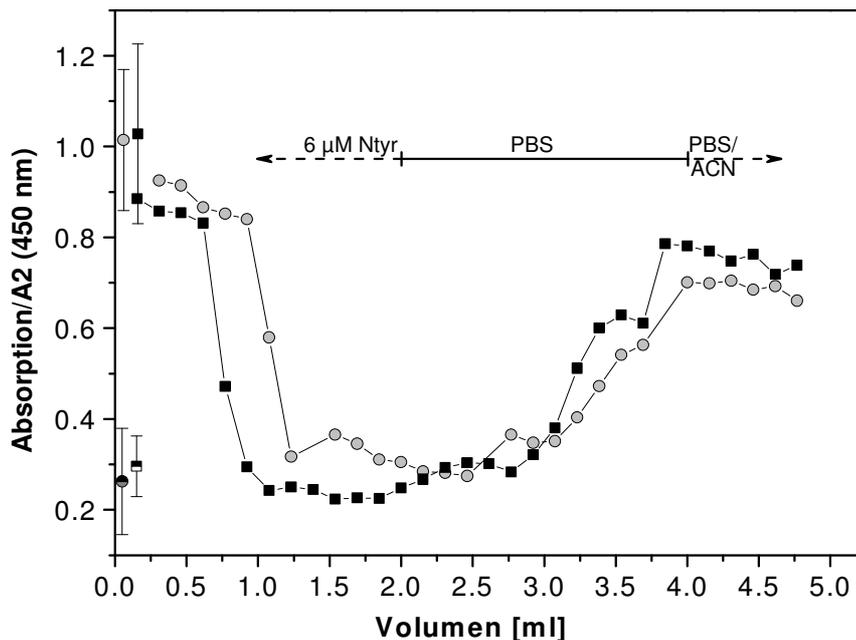


Abbildung 3.77: Durchbruchkurven von 3-Nitrotyrosin auf der γ -Globulin-Säule (I. -■-) und Oxis-IAC-Säule (II. -●-). Equilibrierung mit 10 ml PBS-Puffer, Auftrag von 2 ml 6 μ M 3-Nitrotyrosin-Lösung, Elution mit 4 ml PBS-Puffer (γ -Globulin-Säule) bzw. 2 ml PBS-Puffer und 3 ml 20% (v/v) ACN (Oxis-IAC-Säule). EIA-Parameter: Beschichtung: 0.05 mg/l Nitro-(14.3)-BSA, Primärantikörper: pAk Oxis 24312 (1:2 500), Sekundärantikörper: Anti-Schaf-IgG-POD (1:10 000). Das Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte zu Fraktionen von 154 μ l (4 Trp./Kavität) gesammelt und 100 μ l einer Fraktion in je eine Kavität einer weiteren Mikrotiterplatte als Inhibitionslösung für den kompetitiven EIA pipettiert. Dargestellt sind Median und Spannweite von PBS-Puffer als Blindlösung (Messung γ -Globulin-Säule (■), Messung Oxis-IAC-Säule (●)) sowie von 10 und 6 μ M 3-Nitrotyrosin (■ bzw. ●) im EIA.

Die Ordinate zeigt das Verhältnis der gemessenen Absorption einer Fraktion zu der maximalen Absorption (A2) der sigmoidalen Kalibrierkurve des kompetitiven EIA. Der Durchbruch erfolgte auf der γ -Globulin-Säule ab Fraktion 5, während der auf der Oxis-IAC-Säule ab Fraktion 7 stattfand. Dies entspricht einer Kapazität von 1.9 nmol (429 ng) 3-Nitrotyrosin. Das Totvolumen kann aus dem Durchbruch der γ -Globulin-Säule auf rund 770 μ l abgeschätzt werden. Zur Darstellung der Messunsicherheit wurden zusätzlich der Median und die Spannweite von PBS-Puffer (keine Konkurrenz) und 10 μ M bzw. 6 μ M 3-Nitrotyrosin (hohe Konkurrenz) der EIA-Messungen aufgetragen.

In *Abbildung 3.78* sind Durchbruchskurven von 3-Nitrotyrosin und Norleucin auf der Oxis-IAC-Säule nach NBD-F-HPLC-Analyse dargestellt.

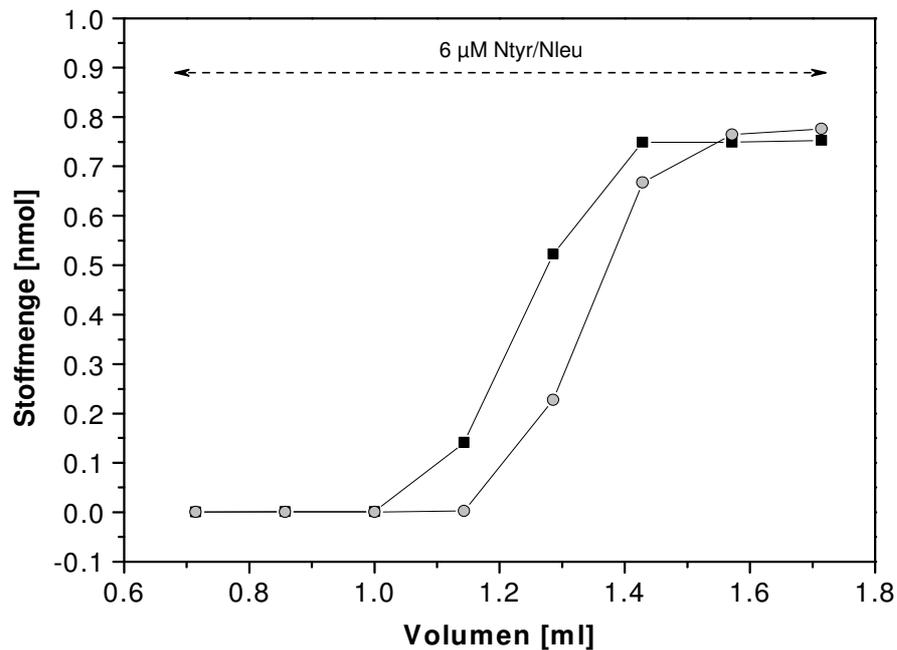


Abbildung 3.78: Durchbruchskurven von 3-Nitrotyrosin (III. -●-) und Norleucin (IV. -■-) auf der Oxis-IAC-Säule. Equilibrierung mit 10 ml PBS-Puffer, Auftrag von 2 ml 6 µM 3-Nitrotyrosin/Norleucin-Lösung, Elution mit 2 ml 50 % MeOH. Das Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte zu Fraktionen von 143 µl (4 Trp./Kavität) gesammelt, die Fraktionen vor Derivatisierung NBD-F-VD2 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mit Gradient NBD-F-G2 getrennt.

Der Durchbruch von 3-Nitrotyrosin erfolgt um eine Fraktion (143 µl) später als der von Norleucin. Dies entspricht einer geringeren Kapazität von 0,9 nmol (203 µg) 3-Nitrotyrosin als durch den Vergleich des Durchbruchs auf der γ -Globulin- und Oxis-IAC-Säule ermittelt wurde. Der Durchbruch von Norleucin auf der Oxis-IAC-Säule erfolgte um ca. eine Fraktion später als der Durchbruch von 3-Nitrotyrosin auf der γ -Globulin-Säule. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte ein größeres Totvolumen der Oxis-IAC-Säule mit 6 mg immobilisierten Schafserumproteinen sein und/oder eine Wechselwirkung von Norleucin mit immobilisierten Komponenten aus Schafserum. Eine unspezifische Wechselwirkung von Norleucin relativ zu 3-Nitrotyrosin mit der Sephadex-Matrix der HiTrap-Säule kann jedoch aufgrund der in *Abschnitt 3.3.5.3* diskutierten Ergebnisse ausgeschlossen werden.

3.3.5.3 Chromatographische Eigenschaften

Es wurde das Elutionsverhalten von 3-Nitrotyrosin und Norleucin auf der γ -Globulin-Säule mit PBS-Puffer näher untersucht. Hierfür wurden 1 nmol 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer injiziert und anschließend mit 4 ml PBS-Puffer eluiert.

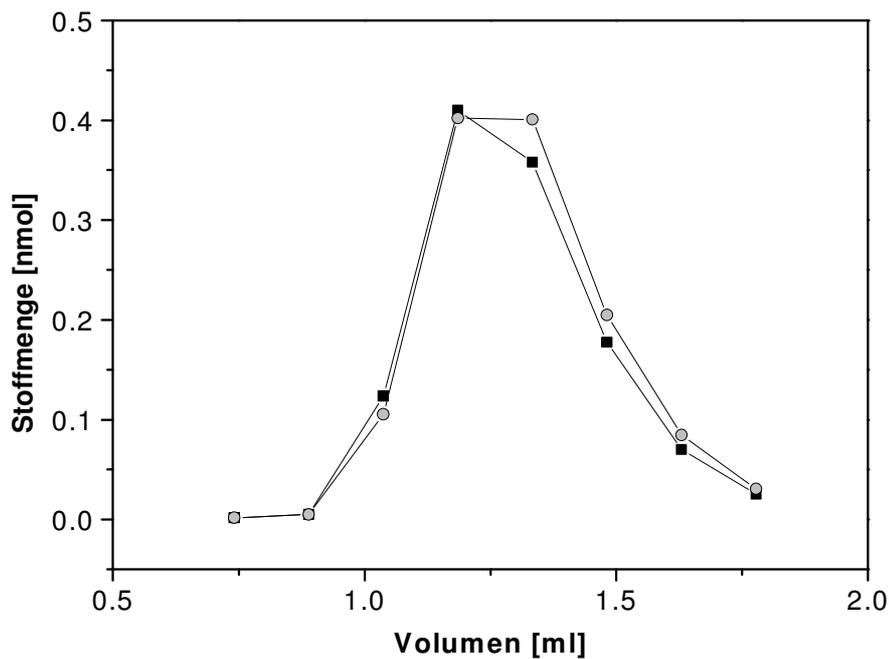


Abbildung 3.79: Standardchromatogramm von 3-Nitrotyrosin (●) und Norleucin (■) der γ -Globulin-Säule. Equilibrierung mit 10 ml PBS-Puffe, Injektion von 100 μ l 10 μ M 3-Nitrotyrosin/Norleucin-Lösung in PBS-Puffer, Elution mit 4 ml PBS-Puffer. Das Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte zu Fraktionen von 148 μ l (4 Trp./Kavität) gesammelt, die Fraktionen vor Derivatisierung NBD-F-VD2 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mit Gradient NBD-F-G2 getrennt.

3-Nitrotyrosin und Norleucin unterscheiden sich hinsichtlich ihres Elutionsprofils nicht. Damit können unspezifische Wechselwirkungen von 3-Nitrotyrosin mit der Sephadex-Matrix relativ zu Norleucin ausgeschlossen werden. Die Gesamtwiederfindungen von 3-Nitrotyrosin und Norleucin in den Fraktionen belaufen sich auf 1.25 nmol (125 %) und 1.19 nmol (119 %).

In einem weiteren Experiment wurde das Elutionsverhalten von 3-Nitrotyrosin relativ zu Norleucin auf der Oxis-IAC-Säule mittels Injektion von 1.0 nmol 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer untersucht. Das Oxis-IAC-Chromatogramm ist in *Abbildung 3.80* dargestellt. Es wurde ein Durchbruch von 3-Nitrotyrosin beobachtet. Der Analyt coeluiert mit Norleucin mit einer Fraktion Verzögerung, außerdem ist ein Tailing von 3-Nitrotyrosin zwischen 1.6-4.0 ml zu erkennen. Die ermittelte 3-Nitrotyrosin-Kapazität von 1.9 nmol ist offensichtlich nicht korrekt. Die Wiederfindungen betragen 1.15 nmol (115 %) für Norleucin und nach Abschätzung des Gehaltes der nicht mittels HPLC analysierten Fraktionen bei 0.94 nmol (94 %) für 3-Nitrotyrosin.

Nach Bestimmung der wahren Kapazität der Oxis-IAC-Säule von 0.9 nmol wurde eine Stoffmenge von 0.1 nmol von 3-Nitrotyrosin und Norleucin auf die Säule injiziert und das Trennungsverhalten mit PBS-Puffer und 50 % MeOH betrachtet (*Abbildung 3.81*).

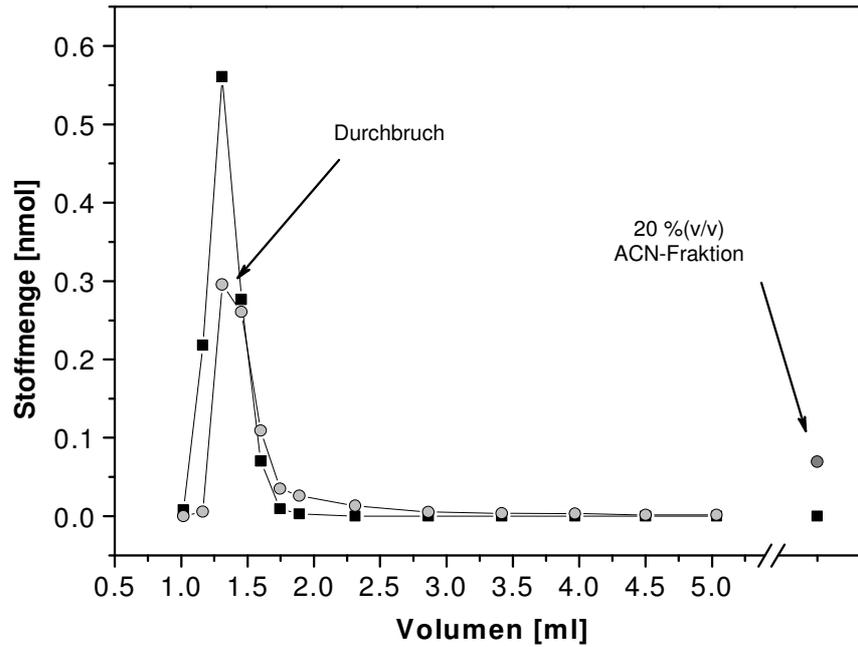


Abbildung 3.80: Oxis-IAC-Chromatogramm von 3-Nitrotyrosin (-●-) und Norleucin (-■-). Equilibrierung mit 10 ml PBS-Puffer, Injektion von 100 μ l 10 μ M 3-Nitrotyrosin/Norleucin-Lösung in PBS-Puffer, Elution mit 5 ml PBS-Puffer und 3 ml 20 % (v/v) ACN. Das Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte zu Fraktionen von 146, 138 und 133 μ l (4 Trp./Kavität) gesammelt, die Fraktionen vor Derivatisierung NBD-F-VD2 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mit Gradient NBD-F-G2 getrennt.

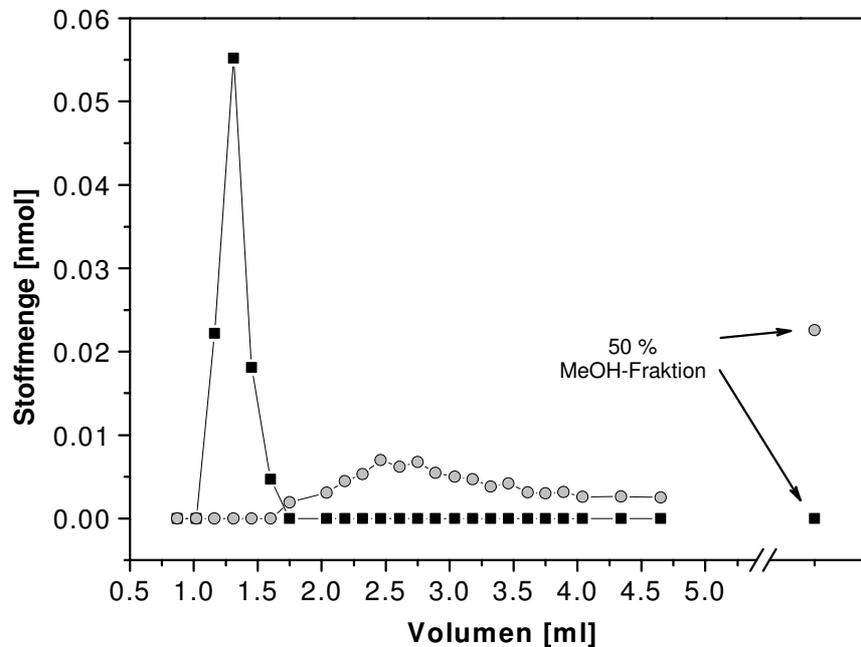


Abbildung 3.81: Oxis-IAC-Chromatogramm von 3-Nitrotyrosin (-●-) und Norleucin (-■-). Equilibrierung mit 10 ml PBS-Puffer, Injektion von 100 μ l 1 μ M 3-Nitrotyrosin/Norleucin-Lösung in PBS-Puffer, Elution mit 4 ml PBS-Puffer und 2 ml 50 % MeOH. Das Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte zu Fraktionen von 146, 143 und 153 μ l (4 Trp./Kavität) gesammelt, die Fraktionen vor Derivatisierung NBD-F-VD2 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mit Gradient NBD-F-G2 getrennt.

In diesem Fall fand kein Durchbruch wie in *Abbildung 3.80* statt. 3-Nitrotyrosin wird von Norleucin nahezu basisliniengetrennt. Die Gesamtwiederfindungen betragen 100 % für Norleucin und nach Abschätzung der drei nicht mittels HPLC-Analyse bestimmten Fraktionen 104 % für 3-Nitrotyrosin. Der Analyt wird bereits unter milden Bedingungen mit 4 ml PBS-Puffer zu 77 % partiell eluiert, während 23 % in der Methanol-Fraktion gefunden werden. Dieses Verhalten ist auf den polyklonalen Antikörper zurückzuführen, der zu 3-Nitrotyrosin sowohl hoch- als auch niedrigaffine Antikörper enthält. Die IAC-Säule wurde somit im Modus einer *weak affinity chromatography* und einer Affinitätsextraktion gefahren.

3.3.6 NBD-F-HPLC-Analytik

3.3.6.1 Allgemeines

In *Abschnitt 3.1.1* wurde die NBD-F-Derivatisierung und HPLC-Analytik von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin vorgestellt. Die Nachweisgrenzen von 3-Nitrotyrosin der Methoden NBD-F-VD1/NBD-F-G1 und NBD-F-VD2/NBD-F-G4 beläuft sich auf 10 nM (100 fmol) bzw. 12 nM (181 fmol). Am Institut für Wasserchemie wurde parallel an einer GC-MS-Methoden-etablierung zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin gearbeitet. Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Swati Bhowmik durchgeführt. 3-Nitrotyrosin wurde nach Reaktion mit Diazomethan und Heptafluorbuttersäureanhydrid als sein O-methyliertes Heptafluorbutyramid-Methylester-Derivat mittels GC-NCI-MS analysiert. Die Nachweisgrenzen von 3-Nitrotyrosin der entwickelten Methode belief sich auf 50 nM (NCI, SIM-Modus, $[M] = 450$, $S/N = 3$).^[347] Es wurde zur Analyse von 3-Nitrotyrosin in Fein- und Straßenstaubproben mit der NBD-F-Derivatisierung fortgefahren, da diese 5-mal empfindlicher als die GC-MS-Methode und einfacher, schneller und sicherer durchzuführen ist. 3-Nitrotyrosin kann mit der vorgestellten OPA/MPA-Derivatisierung nicht nachgewiesen werden.

3.3.6.2 Proteinhydrolyse

Die Proteinhydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol bei 5 bar und 30 min (HM6) erwies sich im Vergleich zu der Hydrolyse in 4.7 M HCl (HM1 und HM2) hinsichtlich der Wiederfindung von 3-Nitrotyrosin aus Nitro-(7.4)-BSA als optimal (*Abschnitt 3.1.4.7*). Die Hydrolysemethode HM6 eignet sich in Kombination mit Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 für die Bestimmung des Nitrotyrosingehaltes und für die simultane Quantifizierung von Nitroproteinen. Es zeigte sich, dass die Hydrolysestabilität von 3-Nitrotyrosin vergleichbar ist mit der von Tyrosin. Unter den Bedingungen HM2 und HM6 ergeben sich Wiederfindungsverhältnisse von 3-Nitrotyrosin zu Tyrosin von 1.1 ± 0.2 bzw. 0.9 ± 0.1 . In

einer Veröffentlichung von *GIESE*^[348] wurde 3-Nitrotyrosin aufgrund seiner hohen Hydrolysestabilität in einer Lösung von 6 M HCl als interner Standard für die Aminosäureanalytik vorgeschlagen. Diese Schlussfolgerung konnte im Rahmen dieser Arbeit unter den Bedingungen der mikrowelleninduzierten Proteinhydrolyse nicht gezogen werden. 3-Nitrotyrosin und Tyrosin unterliegen einer ausgeprägten t_H -abhängigen Zersetzung in 4.7 M HCl in Borosilikatgläsern (*Abschnitt 3.1.4.6*). Es stellte sich heraus, dass eine Phenolpräsenz im Hydrolysemedium Voraussetzung für eine hohe Wiederfindung des Analyten ist (*Abschnitt 3.1.4.7*). Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Vergleichsstudie von *MORTON* et al.^[293], der Wiederfindungen von 3-Nitrotyrosin in verschiedenen Hydrolysegefäßen bestimmte (*Abschnitt 2.4.3.2*).

Für eine Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Fein- und Straßenstaub ist entscheidend, dass keine Coelution von Störkomponenten im R_t -Bereich von 3-Nitrotyrosin auftritt. Dies können nichtproteinogene Matrixbestandteile oder unzureichend hydrolysierte Oligopeptide von PM2.5-Proteinen sein. Es wurde daher eine Hydrolysekinetik mit Nitro-(7.5)-BSA nach einer Hydrolysevorschrift von *FRANZE*^[10] in 6 ml 6 M HCl für 10, 20 und 30 min bei 140 °C (Mikrowelle DAP-30) durchgeführt.

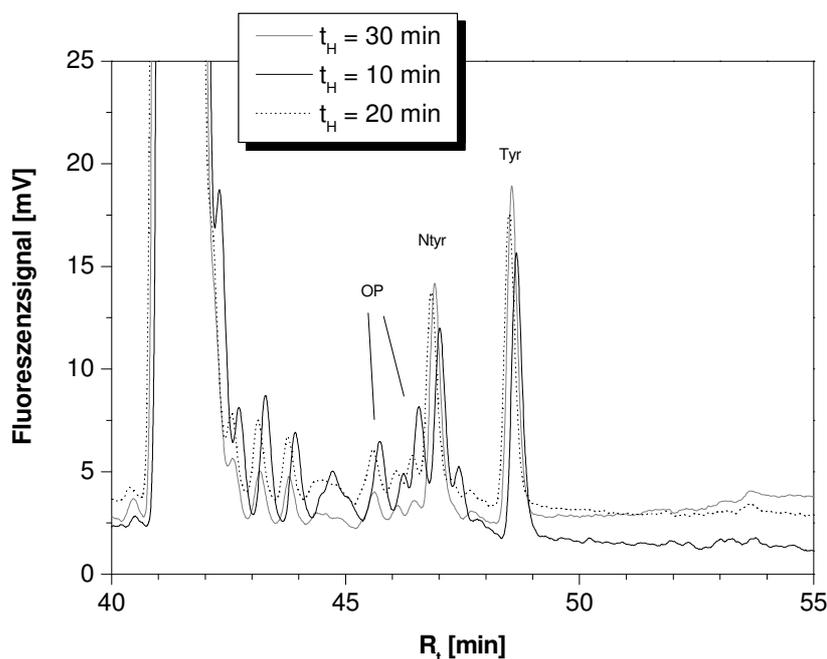


Abbildung 3.82: HPLC-FD-Chromatogramm von Nitro-(7.5)-BSA (411 μ g, Aufnahme des Hydrolysates in 2 ml Wasser, Verdünnung 1:100) nach Hydrolyse in 6 ml 6 M HCl bei 140 °C für 10, 20 und 30 min (Mikrowelle DAP-30). Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung NBD-F-VD2 mit einem zu NBD-F-G4 analogen Gradienten mit dem Dionex-GP50-System.

Dieses Hydrolyseverfahren wurde vor Beginn dieser Arbeit und der Entwicklung der *Mars5*-Methoden in der Aerosol-Arbeitsgruppe angewendet. Es zeigte sich, dass die Hydrolyse

nach 10 min noch nicht vollständig abgeschlossen war und daher unzureichend hydrolysierte Oligopeptide im R_f -Bereich von 3-Nitrotyrosin coeluierten. Im Rahmen der Hydrolyseoptimierungen der *Mars5*-Methoden wurde nach Coelution von Oligopeptiden aus BSA in entsprechenden HPLC-FD-Chromatogrammen geschaut (*Abbildung 3.83*).

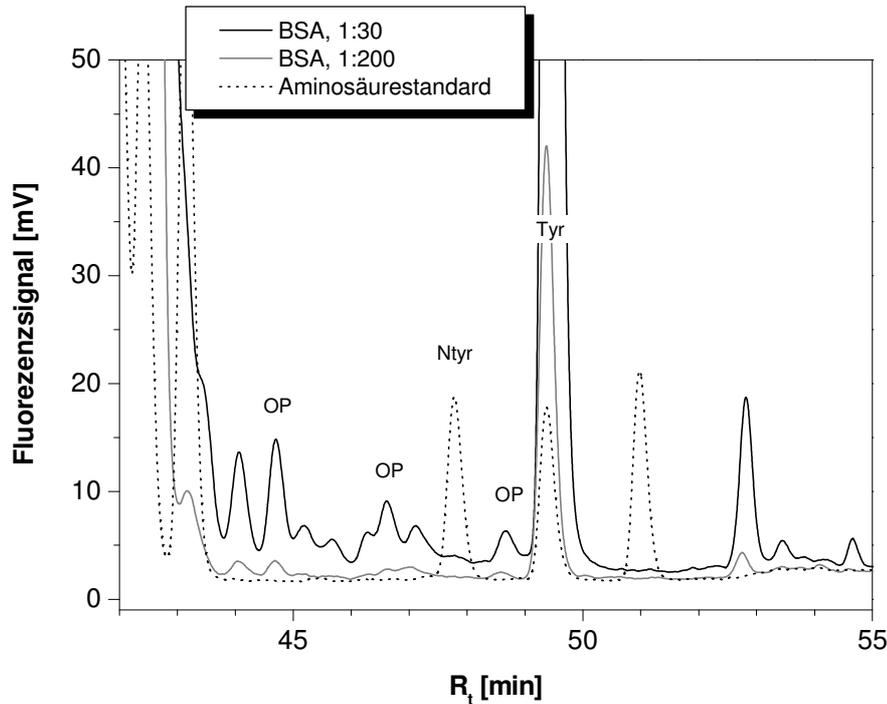


Abbildung 3.83: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung (0.2 μ M AA-S-18, 3-Nitrotyrosin, Norleucin, 0.4 μ M α -Methyltyrosin) und BSA (401 μ g) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 35 min, 4 bar (HM1). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Aufnahme des BSA-Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:30 bzw. 1:200 und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

Im HPLC-FD-Chromatogramm von BSA in der Verdünnung 1:30 zeigt sich ein kleiner Peak im Elutionsbereich von 3-Nitrotyrosin. Hierbei könnte es sich um 3-Nitrotyrosin aus BSA, das aufgrund einer natürlichen *in vivo*-Proteinnitrierung entstanden ist, oder um ein schwer hydrolysierbares Oligopeptid handeln. Im Falle einer Störkomponente stört diese die Nitrotyrosinanalytik in Nitroproteinhydrolysaten nicht, da deren Nitrotyrosingehalt sehr hoch ist.

3.3.6.3 Atmosphärische Feinstaubproben

Es wurden zwei atmosphärische Feinstaubproben nach Proteinhydrolyse HM6 auf ihren Nitrotyrosingehalt mittels der NBD-F-HPLC-Methode untersucht. In HPLC-FD-Chromatogrammen der Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 wurden mehrere Peaks im R_t -Bereich von 3-Nitrotyrosin beobachtet (Abbildung 3.84).

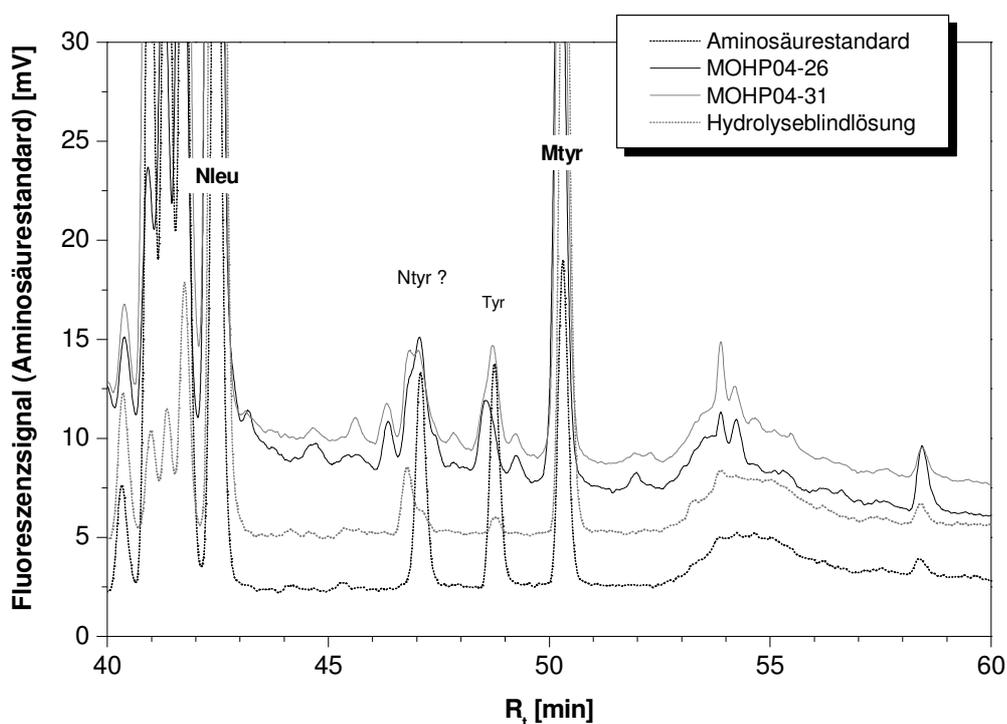


Abbildung 3.84: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung (0.2 μM AAS, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und 0.4 μM α -Methyltyrosin), der WSP(>5 kDa)-Fraktion der PM2.5-Proben MOHP04-26 und MOHP04-31 nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6) mit Norleucin (1 nmol). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) der PM2.5-Proben erfolgte nach Extraktion EM1 (3.1 und 2.1 mg PM2.5), SEC, Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Addition von 1 nmol α -Methyltyrosin und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4. Das Hydrolysat der Hydrolyseblindlösung wurde ebenfalls in 1 ml Wasser vor der Derivatisierung aufgenommen.

Diese Peaks konnten mit dem HPLC-Gradienten NBD-F-G2 aufgelöst werden (Abbildung 3.85). Die bei 3-Nitrotyrosin eluierende Verbindung konnte dem Analyten jedoch nicht zugeordnet werden, da sich bei Berücksichtigung der R_t -Verschiebung der Probe gegenüber dem Aminosäurestandard keine eindeutige R_t -Übereinstimmung für 3-Nitrotyrosin ergab. Außerdem wurde ein Blindwert beobachtet, der auf den Eintrag einer Kontamination während der Hydrolyse schließen lässt.

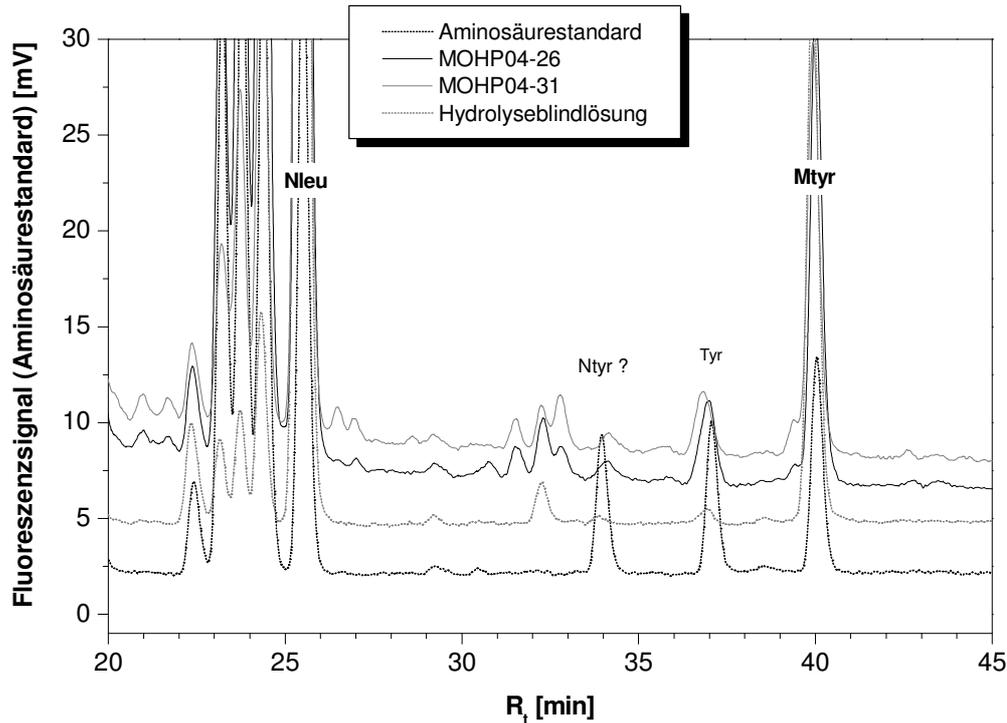


Abbildung 3.85: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung ($0.2 \mu\text{M}$ AAS, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und $0.4 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin), der WSP(>5 kDa)-Fraktion der PM_{2.5}-Proben MOHP04-26 und MOHP04-31 nach Hydrolyse in 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol, 30 min, 5 bar (HM6) mit Norleucin (1 nmol). Probenvorbereitung siehe Abbildung 3.84. Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G2.

3.3.6.4 Straßenstaubproben

Die makromolekulare Fraktion (>5 kDa) der Straßenstaubprobe K101 (<63 μm) nach Hydrolyse in 6 M HCl bei 140°C für 10 min (Mikrowelle DAP-30) wurde mit der NBD-F-HPLC-EIA-Methode auf Anwesenheit von 3-Nitrotyrosin untersucht (Abschnitt 3.3.3.2). Da ein hoher Anteil von Matrixkomponenten im HPLC-FD-Chromatogramm dieser Probe zu beobachten war, erschien dieser Ansatz sinnvoll. Das Inhibitionssignal der vermeintlichen Nitrotyrosinfraktion im kompetitiven EIA lag wie in Abbildung 3.86 ersichtlich unterhalb der Nachweisgrenze ($S/N = 3$).

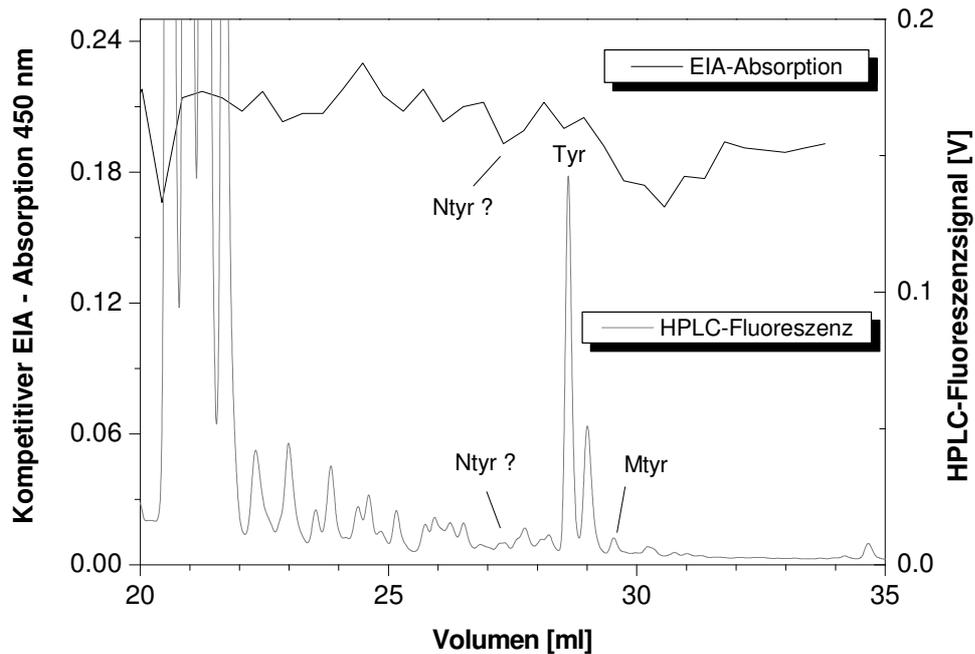


Abbildung 3.86: HPLC-FD-Standardchromatogramm und Absorption bei 450 nm im kompetitiven Enzymimmunoassay des Hydrolysates der Straßenstaubprobe K101 (<math>< 63 \mu\text{m}</math>) nach Derivatisierung NBD-F-VD1 und HPLC-Trennung. Die Straßenstaubprobe (200 mg) wurde zuvor analog zu EM1 in 6 ml PBS-Azid-Puffer extrahiert, die makromolekulare Fraktion (>5 kDa) isoliert und in 6 M HCl bei 140 °C für 10 min (Mikrowelle DAP-30) hydrolysiert. Das eingedampfte Hydrolysat wurde in 0.5 ml Wasser aufgenommen und bei 1:2-Verdünnung mit 1 μM α -Methyltyrosin aufgestockt. HPLC- und EIA-Parameter: siehe Abbildung 3.75.

Es sind makromolekulare Fraktionen (>5 kDa) der Straßenstaubproben W101, W12 und W14, die von FRANZE^[10,13] mittels EIA positiv getestet wurden, nach Proteinhydrolyse HM2 und Nitrotyrosinextraktion mittels Anionenaustauscher AG1-X8 auf ihren Gehalt von 3-Nitrotyrosin mit der NBD-F-HPLC-Methode untersucht worden. Es kann den Nitro-(7.4)-BSA-Hydrolysen aus *Abschnitt 3.1.4.6* zufolge unter den Bedingungen HM2 mit einer Nitrotyrosinwiederfindung von rund 80 % gerechnet werden. Die Trennung mit HPLC-Gradient NBD-F-G4 stieß dabei auf wenig Erfolg, da Matrixinterferenzen beobachtet wurden (*Abbildung 3.87*). Im Gegensatz zu reinen Nitroproteinlösungen, in denen der Nitrotyrosingehalt sehr hoch ist, stören in Proben mit geringem Nitrotyrosingehalt im R_f -Bereich von 3-Nitrotyrosin coeluierende schwer hydrolysierbare Oligopeptide die Nitrotyrosinbestimmung.

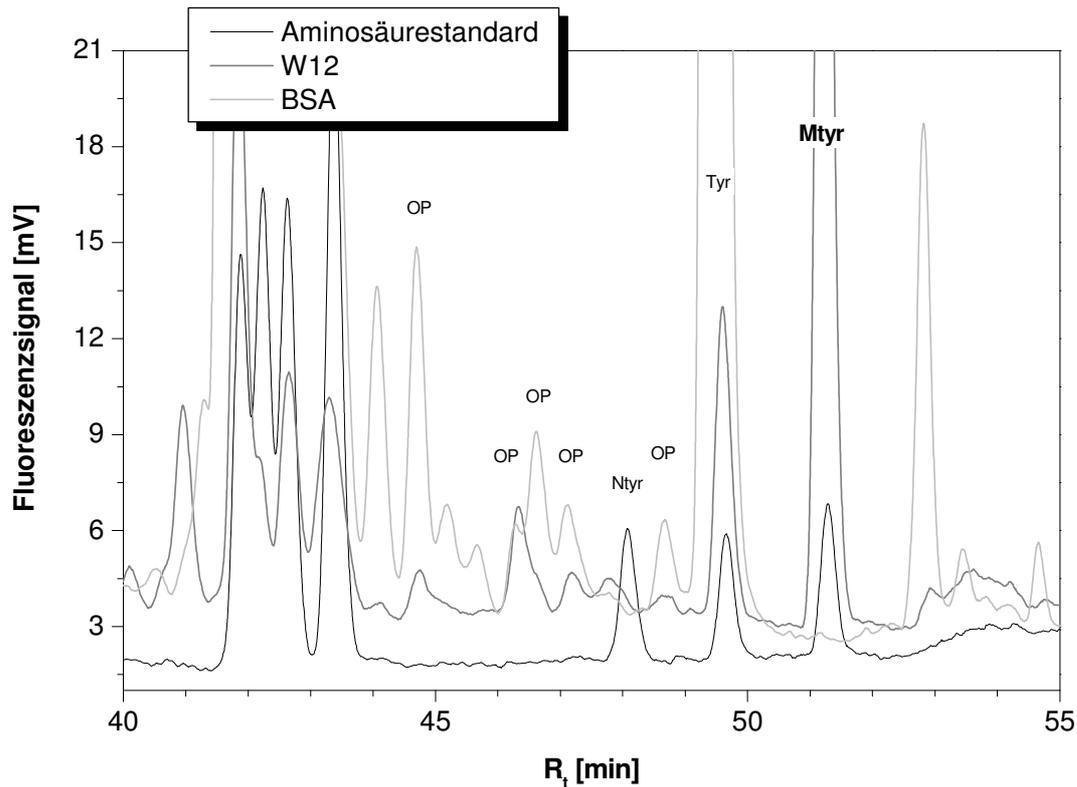


Abbildung 3.87: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung ($0.05 \mu\text{M}$ AA-S-18, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und $0.1 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin), der WSP(>5 kDa)-Fraktion der Straßenstaubprobe W12 und BSA ($400.5 \mu\text{g}$, Aufnahme des Hydrolysates in 1 ml Wasser, Verdünnung 1:30, Derivatisierung NBD-F-VD2, Gradient NBD-F-G4) nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 45 min, 4 bar (HM2). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) der Straßenstaubprobe erfolgte nach EM4 (100 mg Straßenstaub), SEC, AG1-X8, Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

Eine Trennung von Matrixkomponenten und einem Peak im Elutionsbereich von 3-Nitrotyrosin der Straßenstaubhydrolysate W12 und W14 ist mit HPLC-Gradient NBD-F-G2 jedoch gelungen (Abbildung 3.88 und Abbildung 3.89). Die Analyse einer Methodenblindlösung, die entsprechend der Umweltproben behandelt wurde, weist auf keine Kontaminationen durch die während der Probenvorbereitung verwendeten Reagenzien und Lösungen hin. Der bei 3-Nitrotyrosin eluierende Peak liegt jedoch unterhalb der Nachweisgrenze ($S/N = 3$).

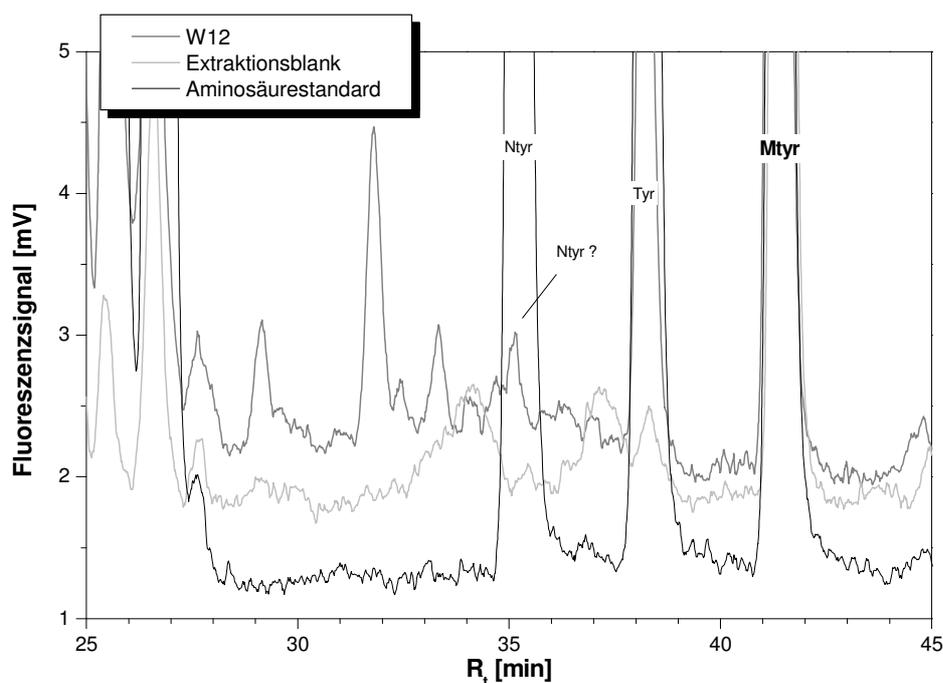


Abbildung 3.88: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung ($0.6 \mu\text{M}$ AAS, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und $1.2 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin), der WSP(>5 kDa)-Fraktion der Straßenstaubprobe W12 und einer Extraktionsblindlösung nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 45 min, 4 bar (HM2). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach EM4 (100 mg Straßenstaub), SEC, AG1-X8, Aufnahme in 1 ml $1 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin, Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G2.

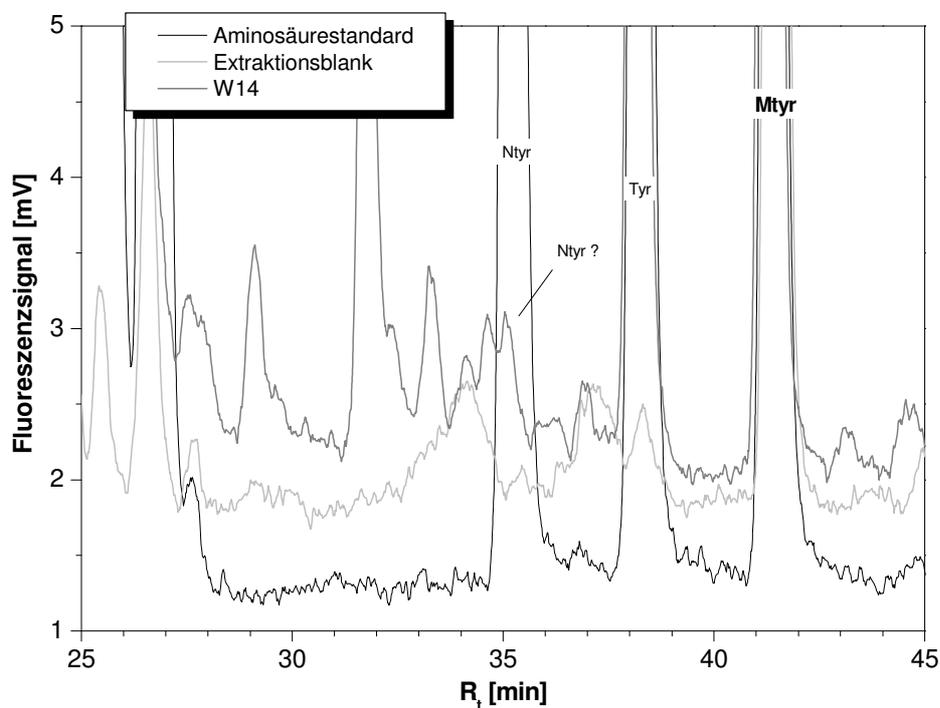


Abbildung 3.89: HPLC-FD-Chromatogramm einer Aminosäurestandardlösung ($0.6 \mu\text{M}$ AAS, 3-Nitrotyrosin, Norleucin und $1.2 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin), der WSP(>5 kDa)-Fraktion der Straßenstaubprobe W14 und einer Extraktionsblindlösung nach Hydrolyse in 4.7 M HCl, 45 min, 4 bar (HM2). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach EM4 (100 mg Straßenstaub), SEC, AG1-X8, Aufnahme in 1 ml $1 \mu\text{M}$ α -Methyltyrosin, Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G2.

In Probe W101 zeigten sich deutliche Matrixinterferenzen, so dass keine Trennung der Komponenten im R_t -Bereich von 3-Nitrotyrosin möglich war (Abbildung 3.90).

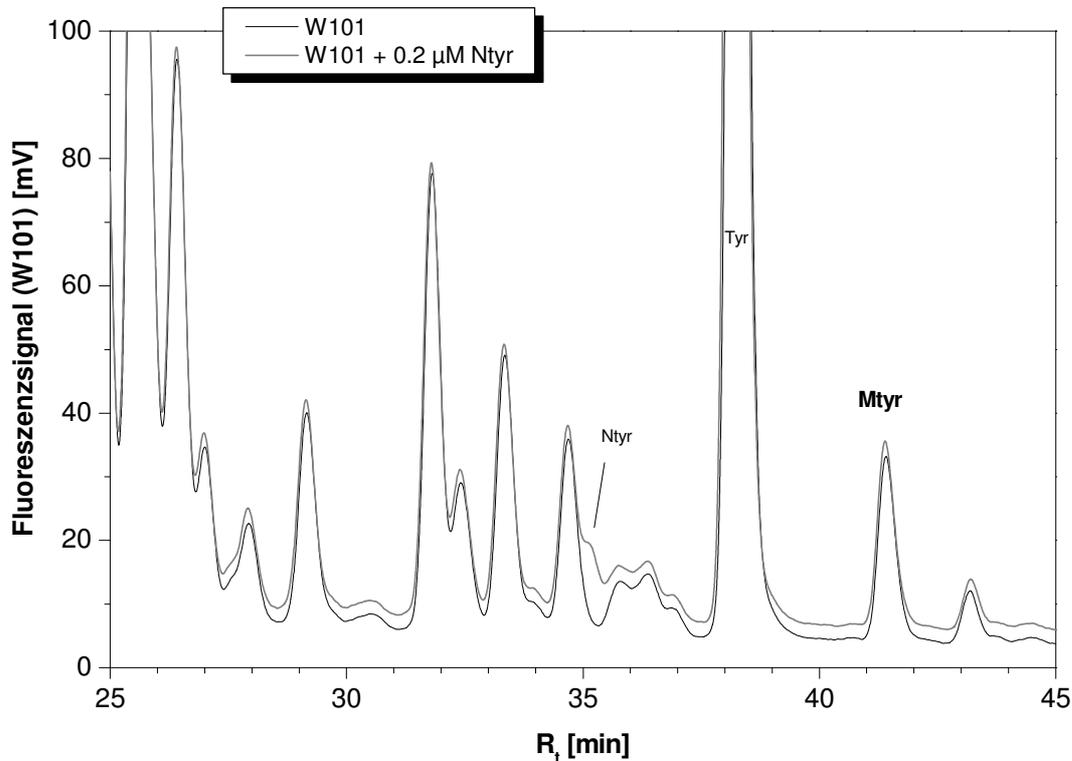


Abbildung 3.90: HPLC-FD-Chromatogramm der WSP(>5 kDa)-Fraktion der Straßenstaubprobe W101 (nichtaufgestockt und mit 0.2 μM 3-Nitrotyrosin aufgestockt). Die HPLC-Analytik (Dionex-P580HPG-System) erfolgte nach Extraktion EM4 (100 mg Straßenstaub), SEC, Hydrolyse in 4.7 M HCl, 45 min, 5 bar (HM2), AG1-X8-Anreicherung, Aufnahme der Probe in 1 ml 1 μM α -Methyltyrosin und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G2. 3-Nitrotyrosin wurde unmittelbar vor der Derivatisierung in die Probe zugegeben.

Die Probe wurde unmittelbar vor der Derivatisierung mit 0.2 μM 3-Nitrotyrosin aufgestockt, um die Reproduzierbarkeit der Methode im Allgemeinen und die Coelution im Speziellen zu demonstrieren.

Aus diesen Untersuchungen kann unter Annahme einer 100 % Protein- bzw. Nitrotyrosinwiederfindung zu jeder Phase der Probenvorbereitung aus der HPLC-NWG der Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G4 von 11.6 nM eine Maximalkonzentration an 3-Nitrotyrosin in den untersuchten Straßenstaubproben W12 und W14 von 0.15 $\mu\text{mol/kg}$ bzw. 34 $\mu\text{g/kg}$ (ppb) Feinstaub abgeschätzt werden. Aus den von FRANZE ermittelten Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentrationen würde sich ein Nitrotyrosingehalt von rund 1 $\mu\text{mol/kg}$ ergeben.

3.3.7 Diskussion

Die zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin in Straßen- und atmosphärischen Feinstaubproben durchgeführten Analysen ergaben, dass eine Identifizierung des Analyten direkt aus Proteinhydrolysaten ohne eine selektive Probenvorbereitung mit den entwickelten NBD-F-HPLC-Methoden nicht möglich ist. Die Analysen wurden durch schwer hydrolysierbare Oligopeptide gestört. Eine höhere Selektivität der Methode kann im Allgemeinen durch eine Optimierung der Proteinhydrolyse und eine selektive Anreicherung erzielt werden. Im Fall der Proteinhydrolyse könnte eine Verlängerung der Hydrolysezeiten eine vollständige Spaltung von schwer hydrolysierbaren Oligopeptiden bewirken und 3-Nitrotyrosin, sofern es unter den entsprechenden Bedingungen stabil ist, mittels der NBD-F-HPLC-Methoden selektiv nachgewiesen werden. In 4.7 M HCl zeigte der Analyt jedoch eine ausgeprägte t_H -abhängige Hydrolyseinstabilität. Eine entsprechende Stabilitätsstudie von 3-Nitrotyrosin in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol wurde nicht durchgeführt. Erste Experimente deuten jedoch eine höhere Stabilität von 3-Nitrotyrosin unter diesen Bedingungen an (*Abschnitt 3.1.4.7*). Die Anreicherung von 3-Nitrotyrosin mittels Anionenaustauscherharz AG1-X8 in Kombination mit den NBD-F-HPLC-Methoden ermöglicht prinzipiell die Abtrennung von 3-Nitrotyrosin von Matrixkomponenten aus Straßenstaubhydrolysaten. Die Durchführung einer NBD-F-HPLC-Analyse in Kombination mit einem kompetitiven EIA mit Nitrotyrosin-spezifischen Antikörpern kann in diesem Fall die Sicherheit einer unsicheren Identifizierung deutlich erhöhen. Als Alternative zur NBD-F-HPLC-EIA-Methode steht außerdem die GC-NCI-MS-Analyse zur Verfügung, die in Kombination mit der AG1-X8-Extraktion nicht getestet wurde. Die entwickelte IAC-Säule mit dem Nitrotyrosin-spezifischen polyklonalen Antikörper Oxis 24312 ermöglicht die Trennung von 3-Nitrotyrosin und Norleucin als Repräsentant nichtbindender Aminosäuren. Die Säule wurde jedoch in Anwesenheit von hohen Mengen an Tyrosin, zu dem der Antikörper eine Affinität von 10^3 l/mol und eine Kreuzreaktivität von 0.1 % besitzt, nicht getestet.^[10] Die Anwendbarkeit der IAC-Säule zur Abtrennung von 3-Nitrotyrosin aus Protein-, Fein- und Straßenstaubproben bleibt somit im Rahmen dieser Arbeit offen. Da die Trennung unter isokratischen Bedingungen außerdem ein großes Peakvolumen von 3-Nitrotyrosin zur Folge hat, ist die Eignung des polyklonalen Antikörpers für eine schnelle effiziente Anreicherung des Analyten im Sinne der *weak affinity chromatography* fraglich. Im Rahmen einer Weiterentwicklung der IAC-Trennung empfiehlt sich daher die Elution des Analyten mit einem Puffer mit saurem pH-Wert, wie z. B. dem in *Abschnitt 3.3.3.2* diskutierten HOAc-Puffer, oder die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers mit niedrigerer Affinität. Um eine Kompatibilität mit der NBD-F-HPLC-Methode zu gewährleisten, sollte der Puffer leichtflüchtige Puffersalze enthalten oder mit Wasser eluiert werden. Eine Weiterentwicklung der selektiven Probenvorbereitung ist für einen Nachweis von 3-Nitrotyrosin in atmosphärischen Aerosolen und in Straßenstaub unbedingt notwendig.

Wird eine Selektivitätssteigerung erreicht, wird außerdem eine Optimierung der Extraktion und der Größenfraktionierung zur Erhöhung der Proteinausbeute empfohlen (*Abschnitt 3.2.8*). Aus den Analysen kann ein maximaler Nitrotyrosingehalt in den untersuchten Straßenstaubproben im mittleren ppb-Bereich angenommen werden. Die extrahierten Probenmengen sollte daher ebenfalls erhöht werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Makromolekulare bioorganische Verbindungen wie Lignin, Cellulose, huminstoffartige Substanzen (HULIS) und Proteine sind Bestandteile der organischen Fraktion (OC) des atmosphärischen Aerosols. Sie haben Einfluss auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften und gesundheitlichen Effekte der Aerosolpartikel. Da die chemische Zusammensetzung von Aerosolpartikeln hochvariabel und deren Analyse nicht trivial ist, ist wenig über den Massenanteil dieser Verbindungen bekannt. Der Proteinanteil in Feinstaub liegt nach Literaturangaben im Bereich von 2-8 %. Proteine wie z. B. Pollenallergene werden außerdem durch Spurengase des photochemischen Smogs wie Stickoxide und Ozon posttranslational modifiziert. Die Reaktion von Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin hat eine Erhöhung des allergenen Potentials von Proteinen zur Folge und stellt einen Erklärungsansatz für den beobachteten Zusammenhang zwischen allergischen Atemwegserkrankungen und Gesundheitseffekten von verkehrsbedingter Luftverschmutzung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden selektive Methoden der Proteinhydrolyse und Aminosäureanalytik für die Bestimmung von Proteinen und nitrierten Proteinen im atmosphärischen Aerosol entwickelt, charakterisiert und erprobt.

Aminosäureanalytik

Für die Analyse von proteinogenen Aminosäuren wurden Methoden der Vorsäulenderivatisierung und RP-Flüssigchromatographie entwickelt und angewendet. Als Fluoreszenzmarker wurden 4-Fluoro-7-nitro-benzoxadiazol (NBD-F) und *o*-Phthaldialdehyd/3-Mercaptopropionsäure (OPA/MPA) eingesetzt. Der HPLC-Gradient NBD-F-G4 trennt sowohl die 15 proteinogenen Aminosäuren Histidin, Arginin, Aspartat, Glycin, Glutamat/Threonin, Alanin, Prolin, Methionin, Valin, Cystin, Lysin, Phenylalanin Isoleucin, Leucin und Tyrosin als auch 3-Nitrotyrosin mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5) und MeOH als HPLC-Eluenten (*Abschnitt 3.1.1*). Als interne Standards kommen Norleucin und α -Methyltyrosin zum Einsatz. Die Nachweisgrenzen liegen im mittleren nM- bzw. oberen fmol-Bereich (*on column*). Der HPLC-Gradient OPA-G1 trennt sowohl die 15 proteinogenen Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Arginin, Alanin Tyrosin, Valin, Methionin, Phenyl-

alanin, Isoleucin, Leucin und Lysin als auch Ornithin mit 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH = 6.5) und Methanol/Acetonitril als HPLC-Eluenten (*Abschnitt 3.1.2*). Als interner Standard kann Norvalin eingesetzt werden. Die Nachweisgrenzen liegen im unteren nM- bzw. mittleren fmol-Bereich. Eine Bestimmung von 3-Nitrotyrosin ist in diesem Fall nicht möglich. Die OPA-Methode erwies sich als die empfindlichere und die hinsichtlich Flächenreproduzierbarkeit und R_f -Stabilität robustere Methode (*Abschnitt 3.1.3*).

Mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse

Für die Bestimmung von Proteinen in reinen Lösungen, atmosphärischen Aerosolpartikeln und Straßenstaub mittels Aminosäureanalytik wurde eine mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse entwickelt. Die Hydrolysen wurden in dem Mikrowellensystem *Mars5* unter Druckkontrolle im Gasphasenmodus mit eigens entwickelten Hydrolyseeinsätzen durchgeführt (*Abschnitt 3.1.4.1*). Die mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse wurde auf Anwendbarkeit für die allgemeine Protein- und Nitroproteinanalytik hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit getestet. BSA und Nitro-(7.4)-BSA kamen als Standardproteine zur Anwendung.

Es zeigte sich, dass die Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure bei 5 bar für 60 min in Kombination mit der OPA-HPLC-Methode für die Proteinquantifizierung gut geeignet ist (*Abschnitt 3.1.4.8*). Die Wiederfindung von BSA beläuft sich unter diesen Bedingungen auf 91 %. Die Verwendung von Norvalin als Hydrolysestandard ist zur Kompensation von Probenverlusten jedoch notwendig. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 1.3 µg/ml (0.4 µg) Protein (*Abschnitt 3.1.4.5*). Eine Proteinidentifizierung mittels eines Vergleiches der experimentell ermittelten mit den in Nukleinsäure- oder Proteindatenbanken abgelegten Aminosäurezusammensetzungen wird optimaler Weise mit einer 30-minütigen Hydrolyse in identischem Hydrolysemedium durchgeführt (*Abschnitt 3.1.4.8*). Die Extrapolation von hydrolysezeitabhängigen Aminosäuredaten erhöht die Zuverlässigkeit der Proteinidentifizierung.

Für die Bestimmung des Nitrotyrosingehaltes von Nitroproteinen erwies sich die Hydrolyse in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol in Kombination mit der NBD-F-HPLC-Methode als gut geeignet (*Abschnitt 3.1.4.7*). Die Wiederfindung von 3-Nitrotyrosin aus Nitro-(7.4)-BSA beträgt unter diesen Bedingungen 113.9 ± 3.3 %. Die Hydrolyse von Nitroproteinen wurde außerdem in 4.7 M HCl getestet. Hier zeigte sich eine ausgeprägte hydrolysezeitabhängige Säurelabilität von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin (*Abschnitt 3.1.4.6*).

Proteinquantifizierung

Für die Proteinquantifizierung wurden der Micro-BCA- und NanoOrange-Assay parallel zu der Aminosäureanalytik herangezogen (*Abschnitt 3.1.5*). Der kolorimetrische BCA-Assay ist mit einer Nachweisgrenze von 1.1 µg/ml (0.2 µg) Protein genauso empfindlich wie die Pro-

teinhydrolyse/Aminosäureanalytik-Methode. Der auf einem Fluoreszenzfarbstoff basierende NanoOrange-Assay erlaubt jedoch eine um eine Größenordnung empfindlichere Detektion im Vergleich zu beiden zuvor genannten Verfahren. Seine Nachweisgrenze beträgt 0.1 µg/ml (0.02 µg) Protein.

Proteinquantifizierung in Feinstaub

Proteine in atmosphärischen Aerosolpartikeln kommen in zellfragment- oder zellgebundener Form in primären biologischen oder in auf organischen Partikeln freier adsorbierter Form vor (*Abschnitt 2.1.5*). Der Gesamtproteingehalt (TP), also die Gesamtheit beider genannten Proteinformen, wurde durch eine direkte Hydrolyse von PM_{2.5}-Filterstücken ermittelt (*Abschnitt 3.2.1*). Dieses Verfahren wurde jedoch nicht durch Hydrolysekinetik- und Standardadditionsexperimente auf eine quantitative Freisetzung von zellfragment- oder zellgebundenen Proteinen untersucht. Der wasserlösliche (WSP) bzw. der größenfraktionierte wasserlösliche Proteingehalt (WSP(>5 kDa)) wurde über eine Hydrolyse des wässrigen PM_{2.5}-Extraktes vor bzw. nach Größenausschlusschromatographie erfasst (*Abschnitt 3.2.1*).

Die mikrowelleninduzierte Proteinhydrolyse wurde hinsichtlich der Wiederfindungen von BSA in PM_{2.5}-Matrix in Abhängigkeit des Hydrolysemediums und der Hydrolysezeit getestet. Eine Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure erwies sich als optimales Hydrolysemedium für die Proteinbestimmung (*Abschnitt 3.2.4.3*). Die Wiederfindungen von 1-103 µg BSA betragen nach 60-minütiger Hydrolyse in der WSP-Fraktion 78-93 % und in der WSP(>5 kDa)-Fraktion 59-90 %. Die Proteinwiederfindung konnte durch Einsatz von Ascorbinsäure als Antioxidans signifikant erhöht werden. Die Durchführung einer Hydrolysekinetik in PM_{2.5}-Matrix verdeutlichte, dass Hydrolysezeiten von mind. 60 min für eine vollständige Hydrolyse von wasserlöslichen atmosphärischen Proteinen nötig ist.

Der Proteingehalt atmosphärischer Aerosolpartikel, die am Meteorologischen Observatorium Hohenpeißenberg (MOHP) und am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie in München-Großhadern (IWC) gesammelt wurden, sind mittels den oben beschriebenen Methoden bestimmt worden. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte aus den mittels Aminosäureanalytik ermittelten Aminosäuredaten als eine auf den BSA-Massenanteil bezogene Äquivalentmasse (*Abschnitt 3.2.2*). Eine genaue Aussage über atmosphärische Proteinkonzentrationen und den Proteinanteil an der Gesamtmasse der Feinstaubpartikel konnte aufgrund schlechter Proteinwiederfindungen der Extraktion und Größenausschlusschromatographie (11 % bzw. 26.2-78.9 %) nicht getroffen werden (*Abschnitt 3.2.4*). Radikalische und nukleophile Reaktionen von Proteinen und PM_{2.5}-Matrixkomponenten wie z. B. HULIS und Pyrolyseprodukten von Lignin können hierfür u. a. verantwortlich gemacht werden. Die durchschnittliche atmosphärische Proteinkonzentration WSP_{AAA}(>5 kDa) der mittels Aminosäureanalytik untersuchten MOHP-Proben wurde unter Berücksichtigung der

Proteinverluste der Probenvorbereitung auf $0.60 \pm 0.24 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($0.37\text{-}1.17 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $N = 10$) abgeschätzt, entsprechend einem Proteinanteil von $6.0 \pm 2.4 \%$ ($2.7\text{-}10.7 \%$) (*Abschnitt 3.2.5*). Diese Werte stimmen mit den mittels BCA-Assay bestimmten durchschnittlichen Proteingehalten dieser Proben nach Korrektur der unten erläuterten Proteinüberbestimmung gut überein. Die $\text{WSP}_{\text{BCA}}(>5 \text{ kDa})$ -Konzentration beläuft sich auf $0.54 \pm 0.22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($0.24\text{-}0.93 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $N = 9$) und der $\text{WSP}_{\text{BCA}}(>5 \text{ kDa})$ -Anteil in $\text{PM}_{2.5}$ beträgt $5.6 \pm 1.4 \%$ ($3.0\text{-}7.7 \%$). Die IWC-Proben zeigten atmosphärische TP- und WSP-Konzentrationen von rund $500 \text{ ng}/\text{m}^3$ ($N = 2$) bzw. $160\text{-}220 \text{ ng}/\text{m}^3$ ($N = 3$) und demnach einen TP-Anteil von 5% und einen WSP-Anteil von 2% in $\text{PM}_{2.5}$ (*Abschnitt 3.2.6*). Um zuverlässigere Aussagen hinsichtlich des wahren Proteingehaltes von atmosphärischen Aerosolproben zu gewinnen, ist jedoch eine Optimierung der Extraktion und der Größenausschlusschromatographie notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit werden hierfür experimentelle Verbesserungsvorschläge gegeben. Der BCA- und NanoOrange-Assay wurden hinsichtlich der Proteinquantifizierung in atmosphärischen Aerosolpartikeln mit Bezug auf den mittels Aminosäureanalytik ermittelten Proteingehalt verglichen (*Abschnitt 3.2.7*). Der BCA-Assay bestimmte in den untersuchten MOHP-Proben den $\text{WSP}(>5 \text{ kDa})$ -Gehalt durchschnittlich um das 5-16fache und in 3 IWC-Proben um einen Faktor 20-30 über. Das Artefakt fiel in der WSP-Fraktion von 2 IWC-Proben deutlich höher aus (Überbestimmung: Faktor >37). Diese Beobachtung kann auf Interferenzen von $\text{PM}_{2.5}$ -Matrixkomponenten wie z. B. HULIS im BCA-Assay zurückgeführt werden. Der NanoOrange-Assay zeigte in der WSP-Fraktion von 3 IWC-Proben eine deutlich bessere Übereinstimmung (Faktor ± 2) mit den aus Aminosäuredaten abgeleiteten Proteingehalten. In der $\text{WSP}(>5 \text{ kDa})$ -Fraktion bestimmt er das Protein jedoch um das 3-6fache unter.

Aminosäurezusammensetzung von Feinstaub

Das Hauptcharakteristikum der Aminosäurezusammensetzung eines durchschnittlichen atmosphärischen WSP-Proteins ist sein hoher Glycinstoffmengenanteil von $39.8 \text{ mol}\%$ (*Abschnitt 3.2.6.4*). Die häufigsten Aminosäuren sind nachfolgend Aspartat/Asparagin, Alanin, Glutamat/Glutamin mit 11.1 , 8.5 und $9.1 \text{ mol}\%$. Glycin-reiche Proteine (GRP) sind neben Arabinogalactan-Proteinen (AGP), die ebenfalls aus einem hohen Anteil dieser Aminosäuren bestehen, überwiegend als pflanzliche Zellwandproteine mit strukturellen Funktionen bekannt. Rinderserumalbumin (BSA) wird häufig als Kalibrierstandard für die Quantifizierung von Proteinen in atmosphärischen Aerosolpartikeln verwendet und besitzt einen deutlich geringeren Glycinanteil von $2.7 \text{ mol}\%$. Es ist daher als Referenz für ein durchschnittliches atmosphärisches Protein nicht gut geeignet.

Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Straßen- und Feinstaub

Für die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Straßenstaubhydrolysaten erwies sich eine selektive Anreicherung mit dem Anionenaustauscherharz AG1-X8 in Kombination mit den entwickelten NBD-F-HPLC-Methoden als vielversprechender Analyseansatz (*Abschnitt 3.3.6*). Es wird eine gute Trennung von 3-Nitrotyrosin und Matrixkomponenten, die schwer hydrolysierbaren Oligopeptiden zugeordnet werden konnten, erreicht. In den untersuchten Straßenstaubproben wurde der Analyt nach Hydrolyse in 4.7 M HCl und Anreicherung mittels Anionenaustauschextraktion jedoch nicht nachgewiesen. Aus den Bestimmungen konnte ein Maximalgehalt von 3-Nitrotyrosin im mittleren ppb-Bereich in Straßenstaub ermittelt werden. 3-Nitrotyrosin wurde in atmosphärischen Feinstaubproben nicht nachgewiesen. Das Anionenaustauscherharz AG1-X8 kam in diesem Fall nicht zur Anwendung.

Als Anreicherungsverfahren für 3-Nitrotyrosin wurde außerdem eine Immunaффinitätschromatographie(IAC)-Säule mit einem immobilisierten Nitrotyrosin-spezifischen polyklonalen Antikörper entwickelt und hinsichtlich ihrer Kapazität und ihres chromatographischen Verhaltens näher charakterisiert (*Abschnitt 3.3.5*). In einem Experiment konnte gezeigt werden, dass sich der Analyt von Norleucin, das nicht an den Antikörper bindet, mit sehr guten Wiederfindungen unter Elution in PBS-Puffer und 50 % Methanol gut trennen lässt. Die Säule wurde jedoch auf ihre Anwendbarkeit für eine Anreicherung von 3-Nitrotyrosin aus Protein-, Straßen- und Feinstaubhydrolysaten nicht näher getestet.

Zur Erhöhung der Selektivität der NBD-F-HPLC-Methode wurde diese mit einem kompetitiven Enzymimmunoassay (EIA) unter Verwendung eines Nitrotyrosin-spezifischen monoklonalen Antikörpers kombiniert. Es konnte eine empfindliche Detektion des Analyten in Form des NBD-F-Derivates im HPLC-Eluat demonstriert werden (*Abschnitt 3.3.3.2*). Mit diesem Ansatz kann das Inhibitionssignal als zusätzliches Identifizierungskriterium für 3-Nitrotyrosin in komplexen Probenmatrices herangezogen werden. Um das Ziel eines eindeutigen Nachweises von 3-Nitrotyrosin in PM_{2.5}- und Straßenstaubhydrolysaten zu erreichen, sind weitere Optimierungen sowohl der Extraktion als auch der selektiven Probenanreicherung notwendig.

Die in dieser Arbeit entwickelten und erprobten Analysemethoden bieten somit die Grundlage für systematische Untersuchungen des Vorkommens von Aminosäuren, Proteinen und Nitroderivaten in atmosphärischen Aerosolpartikeln und Straßenstaub.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 GERÄTE

5.1.1 Dionex-HPLC-System

Autosampler AS50 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Chromatographie-Datensystem Chromeleon Version 6.50 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Fluoreszenzdetektor RF2000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Hochdruckgradientenpumpe P580HPG (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Niederdruckgradientenpumpe GP50 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Säulenofen AS50 Thermal Compartment (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

5.1.2 Shimadzu-HPLC-System

Autosampler SIL-6B (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Chromatographie-Datensystem CLASS-VP 4.3 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Fluoreszenzdetektor RF 551 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Hochdruckgradientenpumpe LC-6A, 2× (Shimadzu, Kyoto, Japan)

HPLC-Steuereinheit SCL-6B (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Säulenofen CTO-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)

5.1.3 Aminosäureanalytik

Einsatz für 2-ml-Probenglas, 100 µl (C516.1, Roth, Karlsruhe)

Einsatz für Kurzgewindeflasche, 450 µl (WIC47090, Wicom, Heppenheim)

HPLC-Säule Nucleodur, C18, 250x4 mm, 100 Å, 5 µm (761400.40, Macherey-Nagel, Düren)

HPLC-Säule Synergi MaxRP, C12, 250x4 mm, 80 Å, 4 µm, (00G-4337-E0, Phenomenex, Aschaffenburg)

Kurzgewindeflasche, klar (WIC41150, Wicom, Heppenheim)

Probenglas, braun, 2 ml (E160.1, Roth, Karlsruhe)
Probenglas, klar, 2 ml (E159.1, Roth, Karlsruhe)
Schraubkappe für 2-ml-Probenglas, mit Loch (E161.1, Roth, Karlsruhe)
Schraubkappe für 2-ml-Probenglas, ohne Loch (E162.1, Roth, Karlsruhe)
Schraubkappe mit Silikon/Teflon-Septum für Kurzgewindeflasche (WIC43945/B, Wicom, Heppenheim)
Septum, Silikon/Teflon (E165.1, Roth, Karlsruhe)
Sterilfiltrationseinheit Nalgene, 0.2 µm Nylon-Membran (AC42.1, Roth, Karlsruhe)
Vorsäulen-Kartusche, C18, 4.0x3.0 mM, (AJ0-4287, Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäulen-Kartuschenhalter (KJ0-4282, Phenomenex, Aschaffenburg)

5.1.4 Proteinanalytik

8-Kanalpipette 50-200 µL (S8/200, Dynatech, Denkendorf)
8-Kanal-Photometer TR 400 für Mikrotiterplatten, (SLT, Overath)
8-Kanal-Waschgerät (Washer) für Mikrotiterplatten (EAS 2/4, SLT, Overath)
Halbmikroküvetten, PMMA (759115, Brand, Wertheim)
Makroküvetten, PMMA (759105, Brand, Wertheim)
Massenspektrometer LCT-MS, ESI-TOF (Micromass, Manchester, GB)
Mikroküvetten, Plastibrand, UV-durchlässig (Y200.1, Roth, Karlsruhe)
Mikrotiterplatte, PS, F-Boden, glasklar (655061, Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Mikrotiterplatte, PP, F-Boden, schwarz (655209, Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Mikrotiterplatten-Schutzfolie ThermalSeal (Z369683, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Mikrowelle DAP-30 (Berghof, Eningen)
Mikrowelle *Mars5* mit Druck- und Temperatursensor ESP-100 und PTR-300plus (CEM, Kamp-Lintfort)
Orbital-Schüttler für Mikrotiterplatten (Institut Virion, Würzburg)
Probenflasche mit Bördelrand, klar, 2 ml (C514.1, Roth, Karlsruhe)
Rollrandflasche, klar, 2 ml (WIC42000, Wicom, Heppenheim)
Spektrofluorometer Wallac Victor² für Mikrotiterplatten (PerkinElmer, Boston, MA, USA)
UV/VIS-Spektrophotometer DU 650 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)

5.1.5 Affinitätschromatographie

10-Port-2-Wege-Ventil, LabPRO, PEEK (PR75010201, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA)
Ferrule, PEEK, 1/8", double cone (043225, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
Fitting, PEEK, 1/4 - 28, 0.125" ID (037627, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

HiTrap, NHS-aktiviert, 1 ml (17071601, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Kapillare, PEEK, 1/16", 0.02" ID (18111368, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Kapillare, PEEK, 1/16", 0.02" ID (052309, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
Probenschleife, PEEK, 1/16", 100 µl (18111398, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Union, ¼ - 28x¼ - 28, 0.02" ID (039296, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

5.1.6 Sonstige Geräte

AG1-X8-Harz, Hydroxidform (43-2445, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Einmalspritze Omnifix-F, 1 ml (Braun, Melsungen)
Einmalspritze Injekt, 2, 5, 10, 20 ml (Braun, Melsungen)
Fritte (PTFE) LiChrolut, Porösität 10 µm (1.19891, Merck, Darmstadt)
Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2 (Finn-Aqua, Hürth)
Gewindekappe für 4-ml-Probenglas (E-2075, neoLab, Heidelberg)
Glassäule LiChrolut, 5 ml (Merck, Darmstadt)
Größenausschlussäule PD-10, Sephadex G-25 Medium, 5 ml, $M_r = 5$ kDa (17085101, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Hochdurchsatz-Partikelsammler Digital DHA80 (Riemer Messtechnik, Hausen)
Injektionskanüle Sterican (4665791, Braun, Melsungen)
Laborhandschuhe aus PVC (6178.1, Roth, Karlsruhe)
Muffelofen MR 170 E (Heraeus, Heidelberg)
Multi-Reaktionsgefäß, 1.5 ml, PP (7080.1, Roth, Karlsruhe)
Parafilm M (H666.1, Roth, Karlsruhe)
Probenglas, braun, 4 ml (E-2071, neoLab, Heidelberg)
Reinstwasseranlage Milli Q plus185 (Millipore, Eschborn)
Rollrandglas aus Kalk-Soda-Glas, 10, 15, 20 ml (X655.1, X656.1, X657.1, Roth, Karlsruhe)
Rundfilter, Glasfaser, d = 150 mm, MN85/90BF (406015, Macherey-Nagel, Düren)
Spritzenfilter, CME-Membran, 0.22 µm (P818.1, Roth, Karlsruhe)
Spritzenfilter mit Glasfaservorfilter, CA-Membran, 0.45 µm (17829, Sartorius, Göttingen)
Ultraschallbad Sonorex Modell RK 510S (Bandelin, Berlin)
Vortex Schüttler Vibro Fix (IKA, Staufen)
Waage AT261 DeltaRange (Mettler Toledo, Gießen)
Zentrifuge Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech, Osterode)
Zentrifuge Universal 30F (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifugenglas aus Borosilikatglas 3.3, 12 ml (E-1078, neoLab, Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen, 15, 50 ml, PP, steril (N461.1, N463.1, Roth, Karlsruhe)

5.2 CHEMIKALIEN

Acetonitril, Rotisolv, HPLC *gradient grade* (8825.2, Roth, Karlsruhe)

Albumin, Rinderserum, Fraktion V, 99 % (A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aminosäurestandard AA-S-18 (AA-S-18, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ammoniumacetat, Fractopur (116103, Merck, Darmstadt)

Anti-3-(4-Hydroxy-3-nitrophenylacetamido)-propionsäure-BSA-Antikörper aus Maus, 39B6, monoklonal (Alexis, Grünberg)

Anti-Nitro-KLH-Antikörper aus Schaf, polyklonal (24312, Oxis/Natutec, Frankfurt)

Anti-Maus-IgG-POD aus Pferd (PI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Anti-Schaf-IgG aus Kaninchen (AI-6000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Anti-Schaf-IgG-POD aus Kaninchen (402100, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

Argon 5.0, (0262, Messer, Griesheim)

Bet v 1a, rekombinant (Biomay, Wien, Österreich)

Casein (C5890, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)

Dikaliumhydrogenphosphat, p. A. (105104, Merck, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid, p. A. (1.16743, Merck, Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat, p. A. (106586, Merck, Darmstadt)

Dinatriumtetraborat, Suprapur (106309, Merck, Darmstadt)

Essigsäure, Suprapur (100066, Merck, Darmstadt)

Ethanolamin, p. A. (100845, Merck, Darmstadt)

Ethylendiamintetraessigsäure, Tetranatriumsalz, >99.5 % (32721, Acros Organics, Geel, Belgien)

4-Fluor-7-nitrobenzofurazan, 98 % (41545, Acros Organics, Geel, Belgien)

γ -Globulin aus Rinderserum, 98 % (22550.02, Serva Electrophoresis, Heidelberg)

Helium 5.6 (0539, Messer, Griesheim)

Helium 5.0 (0238, Messer, Griesheim)

Kaliumdihydrogencitrat, reinst (60214, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Kaliumdihydrogenphosphat, p. A. (104873, Merck, Darmstadt)

α -Methyl-L-tyrosin, 98 % (28668, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Methanol, LiChrosolv, *gradient grade* (1.06007, Merck, Darmstadt)

3-Mercaptopropionsäure, >99 % (63768, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Micro-BCA-Assay (UP75860a, Uptima, Montlucon Cedex, Frankreich)

Myoglobin aus Pferdeherz, 90 % (M1882, Sigma-Aldrich, Steinheim)

NanoOrange Quantitation Kit (N-6666, Molecular Probes, Eugene, USA)

Natriumacetat, p. A. (1.06268, Merck, Darmstadt)

Natriumazid, >99.5 % (S2002, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumcarbonat, p.A. (6395, Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid, p.A. (106404, Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid, Suprapur (106406, Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (817034, Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat, Suprapur (106370, Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat, p.A. (106329, Merck, Darmstadt)
Natronlauge, 32 %, p.A. (105590, Merck, Darmstadt)
3-Nitro-L-tyrosin, 99 % (22613, Acros Organics, Geel, Belgien)
3-Nitro-L-tyrosin (N7389, Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Norleucin, >99 % (22604, Acros Organics, Geel, Belgien)
DL-Norvalin, >99 % (74670, Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Ornithindihydrochlorid, >99 % (75440, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ovalbumin, Grade V (A5503, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phenol, >99.5 %, p.A. (77610, Sigma-Aldrich, Steinheim)
o-Phosphorsäure, 85 %, p.A. (100573, Merck, Darmstadt)
o-Phthaldialdehyd, zur Synthese (821027, Merck, Darmstadt)
Rinderserumalbumin, Fraktion V, 99 % (A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Salzsäure, Suprapur, 30 % (100318, Merck, Darmstadt)
Salzsäure, Rotipuran, 37 %, p.A. (X942.1, Roth, Karlsruhe)
Sorbinsäure, Kaliumsalz, p.a. (85520, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Stickstoff 5.0 (M75812073, Messer, Griesheim)
Schwefelsäure, 98 %, p.A. (1.00732, Merck, Darmstadt)
Tetranitromethan (T25003, Sigma-Aldrich, Steinheim)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (1.08622, Merck, Darmstadt)
Triethylamin (90335, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Trifluoressigsäure, >99.5 % (91699, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tween 20 (1.09280, Merck, Darmstadt)
Wasser, Milli Q plus185, $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, UV-behandelt, DOC <1 ppbv (Millipore, Eschborn)
Wasserstoffperoxid, 35%, reinst (1.08597, Merck, Darmstadt)

5.3 PUFFER UND REAGENZIEN

5.3.1 Vorsäulenderivatisierung

1.4 mM EDTA-Lösung

10.6 mg (0.028 mmol) Natriumethyldiamintetraacetat
ad 20 ml Wasser

0.2 M Essigsäure

0.114 ml (2 mmol) Essigsäure
9.886 ml Wasser

1 M Essigsäure

0.572 ml (0.01 mol) Essigsäure
9.428 ml Wasser

100 mM Natriumborat-Puffer mit 350 μ M EDTA-Zusatz (pH = 8.7)

201.2 mg (1.0 nmol) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
2.5 ml (3.5 mmol) 1.4 mM Na_4EDTA -Lösung
7.5 ml Wasser
pH-Werteinstellung: Salzsäure (30 %)
Filtration: Spritzenfilter (CME-Membran, 0.22 μ m)

200 mM Natriumborat-Puffer mit 350 μ M EDTA-Zusatz (pH = 9.5)

402.4 mg (2.0 nmol) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
2.5 ml (3.5 mmol) 1.4 mM Na_4EDTA -Lösung
7.5 ml Wasser
pH-Werteinstellung: Natronlauge (32 %)
Filtration: Spritzenfilter (CME-Membran, 0.22 μ m)

50 mM NBD-F-Lösung

5.0 mg (0.027 mmol) 4-Fluoro-7-nitro-benzoxadiazol
546 μ l Acetonitril

150 mM OPA-Lösung

51.2 mg (0.375 mmol) *o*-Phthaldialdehyd
2.5 ml Methanol

30/92 mM OPA/MPA-Reagenzlösung (278 μ M EDTA, 1 % SDS, 160 mM Borat-Puffer)

40 mg SDS
4 ml 200 mM Natriumborat-Puffer mit 350 μ M EDTA-Zusatz (pH = 9.5)
1 ml 150 mM OPA-Lösung
40 μ l 3-Mercaptopropionsäure

5.3.2 HPLC-Analytik

Acetonitril/Methanol (50/50)

500 ml Acetonitril
500 ml Methanol

50 mM Natriumacetat-Puffer, 0.044% TEA (pH = 6.5)

4.10 g (50 mmol) Natriumacetat
440 µl Triethylamin (TEA)
ad 1 000 ml Wasser
pH-Werteinstellung: Essigsäure (100 %)
Filtration: Sterilfiltrationseinheit (Nalgene)

10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.20)

1.20 g (10 mmol) NaH_2PO_4
ad 1 000 ml Wasser
pH-Werteinstellung: Natronlauge (32 %)
Filtration: Sterilfiltrationseinheit (Nalgene)

50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 2.5)

3.39 ml (50 mmol) *o*-Phosphorsäure (85 %)
ad 1 000 ml Wasser
pH-Werteinstellung: Natronlauge (32 %)
Filtration: Sterilfiltrationseinheit (Nalgene)

5.3.3 Extraktion

Phosphat-Kochsalz-Puffer (pH 7.6, PBS-Puffer)

1.36 g (10 mmol) KH_2PO_4
12.20 g (70 mmol) K_2HPO_4
8.50 g (145 mmol) NaCl
ad 1 000 ml Wasser

Phosphat-Kochsalz-Puffer mit 0.05 % Azid-Zusatz (pH 7.6, PBS-Azid-Puffer)

1.36 g (10 mmol) KH_2PO_4
12.20 g (70 mmol) K_2HPO_4
8.50 g (145 mmol) NaCl
500 mg (7.5 mmol) NaN_3 (0.05%)
ad 1 000 ml Wasser

5.3.4 Enzymimmunoassays

Coating-Puffer (Carbonat-Puffer, pH 9.6)

1.59 g (15 mmol) Na_2CO_3
2.93 g (25 mmol) NaHCO_3
0.20 g (3 mmol) NaN_3
ad 1 000 ml Wasser

5 % Schwefelsäure

2.72 ml 96% Schwefelsäure
91 ml Wasser

Substratpuffer (pH = 3.8)

46.04 g (200 mmol) $\text{KH}_2\text{-Citrat}$
0.1 g Sorbinsäure, Kaliumsalz
1 000 ml Wasser

TMB-Stammlösung (12.5 g/l)

25.14 mg 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
2.00 ml DMSO

Waschpuffer-Konzentrat (60x, pH 7.6)

8.17 g KH_2PO_4
73.16 g K_2HPO_4
52.60 g NaCl
30.0 ml Tween 20
ad 1 000 ml Wasser

1 % Wasserstoffperoxid-Stammlösung

2.6 ml 35% Wasserstoffperoxid
100 ml Wasser

5.3.5 3-Nitrotyrosin-Anreicherung

50 mM Ammoniumacetat-Puffer

96.35 mg (1.25 mmol) Ammoniumacetat
ad 25 ml Wasser

Blocking-Puffer (pH = 8.3)

7.31 g (125 mmol) NaCl
7.49 ml (125 mmol) Ethanolamin
ad 250 ml Wasser

Coupling-Puffer (pH = 7.9)

4.20 g (50 mmol) NaHCO_3
7.31 g (125 mmol) NaCl
ad 250 ml Wasser
pH-Werteinstellung: Salzsäure (30 %)

Phosphat-Azid-Puffer (pH = 7.6)

2.23 g (12.5 mmol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0.25 g (3.8 mmol) NaN_3 (0.1 %)

Waschpuffer (pH = 4.0)

7.31 g (125 mmol) NaCl
1.43 ml (25 mmol) Essigsäure
pH-Werteinstellung: Natronlauge (32 %)

5.4 AMINOSÄURE- UND PROTEINANALYTIK

5.4.1 Kalibrierung

Zur Generierung von Kalibrierkurven wurden die durch das Chromatographie-Datensystem Chromeleon (Dionex) bzw. Class-VP (Shimadzu) ermittelten Peakflächen (y-Achse) gegen die Konzentrationen der Standardlösungen (x-Achse) in einem Diagramm mit Microsoft Excel 2 000 der MS-Office Version 9.0.2812 gefittet. Als Kalibrierfunktion wurde stets ein linearer Zusammenhang zwischen Messwert (Peakfläche) und Konzentration angestrebt. Als Kriterium für die Linearität wurde der visuelle Linearitätstests angewendet.^[331,349] Unter Umständen wurde auf eine bessere Regression mittels einer quadratischen Funktion geprüft (*Gleichung 5.1*).

$$y = m \cdot x + b$$

$$y = n \cdot x^2 + m \cdot x + b$$

Gleichung 5.1: Lineare (links) und quadratische (rechts) Kalibrierfunktion. y = Peakfläche (Messwert), x = Konzentration, n = Koeffizient, m = Steigung, b = y-Achsenabschnitt (kalibrierter Blindwert). Bestimmung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

Hierfür wurden die relativen Verfahrensstandardabweichungen V_{x0} der linearen und der quadratischen Regression verglichen. In V_{x0} fließen gemäß *Gleichung 5.2* die Reststandardabweichung s_y , die Empfindlichkeit E als auch der Mittelwert \bar{x} des Messbereiches ein.

$$V_{x0} = \frac{s_y \cdot 100\%}{E \cdot \bar{x}}$$

Gleichung 5.2: Relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} . s_y = Reststandardabweichung, E = Empfindlichkeit (Lineare Regression: $E = m$, quadratische Regression: $E = m + 2 \cdot n \cdot \bar{x}$), \bar{x} = Mittelwert des Arbeitsbereiches.

Die Reststandardabweichung s_y ist ein Maß für die Präzision der Kalibrierung. Sie liefert einen Zahlenwert für die Streuung der Residuen, also der Differenzen der Signalwerte in y-Richtung um die Kalibrierkurve. In *Gleichung 5.3* ist die Definition der Reststandardabweichung s_y für lineare und quadratische Regressionen dargestellt.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (m \cdot x_i + b))^2}{N - 2}}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - b \cdot \sum y_i - m \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - n \cdot \sum (x_i^2 \cdot y_i)}{N - 3}}$$

Gleichung 5.3: Bestimmung der Reststandardabweichung s_y als Maß für die Streuung der Residuen für lineare (links) und quadratische (rechts) Regressionen. y_i = Signalwert der Kalibrierlösung i .

Die relative Verfahrensstandardabweichung ist somit ein Maß für die Güte einer Kalibrierung. Im Fall einer kleineren V_{x0} für die quadratische Funktion wurde mit dem Anpassungstest nach Mandel auf Signifikanz geprüft. Wurde eine signifikant bessere V_{x0} der quadratischen Regression nachgewiesen, ist diese für die Quantifizierung herangezogen worden. Auf eine Beschreibung des Anpassungstests nach Mandel wird an dieser Stelle verzichtet und auf die zitierte Literatur verwiesen.^[331,349]

5.4.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden sowohl aus Kalibrierkenndaten gemäß DIN 32645 als auch aus Messungen von Blindwerten (Blindwertmethode) ermittelt.^[331,349] Im Falle linearer Regressionen wurde stets die höchste NWG beider Methoden für die Bestimmung herangezogen, für quadratische Regressionen wurde ausschließlich die Blindwertmethode angewendet. Die Kenndaten der Kalibrierung umfassen zum einen die Reststandardabweichung s_y als Ausdruck für die Präzision und die Steigung m als Maß für die Empfindlichkeit der linearen Regression. Weiterhin fließen der t -Wert mit einseitiger bzw. zweiseitiger Fragestellung mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit P von 95 %, der Arbeitsbereich und die Konzentrationen der Kalibrierlösungen in Form der Summe der Abweichungsquadrate Q_{xx} , der Anzahl der Kalibrierlösungen N und der Parallelmessungen N' ein (*Gleichung 5.4* und *Gleichung 5.5*).

$$x_{NWG} = \frac{s_y}{m} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{N'} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

Gleichung 5.4: Bestimmung der Nachweisgrenze x_{NWG} aus Kenndaten der linearen Regression (DIN 32645). s_y = Reststandardabweichung, m = Steigung, t = t -Wert (einseitig, $P = 95\%$, $f = N - 2$), N = Anzahl der Kalibrierlösungen, N' = Anzahl der Parallelmessungen, \bar{x} = Mittelwert des Arbeitsbereiches, Q_{xx} = Summe der Abweichungsquadrate.

$$Q_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

Gleichung 5.5: Summe der Abweichungsquadrate. x_i = Konzentration der Kalibrierlösung i .

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen nach der Blindwertmethode wurden die in *Gleichung 5.6* gezeigten Formeln angewendet.

$$\begin{aligned}
 y_{NWG} &= \bar{y}_{\text{Blindwert}} + 3 \cdot s_{\text{Blindwert}} & \bar{y}_{\text{Blindwert}} > b_{\text{Kal}} \\
 y_{NWG} &= b_{\text{Kal}} + 3 \cdot s_{\text{Blindwert}} & \bar{y}_{\text{Blindwert}} < b_{\text{Kal}} \\
 x_{NWG} &= \frac{y_{NWG} - b_{\text{Kal}}}{m}
 \end{aligned}$$

Gleichung 5.6: Bestimmung der Nachweisgrenze x_{NWG} (lineare Regression) nach der Blindwertmethode.

Als Blindlösung wurde meist Wasser, das zur Herstellung der Aminosäurestandardlösungen benutzt wurden, oder Pufferlösung verwendet. In der Regel wurden 4-5 Blindlösungen analysiert. Nach Vergleich des Mittelwertes der Flächen $\bar{y}_{\text{Blindwert}}$ mit dem Achsenabschnitt b_{Kal} der Kalibriergeraden, wurde das 3fache der Standardabweichung $s_{\text{Blindwert}}$ des Blindwertes zu dem größeren von beiden Werten addiert und anschließend die Nachweisgrenze x_{NWG} aus der Geraden- bzw. der quadratischen Gleichung ermittelt. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze (BG) wurden Gleichung 5.7 und Gleichung 5.8 analog angewendet.

$$x_{BG} = 3 \cdot \frac{s_y}{m} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{N'} + \frac{(3 \cdot x_{NWG} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}}$$

Gleichung 5.7: Ermittlung der Bestimmungsgrenze aus Kenndaten der linearen Regression. s_y = Reststandardabweichung, m = Steigung, t = t -Wert (zweiseitig, $P = 95\%$, $f = N - 2$), N = Anzahl der Kalibrierlösungen, N' = Anzahl der Parallelmessungen, \bar{x} = Mittelwert des Arbeitsbereiches, Q_{xx} = Summe der Abweichungsquadrate.

$$\begin{aligned}
 y_{BG} &= \bar{y}_{\text{Blindwert}} + 10 \cdot s_{\text{Blindwert}} & \bar{y}_{\text{Blindwert}} > b_{\text{Kal}} \\
 y_{BG} &= b_{\text{Kal}} + 10 \cdot s_{\text{Blindwert}} & \bar{y}_{\text{Blindwert}} < b_{\text{Kal}} \\
 x_{BG} &= \frac{y_{BG} - b_{\text{Kal}}}{m}
 \end{aligned}$$

Gleichung 5.8: Ermittlung der Bestimmungsgrenze x_{BG} nach der Blindwertmethode.

On column-Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen wurden als Produkt der auf die Probenlösung bezogenen relativen Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen (angegeben als Stoffmengenkonzentration) und dem Quotienten $V_{\text{inj}}/F_{\text{ver}}$ berechnet. V_{inj} ist das Injektionsvolumen und F_{ver} der von der Derivatisierungsmethode abhängige Verdünnungsfaktor. Der Verdünnungsfaktor beschreibt das Verhältnis der Volumina der Reaktionslösung nach Derivatisierung und der zur Derivatisierung eingesetzten Probenlösung.

Als Kriterium für die Quantifizierung von Aminosäuren in den Protein- und Umweltproben wurde stets die NWG herangezogen.

5.4.3 Herstellung von Aminosäurestandardlösungen

Die Kalibrierlösungen für die Aminosäureanalytik mittels NBD-F-Derivatisierung wurden aus der Aminosäurestandardlösung AA-S-18 (Sigma-Aldrich), einer 500 μM 3-Nitro-L-tyrosin-, 500 μM α -Methyl-L-tyrosin- und 500 μM L-Norleucin-Lösung hergestellt. AA-S-18 enthält L-Alanin, L-Arginin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin und L-Valin in 2.5 mM ($\pm 4\%$), L-Cystin in 1.25 mM ($\pm 4\%$) und Ammoniumchlorid in 2.5 mM ($\pm 4\%$) Konzentration in 0.1M Salzsäure. Die Einwaage von 28.3 mg 3-Nitro-L-tyrosin (226.2 g/mol), 24.4 mg α -Methyl-L-tyrosin (195.2 g/mol) und 16.4 mg L-Norleucin (131.2 g/mol) zur Herstellung der 500 μM Lösungen erfolgte stets mit einem Wägeschiffchen auf der Waage AT261 (Mettler). Die Substanzen wurden in einen 250-ml-Maßkolben überführt und nach Auffüllen mit 0.1 N Salzsäure im US-Bad (30 min) gelöst. Zur Herstellung einer 100 μM Aminosäurestandardlösung (10 μM AAS) wurden 400 μl AA-S-18 aus einer frisch geöffneten Ampulle, 2x1 ml einer 500 μM 3-Nitro-L-tyrosin-, 2x1 ml einer 500 μM L-Norleucin- und 4x1 ml einer 500 μM α -Methyl-L-tyrosin-Lösung in einen 10-ml-Maßkolben pipettiert und bis zur Messmarke mit Wasser aufgefüllt. Dieser Standard wurde in 2-ml-Probengläsern als 500- μl -Aliquote bei -18°C für max. 4 Wochen gelagert. Kalibrierlösungen der Konzentrationen 0.01, 0.05, 0.2, 0.4 und 0.6 $\mu\text{mol/l}$ AA-S-18, 3-Nitro-L-tyrosin und L-Norleucin, 0.02, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2 $\mu\text{mol/l}$ α -Methyl-L-tyrosin und 0.005, 0.025, 0.1, 0.2 und 0.3 $\mu\text{mol/l}$ L-Cystin mit einem Volumen von 1 ml wurden am Messtag aus dem 1 μM AAS durch entsprechende Verdünnung in 2-ml-Probengläsern hergestellt.

Die Kalibrierlösungen für die Aminosäureanalytik mittels OPA/MPA-Derivatisierung wurden aus der Aminosäurestandardlösung AA-S-18 (Sigma-Aldrich), einer 500 μM DL-Norvalin- und 500 μM L-Ornithin-Lösung hergestellt. Die Einwaage von 25.6 mg L-Ornithindihydrochlorid (205.1 g/mol) und 14.6 mg DL-Norvalin (117.2 g/mol) zur Herstellung der 500 μM Lösungen erfolgte stets mit einem Wägeschiffchen auf der Waage AT261 (Mettler). Die Substanzen wurden in einen 250-ml-Maßkolben überführt und nach Auffüllen mit 0.1 N Salzsäure im US-Bad (30 min) gelöst. Zur Herstellung einer 10 μM Aminosäurestandardlösung (10 μM AAS) wurden 40 μl AA-S-18 aus einer frisch geöffneten Ampulle und 200 μl einer 500 μM DL-Norvalin-Lösung in einen 10-ml-Maßkolben pipettiert und bis zur Messmarke mit Wasser aufgefüllt. Zur Herstellung einer 1 μM Aminosäurestandardlösung (1 μM AAS) wurden 1 ml 10 μM AAS und 100 μl einer 500 μM L-Ornithin-Lösung in ein 10-ml-Maßkolben pipettiert und mit Wasser bis zur Messmarke aufgefüllt. Dieser Standard wurde in 2-ml-Probengläsern als 500- μl -Aliquote bei -18°C für max. 4 Wochen gelagert. Kalibrierlösungen der Konzentrationen von 0.005, 0.02, 0.06, 0.1, 0.2 $\mu\text{mol/l}$ AA-S-18 und DL-Norvalin und 0.025, 0.1, 0.3, 0.5 und 1.0 $\mu\text{mol/l}$ L-Ornithin mit einem Volumen von 1 ml wurden am

Messtag aus dem 1 μM AAS durch entsprechende Verdünnung ebenfalls in 2-ml-Probengläser hergestellt.

5.4.4 NBD-F-Derivatisierung

Es wurden 75 μl wässrige Probe in ein Multi-Reaktionsgefäß vorgelegt, 15 μl 100 mM Natriumborat-Puffer mit 350 μM EDTA-Zusatz ($\text{pH} = 8.7$) und 15 μl 50 mM NBD-F-Lösung in ACN zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und in einem Wasserbad bei 60°C für 3 min inkubiert. Zu der Reaktionslösung wurden anschließend entweder 15 μl 0.2 M Essigsäure und 30 μl ACN (NBD-F-VD1) oder nur 15 μl 0.2 M Essigsäure (NBD-F-VD2) zugegeben. Die Derivatisierungslösung wurde vollständig in einen 100- μl -Glaseinsatz eines 2-ml-Probenglases überführt und dieses in den Probenhalter des SIL-6B-Autosamplers des Shimadzu-HPLC-Systems (Injektionsvolumen: 20 μl) oder des AS50-Autosamplers des Dionex-HPLC-Systems (Injektionsvolumen: 25 μl) eingesetzt.

5.4.5 OPA/MPA-Derivatisierung

Die OPA/MPA-Derivatisierung (OPA-VD1) erfolgte automatisiert im thermostatisierten Probenhalter des AS50-Autosamplers des Dionex-HPLC-Systems (*Abbildung 5.1*). Es wurden 100 μl wässrige Probe in einem 450- μl -Glaseinsatz einer Kurzgewindeflasche vorgelegt, diese mit einem geschlitzten Teflon/Silikon-Septum verschlossen und im Probenhalter des Autosamplers platziert. Der Probengeber pipettierte 40 μl OPA/MPA-Reagenzlösung zu. Es wurde 2-mal durch Aufziehen und Wiederausstoßen von 50 μl Lösung gemischt. Die Derivatisierungslösung wurde - gemessen von dem Zeitpunkt der Zugabe der OPA/MPA-Reagenzlösung - 5 min bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden 30 μl 1 M Essigsäure automatisch zugegeben und erneut 2-mal durch Aufziehen und Wiederausstoßen von 100 μl der Lösung gemischt. 25 μl der Lösung wurden über die Probenschleife auf die Säule injiziert. Die OPA/MPA-Reagenzlösung und 1 M Essigsäure wurden stets am Tag vor der Verwendung hergestellt und über Nacht bei 23°C im Probenhalter in einem Autosamplervial stehen gelassen. Die Steuerung des Autosamplers erfolgte mittels des Chromatographie-Datensystems Chromeleon.

```

Pump.Pressure.LowerLimit = 10
Pump.Pressure.UpperLimit = 250
%A.Equate = "% 50 mM NaAc/TEA"
%A.Type = Custom
%B.Equate = "% MeOH/ACN"
%B.Type = Custom
%C.Equate = "% H2O"
%C.Type = Water
Flush Volume = 500
Wait FlushState
NeedleHeight = 0
CutSegmentVolume = 0
SyringeSpeed = 3
ColumnTemperature = 37
TrayTemperature = 23
CycleTime = 0
Pressure.Step = Auto
Pressure.Average = On
Emission.ExWavelength = 330
Emission.EmWavelength = 460
Emission.Gain = 16.0
Emission.Response = 1.5
Emission.Sensitivity = Med
Emission.Step = Auto
Emission.Average = On
WaitForTemperature = True
Protocol "Pipet 40 µl OPA/MPA reagent to
100 µl of sample"
Sampler.Pipet Volume=40, SourceVial=30,
DestinationVial=CurrentVial
NeedleHeight=5

Protocol "Mix solution in sample vial"
Mix SourceVial=CurrentVial,
NumberOfTimes=2, Volume=50.0
Volume=250.0

FlushSP
Protocol "Derivatize for 2 minutes at 23 °C"
DelaySP Time=2.0
Protocol "Pipet 30 µl of 1 M acetic acid to sample vial"
Pipet Volume=30.0, SourceVial=40,
DestinationVial=CurrentVial
NeedleHeight= 5

Protocol "Mix solution in sample vial"
Mix SourceVial=CurrentVial,
NumberOfTimes=2, Volume=100.0

Wait SamplePrep
0.000 Flow = 1.000
%B = 10.0
%C = 0.0
Emission.Autozero
Load
Wait CycleTimeState
Inject
Wait InjectState
Pressure.AcqOn
Emission.AcqOn
5.000 %B = 10.0
7.000 %B = 15.0
10.000 %B = 17.0
20.000 %B = 30.0
28.000 %B = 38.0
35.000 %B = 51.5
36.000 %B = 90.0
46.000 %B = 90.0
47.000 %B = 10.0
53.000 Emission.AcqOff
Pressure.AcqOff
Flow = 1.000
%B = 10.0
%C = 0.0
End

```

Abbildung 5.1: Chromeleon(v6.50)-Programm-Datenfile zur Steuerung des Dionex-HPLC-Systems bestehend aus Hochdruckgradientenpumpe P580HPG, Autosampler AS50, Thermal Compartment AS50 und Fluoreszenzdetektor RF2000.

5.4.6 BCA-Assay

Zur Durchführung einer Kalibrierung des Micro-BCA-Assays (Uptima) mit BSA wurden Kalibrierlösungen der Konzentrationen 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 und 40.0 µg/ml jeweils direkt aus einer 100 µg/ml BSA-Lösung in 1:2 verdünntem PBS-Puffer durch entsprechende Verdünnung mit 1:2 verdünntem PBS-Puffer hergestellt. Zur Herstellung der 100 µg/ml BSA-Lösung wurde die im Lieferumfang enthaltene 2 mg/ml BSA-Standardlösung in 0.05 % Natriumazid verwendet. Die Kalibrierlösungen und Blindlösungen (1:2 verdünnter PBS-Puffer) wurden zu je 150 µl in 3-4 Kavitäten einer klaren PS-Mikrotiterplatte im 96er-Format gegeben. Anschließend wurden jeweils 150 µl BCA-Reagenz, das aus 8.00 ml BCA-Reagenz A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 und Na-tartrat in 0.2 N NaOH), 7.68 ml BCA-Reagenz B (Bicinchoninsäure, 4 % in Wasser) und 0.32 ml BCA-Reagenz C (CuSO_4 , 4 % in Wasser) gemischt wurde, zupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde in Aluminiumfolie eingeschlagen und für 45-60 min bei 60°C inkubiert, bis eine deutlich dunkelviolette Färbung des höchsten BSA-Standards (0.7-0.8 AU) zu sehen war. Die Messung erfolgte im 8-Kanal-Photometer bei 550 nm. Rückstände der untersuchten Feinstaubproben wurden in 1 ml 1:2 verdünntem PBS-Puffer aufgenommen und im US-Bad (5 min) gelöst. Die Lösungen wurden - wenn nötig - in Multi-Reaktionsgefäße überführt und bei 20 000xg für 10 min bei 4°C (Zentrifuge Biofuge 28 RS) zentrifugiert und evtl. nach Verdünnung des Überstandes 150 µl der Lösung in 3-4 Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert.

5.4.7 NanoOrange-Assay

Zur Durchführung einer Kalibrierung des NanoOrange-Assays (MolecularProbes) mit BSA wurden Kalibrierlösungen in den Konzentrationen 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 3.0, 6.0 und 10.0 µg/ml in 1xNanoOrange Working Solution in Multi-Reaktionsgefäßen hergestellt. Hierfür wurde der mitgelieferte 2 mg/ml BSA-Standard zur Herstellung einer 10 µg/ml BSA-Lösung mit 1xNanoOrange Working Solution in einem braunen Probenglas 1:200 verdünnt. Aus der 10 µg/ml BSA-Lösung wurden die Kalibrierlösungen der Konzentrationen 3.0-10.0 µg/ml und eine 1 µM BSA-Lösung, die für die Kalibrierlösungen der Konzentration 0.1-0.6 µg/ml verwendet wurde, hergestellt. Für die BSA-Verdünnungsreihe benötigt man insgesamt 12 ml der 1xNanoOrange Working Solution (1.3 ml 10xProtein Quantification Diluent, 26 µl 500xNanoOrange Reagent, 11.7 ml Wasser). Die Kalibrierlösungen und Blindlösungen (1xNanoOrange Working Solution) wurden zu je 200 µl in 4 Kavitäten der schwarzen PP-Mikrotiterplatte im 96er-Format gegeben. Die Kavitäten wurden mit einer Mikrotiterplatten-Schutzfolie abgedichtet und bei 90-95°C für 10 min in Aluminiumfolie inkubiert. Nach Abkühlen der MTP auf RT wurde die Folie abgezogen und im Spektrofluorometer Victor² gemessen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 485 nm und die Fluoreszenzdetektion bei 590 nm. Die untersuchten Straßenstaubproben wurden in 1ml 1xNanoOrange Working Solution aufgenommen und im US-Bad (5 min) gelöst. Die Lösungen wurden in Multi-

Reaktionsgefäße überführt und bei 20 000xg für 10 min bei 4 °C (Zentrifuge Biofuge 28 RS) zentrifugiert und evtl. nach Verdünnung des Überstandes mit 1×NanoOrange Working Solution 200 µl der Lösung in 4 Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert.

5.5 PM2.5-PROBENAHEME

Atmosphärische Aerosolpartikel wurden auf Glasfaserrundfiltern (Macherey-Nagel) mit einem Durchmesser von 150 mm mittels des Hochdurchsatz-Partikelsammlers Digital DHA80 (Riemer Messtechnik) gesammelt. Das Gerät ist ein *stand alone* Instrument für den Außeneinsatz mit programmierbarer Zeitsteuerung, Protokolldrucker, Druck- und Temperatursensor, Durchflusskontrolle, Heizung und automatischem Filterwechsler. Es wurde mit einem PM2.5-Probenahmekopf betrieben (Partikelgröße <2.5 µm). Das Gerät arbeitete mit 30 m³/h (500 l/min) Durchfluss, der über eine Lichtschranke an einem Rotameter im Gerät in Abhängigkeit der Höhe über dem Meeresspiegel eingestellt und geregelt wurde. Es wurden an einem suburbanen (Großhadern, München), ländlichen (Hohenpeißenberg, 986m ü. N.N.) und einem alpinen Standort (Schneefernerhaus, Zugspitze, 2650m ü. N.N.) Feinstaubproben gesammelt.

Die Glasfaserfilter wurden bei 300 °C für 12 h in einer Aluminiumschale in einem Muffelofen ausgeheizt und anschließend im Trockenexsikkator über Blaugel trocken gehalten. Zur Wägung wurden die Filter 48 h in einer definiert feuchten Atmosphäre in einem Feuchteexsikkator über einer gesättigten Kaliumcarbonat-Lösung (45 %RH) äquilibriert und anschließend auf einem Edeltstahlgitter gewogen (Mettler Toledo AT261 DeltaRange). Nach der Beprobung der Filter wurden diese zuerst im Trockenexsikkator für 48 h getrocknet und vor Wägung der Massenzunahme durch die abgeschiedenen Partikel erneut 48 h im Feuchteexsikkator äquilibriert. Im Anschluss wurden die Filter nach erneuter Trocknung bis zur Analyse in Aluminiumfolie bei -18 °C gelagert.

5.6 EXTRAKTION

5.6.1 PM2.5-Glasfaserfilter (1/8) (EM1)

Mit PM2.5 belegte 150 mm-Glasfaserrundfilter (Macherey-Nagel) wurden auf einer eigens angefertigten Schneideplatte aus Aluminium mittels eines Schneidmessers in acht gleiche Teile geteilt. Ein Achtel eines Filters wurde mit einer Flachpinzette in ein 12 ml-Zentrifugenglas überführt und 2 ml Wasser zugegeben. Der Filter wurde anschließend mit Hilfe eines Glasstabes im Zentrifugenglas zerkleinert bis sich ein homogener Brei gebildet

hatte. Nach Zugabe von 4 ml Wasser wurde die Suspension mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer bei RT für 2 h gerührt. Das Zentrifugenglas wurde während der Extraktion mit Aluminiumfolie und Parafilm verschlossen. Es bildete sich während der Extraktion stets ein homogener Filterbrei. Der Rührfisch wurde aus der Filtersuspension entfernt und mit 500 µl Wasser abgespült. Anschließend wurde der Filterbrei bei 4500 U/min bei RT für 15 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 30F). Der Rückstand wurde einmalig mit 3 ml Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden über einen Spritzenfilter mit Glasfaservorfilter (0.45 µm CA-Membran) filtriert und der Spritzenfilter mit 500 µl Wasser gespült. Die Lösung wurde in einem Rollrandglas so schnell wie möglich in einem Stickstoff- oder durch einen Absolutfilter gereinigten Druckluftstrom bei RT zur Trockene eingedampft. In den Experimenten, die entsprechend gekennzeichnet wurden, ist 1:10 verdünnter PBS-Azid-Puffer als Extraktions- und Waschmedium verwendet worden.

5.6.2 PM2.5-Glasfaserfilter (EM2)

Mit PM2.5 belegte 150 mm-Glasfaserrundfilter (Macherey-Nagel) wurden wie in *Abschnitt 5.6.1* beschrieben in acht gleiche Teile geteilt. Sieben Achtel eines Filters wurden anschließend mit einer Flachpinzette in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 15 ml Wasser zugegeben. Der Filter wurde anschließend mit Hilfe eines Glasstabes zerkleinert bis sich ein homogener Brei gebildet hatte. Nach Zugabe von 25 ml Wasser und einem Rührfisch wurde das Zentrifugenröhrchen verschlossen und die Suspension auf einem Magnetrührer bei RT für 2 h gerührt. Das eingesetzte Volumen an Wasser wurde bei Extraktion einer anderen Anzahl von Filterachteln entsprechend angepasst. Es bildete sich während der Extraktion stets ein homogener Filterbrei. Der Rührfisch wurde anschließend aus der Filtersuspension entfernt und mit 1 ml Wasser abgespült. Der Filterbrei wurde bei 5 000 U/min bei RT für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 30F). Der Rückstand wurde 2-mal mit 10 ml Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden über einen Spritzenfilter mit Glasfaservorfilter (0.45 µm CA-Membran) filtriert und der Spritzenfilter mit 500 µl Wasser gespült. Die Lösung wurde in einem 100 ml-Rundhalskolben in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet.

5.6.3 PM2.5-Glasfaserfilterhydrolysat (EM3)

2 cm² eines Glasfaserrundfilters (Macherey-Nagel) wurden wie in *Abschnitt 5.8.4.3* beschrieben hydrolysiert. Es wurden 1.0 ml Wasser in das ein Filterhydrolysat enthaltende Hydrolyse-vial pipettiert und mit einem 8x3 mm-Rührfisch (neoLAB) bei RT auf einem Magnetrührer für 2 h extrahiert. Der Filterbrei wurde mit einer zuvor abgeschnittenen 100 µl Pipettenspitze in

ein Multi-Reaktionsgefäß überführt. Das Hydrolysevial wurde mit 200 µl und 100 µl Wasser sukzessive gewaschen und die Lösung ebenfalls transferiert. Es wurde bei 20 000×g für 10 min bei 4° C zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge 28RS) und der Rückstand mit 2x1.0 ml Wasser gewaschen. Die Überstände wurden über einen Spritzenfilter (0.22 µm CME-Membran) in ein 4-ml-Probenglas überführt und im Stickstoffstrom bei 30° C zur Trockene eingedampft. Das Hydrolysevial des Methodenblindwertes und eine frische 2 ml-Rollrandflasche (Generierung eines Extraktionsblindwertes) wurden analog behandelt.

5.6.4 Straßenstaub (EM4)

Die Probenahme der analysierten Straßenstaubproben erfolgte im Rahmen der Arbeiten von Dr. Thomas Franze.^[10] Es wurden 100 mg einer Straßenstaubprobe in ein Multi-Reaktionsgefäß eingewogen und 1 ml PBS-Azid-Puffer zugegeben. Die Extraktion erfolgte nach Zugabe eines 8x3 mm-Rührfisches (neoLAB) mit verschlossenen Reaktionsgefäßen bei RT für 4h auf einem Magnetrührer. Der Rührfisch wurde entfernt, mit 100 µl PBS-Azid-Puffer abgespült und bei 16 000×g für 10 min bei 4° C (Heraeus Biofuge 28 RS) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 1 ml-Einwegspritze mit Injektionskanüle aufgenommen und der Extrakt über einen Spritzenfilter (0.22 µm CME-Membran) in ein Multi-Reaktionsgefäß überführt.

5.7 GRÖSSENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Die zur Trockene eingedampften Extrakte der Feinstaubproben MOHP04 und IWC05 wurden in 1.7 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (5 min) gelöst. Die resultierende Suspension wurde in ein Zentrifugenglas überführt und bei 3 000 U/min für 10 min (Zentrifuge Universal 30F) bei RT zentrifugiert. Die Größenausschlussssäulen (Amersham Biosciences) wurden mit 30 ml 25 mM NaCl-Lösung gespült und anschließend mit 80 ml Wasser äquilibriert. Es wurden 2x750 µl des Probenüberstandes und nach Einsickern der Probe 500 µl Wasser auf die Säule pipettiert. Zur Gewinnung der makromolekularen Fraktion von Straßenstaubproben wurde der gesamte Extrakt (950-1 000 µl), der nach *Abschnitt 5.6.4* gewonnen wurde, aufgetragen und nach Einsickern weitere 1.50-1.55 ml Wasser auf die Fritte gegeben. Die dabei in beiden Fällen am Säulenausgang eluierende Lösung wurde als Totvolumen der Säule verworfen. Zur Isolierung der makromolekularen Fraktion wurden weitere 4 ml Wasser aufgetragen und die eluierende Lösung in einem 4-ml-Probenglas aufgefangen. Die makromolekulare Fraktion wurde anschließend im Stickstoffstrom bei 30° C zur Trockene eingedampft. Zur Äquilibration und Elution wurde - wenn nichts anderes angegeben - stets Wasser verwendet. Die eingedampften Extrakte der Feinstaubproben MOHP03, die mittels

BCA-Assay auf ihren WSP(>5 kDa)-Gehalt untersucht wurden, sind in 2 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad gelöst worden. 1 ml der Lösung wurde auf eine mit 1:10 verdünntem PBS-Puffer äquilibrierte Größenausschluss säule aufgetragen und nach Einsickern der Probe in die Fritte 1 ml 1:10 verdünnter PBS-Puffer auf die Säule pipettiert. Die Elution der WSP(>5 kDa)-Fraktion erfolgte mit 1:10 verdünntem PBS-Puffer wie oben beschrieben.

5.8 PROTEINHYDROLYSEN

5.8.1 Allgemeines

Die Hydrolyseeinsätze, die eigens für die *XP1500plus*-Reaktionsgefäße der *Mars5*-Mikrowelle angefertigt wurden, sind vor Überführung der im Hydrolysemedium aufgenommenen Rückstände mit 2 ml-Rollrandflaschen (Wicom) als Hydrolysevidials bestückt worden. Nach Transfer der Probe wurden diese anschließend mit Argon, das mittels einer Pasteurpipette vorsichtig eingeleitet wurde, gespült. Bei Verwendung des Hydrolyseeinsatzes I wurden zuerst die Hydrolysevidials der unteren Ebene mit den Proben befüllt, die obere Ebene aufgesetzt und diese mit Hydrolysevidials bestückt. Der Deckel des Hydrolyseeinsatzes wurde nach Transfer der Proben und Spülen mit Argon aufgesetzt und verschraubt. Die Hydrolyseeinsätze wurden in die *XP1500plus*-Reaktionsgefäße eingesetzt, die zuvor mit 5 ml (Hydrolyseeinsatz I) bzw. 10 ml (Hydrolyseeinsatz II) Hydrolysemedium befüllt wurden. Die Reaktionsgefäße wurden mind. 5 min mit Argon, das mittels einer Pasteurpipette an der Seite des Hochdruckbehälters auf die Oberfläche des Hydrolysemediums geleitet wurde, gespült. Eine andere Methode des Argonspülens der Hochdruckbehälter war die aufeinanderfolgende Erzeugung einer Vakuums mittels einer Wasserstrahlpumpe und das Einleiten von Argon. Die Vakuum- und Argonleitung wurden dabei über ein T-Schaltventil mit dem geöffneten Druckablassventil der Reaktionsgefäße verbunden. Der Vakuum/Argon-Zyklus wurde stets 3-mal wiederholt. Die *Mars5*-Mikrowelle wurde im druckkontrollierten Modus mittels eines linearen Druckgradienten gefahren. Der Druck wurde innerhalb von 5 min auf den Endwert von $t_H = 4$ bzw. 5 bar angehoben und dieser für die Zeit von $t_H - 5$ min gehalten. Die Mikrowellenleistung wurde der Anzahl der eingesetzten Hochdruckbehälter angepasst. Sie betrug bei ein, zwei und drei Reaktionsgefäßen 300, 600 bzw. 1200 W. Der Verlauf der Hydrolyse im Referenzgefäß wurde durch die Druckaufzeichnung der Mikrowellensoftware kontrolliert. Bei keiner der durchgeführten Hydrolysen zeigten sich signifikante Druckschwankungen. Nach Abkühlen der Proben wurde das Volumen des Hydrolysemediums in den Reaktionsgefäßen gemessen. Eine Undichtigkeit der Gefäße wäre

dadurch erkennbar gewesen. Als weitere Kontrolle der Hydrolysen diente stets die Wiederfindung von BSA. Nach Abkühlen der Proben wurden die Hydrolysevials dem Hydrolyseeinsatz entnommen und die restliche Hydrolyselösung in einem auf 30 °C beheizten Aluminiumblock unter einem Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Die Lösungen wurden nach Aufnahme in Wasser stets in ein 2-ml-Probenglas überführt und bei 4 °C oder -18 °C gelagert.

5.8.2 Hydrolysen nach Methode HM1-HM4

5.8.2.1 BSA und Nitro-(7.4)-BSA

Ein Hydrolysevial wurde mit 150 µl einer Probenlösung befüllt und anschließend 150 µl 9.5 M HCl (30 %) zupipettiert. Die als Proben eingesetzten Proteinlösungen waren 2.7 g/l BSA (400.5 µg, 6.0 nmol, HM1), 2.6 g/l Nitro-(7.4)-BSA (390.8 µg, 5.8 nmol, HM2), eine Lösung von 1.0 g/l Nitro-(7.4)-BSA (151.9 µg, 2.3 nmol, HM3) und 668 µM Norleucin (100.2 nmol) bzw. eine Lösung von 2.6 g/l Nitro-(7.4)-BSA (390.8 µg, 5.8 nmol, HM4) und 1.23 mM Norleucin (184.2 nmol). Als Blindlösungen wurden Wasser, 668 mM Norleucin (100.2 nmol) oder eine Lösung von 502 µM 3-Nitrotyrosin (75.3 nmol) und 1.40 mM Norleucin (209.9 nmol) verwendet. Die Hydrolysen wurden in 4.7 M HCl (5 ml) in Hydrolyseeinsatz I in der Mars5-Mikrowelle bei 4 bar für 35, 45, 60 und 180 min (HM1, 2, 3 und 4) durchgeführt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die Proteinproben wurden 1:160 je 100 µg hydrolysiertes Protein bzw. die Hydrolyseblindlösungen 1:2.5 je 1 nmol eingesetztem Norleucin mit Wasser verdünnt und 10 µl einer 100 µM α -Methyltyrosin-Lösung (1 nmol) addiert, so dass das Gesamtvolumen 1 ml betrug. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

5.8.2.2 Straßenstaubproben

Die Rückstände der makromolekularen Straßenstaubfraktionen W12, W14 und W101, die nach *Abschnitt 5.7* gewonnen wurden, sind in 500 µl Wasser aufgenommen und in je ein Hydrolysevial überführt worden. Die Lösungen wurden in einem Stickstoffstrom bei 30 °C zur Trockene eingedampft und in Hydrolyseeinsatz I eingesetzt. Es wurden 300 µl 4.7 % HCl zugegeben und die Hydrolysen in 4.7 M HCl (5 ml) in der Mars5-Mikrowelle bei 4 bar für 45 min (HM2) durchgeführt. 3-Nitrotyrosin wurde nach Eindampfen der Hydrolysatrückstände mittels AG1-X8-Harz angereichert (*Abschnitt 5.9.3*). Nach Anreicherung wurde der Rückstand der Essigsäurefraktion in 990 µl Wasser und 10 µl einer 100 µM α -Methyltyrosin-

Lösung (1 nmol) aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G2 und NBD-F-G4.

5.8.3 Hydrolysen nach Methode HM6

5.8.3.1 BSA

Es wurden 200 µl einer Lösung von 8.6 M HCl, 15 % (w/v) TFA und 0.15 % (w/v) Phenol in einem Hydrolysevial vorgelegt und 100 µl einer Lösung von 1.03 g/l BSA (102.5 µg, 1.5 nmol) und 474.4 µM Norvalin (47.4 nmol) zupipettiert. Zur Herstellung von Hydrolyseblindlösungen wurden 200 µl einer Lösung von 8.6 M HCl, 15 % (w/v) TFA und 0.15 % (w/v) Phenol und 100 µl 10.0 µM Norvalin-Lösung (1 nmol) in eine Hydrolysevial gegeben. Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 30 min (HM6) durchgeführt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die BSA-Hydrolysate und die Hydrolyseblindlösungen wurden 1:600 bzw. 1:10 verdünnt. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

5.8.3.2 PM2.5-Extrakte

Für die $CAA_{WSP(>5 \text{ kDa})}$ -Bestimmung mittels der OPA-Methode wurden eingedampfte Rückstände makromolekularer PM2.5-Fractionen in 350 µl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol und 3 µl 500 µM Norvalin-Lösung (1.5 nmol) aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst und 320 µl Lösung in ein Hydrolysevial überführt. PM2.5-Fractionen, denen bereits beim Eindampfen der makromolekularen Fraktion unmittelbar nach Größenfraktionierung 2 nmol Norvalin zugegeben wurde, sind in 350 µl Hydrolysemedium aufgenommen worden. Die makromolekularen Fraktionen von Blindfilterextrakten wurden entsprechend den makromolekularen Realfilterproben behandelt. Die Hydrolysen wurden in Hydrolyseeinsatz II in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol (10 ml) in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 30 min (HM6) durchgeführt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die PM2.5-Hydrolysate wurden für die OPA-Derivatisierung 1:10 bzw. 1:30-1:70 für die Glycinbestimmung und die Blindfilterhydrolysate 1:10 verdünnt. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

Für die $CAA_{WSP(>5 \text{ kDa})}$ -Bestimmung mittels der NBD-F-Methode wurden eingedampfte Rückstände makromolekularer PM2.5-Fractionen in 233 µl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v)

TFA und 0.1 % (w/v) Phenol, 107 μl Wasser und 10 μl 100 μM Norleucin-Lösung (1.0 nmol) aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst und 320 μl Lösung in ein Hydrolysevial überführt. Die Hydrolysen wurden in Hydrolyseeinsatz I in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA und 0.1 % (w/v) Phenol (5 ml) in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 30 min (HM6) durchgeführt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 990 μl Wasser und 10 μl 100 μM α -Methyltyrosin-Lösung (1 nmol) aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die HPLC-Analytik erfolgte nach 1:2 Verdünnung und Derivatisierung NBD-F-VD2 mit Gradient NBD-F-G4.

5.8.3.3 Standardaddition von BSA in PM2.5-Matrix (A)

Je ein von vier Glasfaserfilterachteln der PM2.5-Probe MOHP04-22 (10.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 33.9 mg) wurde nach Methode EM1 in Wasser extrahiert. Die Extrakte wurden im Druckluftstrom bei RT zur Trockene eingedampft. Die 4 Rückstände wurden in je 1.7 ml Wasser aufgenommen, in einem 12 ml-Zentrifugenglas vereinigt und bei 3 000 U/min für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 30F). 4 \times 1.5 ml des Überstandes wurden gemäß *Abschnitt 5.7* auf je einer SEC-Säule größenfraktioniert und die makromolekularen PM2.5-Fractionen im Druckluftstrom bei RT zur Trockene eingedampft. Drei der makromolekularen PM2.5-Fractionen wurden mit 1.2, 11.3 und 112.8 μg BSA und 1.7, 5.2 und 52.2 nmol Norvalin aufgestockt. Es wurden hierfür zwei Rückstände in 339 μl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.15 % (w/v) Phenol und 11 μl einer wässrigen Lösung von 0.11 g/l BSA (1.2 μg) und 151.5 μM Norvalin (1.7 nmol) bzw. 11 μl einer wässrigen Lösung aus 1.03 g/l BSA (11.3 μg) und 474.4 μM Norvalin (5.2 nmol) gelöst. Ein weiterer Rückstand wurde in 240 μl 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 0.15 % (w/v) Phenol und 110 μl einer wässrigen Lösung aus 1.03 g/l BSA (112.8 μg) und 474.4 μM Norvalin (52.2 nmol) aufgenommen. Die vierte makromolekulare PM2.5-Fraktion wurde in 347 μl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.15 % (w/v) Phenol und 3 μl einer 500 μM Norvalin-Lösung (1.5 nmol) gelöst. Alle Rückstände wurden im US-Bad (10 min) behandelt. Von diesen Lösungen wurden je 320 μl in ein Hydrolysevial überführt, dies entspricht einer Absolutmenge an addiertem BSA von 1.1, 10.3 und 103.2 μg . Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 0.1 % (w/v) Phenol (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 30 min (HM6) durchgeführt. Zur Kontrolle der Hydrolyse wurden 1, 10 und 103 μg BSA mit 1.5, 4.7 und 47.4 nmol Norvalin sowie eine Blindlösung mit 1 nmol Norvalin parallel zu den aufgestockten Realproben zersetzt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die nichtaufgestockte PM2.5-Probe wurde 1:10 und 1:60 und die mit BSA aufgestockten PM2.5-Proben 1:20, 1:50, 1:60 und 1:600 verdünnt. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

5.8.4 Hydrolysen nach Methode HM7-HM9

5.8.4.1 BSA

Es wurden 200 µl einer Lösung von 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure in einem Hydrolysevial vorgelegt und 100 µl einer Lösung von 1.02 g/l BSA (102.0 µg, 1.5 nmol) und 474.6 µM Norvalin (47.6 nmol) zupipettiert. In ein weiteres Hydrolysevial wurden 200 µl einer Lösung von 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure und 100 µl 1.0 µM Norvalin-Lösung (0.1 nmol) als Hydrolyseblindlösung gegeben. Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 35, 45 bzw. 60 min (HM7, HM8 und HM9) durchgeführt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die BSA-Hydrolysate wurden 1:600 verdünnt. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1. Die Blindhydrolysate wurden nicht verdünnt.

5.8.4.2 PM2.5-Extrakte

Der eingedampfte Rückstand einer WSP-Fraktion einer PM2.5-Probe wurde für die TAA_{WSP}-Bestimmung in 350 µl Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Es wurden 240 µl einer Lösung aus 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure und 12 µl Wasser im Hydrolysevial vorgelegt und anschließend 88 µl der gelösten WSP-Fraktion und 10 µl 500 µM Norvalin-Lösung (5 nmol) zupipettiert. Der eingedampfte Rückstand einer makromolekularen PM2.5-Fraktion wurde für die CAA_{WSP(>5 kDa)}-Bestimmung in 240 µl einer Lösung aus 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure, 100 µl Wasser und 10 µl 500 µM Norvalin-Lösung (5 nmol) aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst und 320 µl Lösung in ein Hydrolysevial überführt. Die Rückstände der entsprechenden Fraktionen von Blindfilterextrakten und Extraktionsblindlösungen wurden - mit dem einzigen Unterschied der Addition von 1.5 nmol Norvalin - analog behandelt. Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 35, 45 bzw. 60 min (HM7, HM8 und HM9) durchgeführt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die PM2.5-Hydrolysate wurden 1:30 und 1:150 bzw. 1:300 für die Glycinbestimmung, die Blindfilterhydrolysate 1:10 und 1:20 bzw. 1:60 für die Glycinbestimmung und die Extraktionsblindlösungen 1:5 verdünnt. Die in 350 µl Wasser aufgenommene WSP-Fraktion einer PM2.5-Probe wurde für die FAA-Bestimmung 1:300 und

1:600, die entsprechenden Blindfilterextrakte und Extraktionsblindlösungen 1:50 und 1:500 bzw. 1:20 jeweils ohne Addition des internen Standards verdünnt. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

5.8.4.3 PM2.5-Filter

Zur Analyse des Gesamtproteingehaltes (TP) einer atmosphärischen Feinstaubprobe wurden belegte 150 mm-Glasfaserrundfilter wie in *Abschnitt 5.6.1* in acht gleiche Teile geteilt. Es wurde eine Fläche von 2 cm² mit einem 16 mm-Stanzeisen aus einem Filterachtel herausgestochen und das Filterstück mit einer Flachpinzette vorsichtig in ein Hydrolysevial überführt. Es wurden 200 µl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure auf das Filterstück bzw. zur Generierung eines Methodenblindwertes in ein leeres Hydrolysevial pipettiert. Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 60 min (HM9) durchgeführt. Nach Ablauf des Abkühlprogramms wurde der Hydrolyseeinsatz entnommen und die hydrolysierten Filterstücke nach Methode EM3 extrahiert. Die eingedampften Extraktionsrückstände wurden in 1 ml Wasser aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst, in ein Multi-Reaktionsgefäß überführt und bei 20 000×g für 10 min bei 4° C (Zentrifuge Biofuge 28RS) zentrifugiert. Die Überstände der PM2.5-Proben wurden 1:30-1:100, die der Blindfilter und der Blindlösungen wurden 1:2-1:10 verdünnt.

5.8.4.4 Hydrolysekinetik von BSA in Feinstaubmatrix (B)

Je ein von vier Glasfaserfilterachteln der PM2.5-Probe IWC05-33 (6.8 µg/m³, 17.7 mg) und fünf Achtel der PM2.5-Probe IWC05-34 (8.3 µg/m³, 21.5 mg) wurden nach Methode EM1 in Wasser extrahiert. Die Extrakte wurden im Stickstoffstrom bei RT zur Trockene eingedampft. Die neun Rückstände wurden in je 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Jeweils drei Lösungen wurden in einem 4-ml-Probenglas vereinigt und im Stickstoffstrom bei 30° C zur Trockene eingedampft. Die drei Rückstände wurden anschließend in 570 µl Wasser aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst, in einem 12 ml-Zentrifugenglas (neoLAB) vereinigt und bei 4500 U/min für 10 min (Zentrifuge Universal 30F) zentrifugiert. 1.5 ml des Überstandes wurden gemäß *Abschnitt 5.7* größenfraktioniert. Es wurden jeweils 430 µl von 4 ml der makromolekularen PM2.5-Fraktion in neun 2-ml-Probengläser pipettiert und im Stickstoffstrom bei 30° C zur Trockene eingedampft. Drei von neun PM2.5-Fractionen wurden in 340 µl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure und 11 µl einer Lösung von 1.02 g/l BSA (11.2 µg) und 487.8 µM Norvalin (5.4 nmol) bzw. drei weitere PM2.5-Fractionen in 240 µl 8.8 M HCl,

15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure und 110 µl einer Lösung von 1.02 g/l BSA (112.2 µg) und 487.8 µM Norvalin (53.7 nmol) aufgenommen. Die verbleibenden PM2.5-Fractionen wurden in 347 µl einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure und 3 µl 514.1 µM Norvalin-Lösung (1.5 nmol) gelöst. Alle Rückstände wurden im US-Bad (10 min) behandelt. Von diesen Lösungen wurden je 320 µl in ein Hydrolysevial überführt, dies entspricht einer Absolutmenge an addiertem BSA von 10.2 und 102.6 µg. Ein Hydrolyseeinsatz wurde mit einer nichtaufgestockten PM2.5-Fraktion, mit zwei der mit BSA aufgestockten PM2.5-Fractionen und einer BSA-Probe (102.0 µg, 1.53 nmol) bestückt. Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der *Mars5*-Mikrowelle bei 5 bar für 35, 45 bzw. 60 min (HM7, HM8 und HM9) durchgeführt. Die Hydrolysen erfolgten jeweils im *XP1500plus*-Referenzgefäß. Die Hydrolysrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die nichtaufgestockte PM2.5-Probe wurde 1:10 und 1:30 mit BSA aufgestockten PM2.5-Proben 1:60 und 1:600 verdünnt. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

5.8.4.5 Standardaddition von BSA in PM2.5-Matrix (C)

Ein Glasfaserfilter der PM2.5-Probe IWC05-50 (10.2 µg/m³, 65.7 mg) wurde vollständig nach Methode EM2 in Wasser extrahiert. Der Rückstand wurde in 3.2 ml Wasser aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst und anschließend 2 × 1.45 ml in je ein Multi-Reaktionsgefäß pipettiert. Die beiden Suspensionen wurden bei 20 000×g für 10 min bei 4 °C (Zentrifuge Biofuge 28RS) zentrifugiert. Für Wiederfindungsexperimente in der WSP(>5 kDa)-Fraktion wurden 1.45 ml eines Zentrifugats gemäß *Abschnitt 5.7* größenfraktioniert und die makromolekularen PM2.5-Fractionen im Stickstoffstrom bei 30 °C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml einer Lösung von 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst und 4 × 240 µl der Lösung in je ein 2-ml-Probenglas überführt. Es wurden 11 µl einer Lösung von 0.11 g/l BSA (1.2 µg) und 416.9 µM Norvalin (4.6 nmol) und 99 µl Wasser zu einer Probe pipettiert. Zwei weitere Proben wurden mit 110 µl einer Lösung von 0.11 g/l BSA (12.0 µg) und 91.0 µM Norvalin (10.0 nmol) bzw. 110 µl einer Lösung von 1.02 g/l BSA (112.2 µg) und 474.7 µM Norvalin (52.2 nmol) aufgestockt. Zu der vierten Probe wurden 100 µl Wasser und 10 µl 500.3 µM Norvalin-Lösung (5.0 nmol) zugegeben. Für Wiederfindungsexperimente in der WSP-Fraktion wurden 700 µl eines Zentrifugats im Stickstoffstrom bei 30 °C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml in einer Lösung von 8.8 M HCl, 15 % (w/v) TFA, 1.5 % (w/v) Phenol und 4.4 mM Ascorbinsäure aufgenommen, im US-Bad (10 min) gelöst und 4×240 µl der Lösung in je ein 2-ml-Probenglas überführt. Die Standard-

addition wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Von diesen Lösungen wurden je 320 µl in ein Hydrolysevial überführt, dies entspricht einer Absolutmenge an addiertem BSA von 1.1, 10.9 und 102.6 µg. Die Hydrolyse wurde in einer Lösung von 6 M HCl, 10 % (w/v) TFA, 1 % (w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure (10 ml) in Hydrolyseeinsatz II in der Mars5-Mikrowelle bei 5 bar für 35, 45 bzw. 60 min (HM7, HM8 und HM9) durchgeführt. Die Proben einer Fraktion wurden in je einem *XP1500plus*-Reaktionsgefäß hydrolysiert. Zur Kontrolle der Hydrolyse wurden 1.1, 10.9 und 102.0 µg BSA mit 4.2, 9.1 und 47.5 nmol Norvalin sowie eine Blindlösung mit 0.1 nmol Norvalin parallel zu den aufgestockten Realproben in einem weiteren Hochdruckbehälter zersetzt. Die Hydrolysatrückstände wurden nach Eindampfen in 1 ml Wasser aufgenommen und im US-Bad (10 min) gelöst. Die nichtaufgestockte und die mit BSA aufgestockten WSP(>5 kDa)-Fraktionen wurden 1:30-1:90 bzw. 1:600 verdünnt, während die entsprechenden WSP-Fraktionen 1:30- 1:300 bzw. 1:600 verdünnt wurden. Die HPLC-Analytik erfolgte nach Derivatisierung OPA-VD1 mit Gradient OPA-G1.

5.9 NITROPROTEINANALYTIK

5.9.1 Synthese von Nitroproteinen

5.9.1.1 Nitro-(7.4)-BSA

Es wurden 2 ml einer 0.05 g/ml BSA-Lösung (0.1 g, 1.5 µmol, 66428.5 Da, NCBI-Datenbank: AAN117824) in PBS-Puffer in einem Rollrandglas (Roth) vorgelegt und 120 µl einer 0.5 M TNM-Lösung (60 mmol) in Methanol unter Rühren zugegeben. Es wurde eine leichte Trübung der Lösung beobachtet, die sich im Verlauf der Reaktion wieder löste. Es wurde für 2 h bei RT gerührt. Eine PD10-Säule (Amersham Biosciences) wurde mit 40 ml PBS-Azid-Puffer gespült. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden 1.7 ml der Reaktionslösung auf die Säule pipettiert. Nach Einsickern der Lösung wurden 0.8 ml PBS-Azid-Puffer aufgetragen und 300 µl-Fractionen auf einer Mikrotiterplatte aus Glas gesammelt. Das Nitroprotein wurde anschließend durch Auftragen von 4 ml PBS-Azid-Puffer von der Säule eluiert. Zur Identifizierung der Nitroproteinfraktionen wurde die Mikrotiterplatte im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm gemessen. Die positiven Fraktionen wurden in einem 4-ml-Probenglas vereinigt und deren Volumen notiert. Die Proteinprobe wurde 1:60 mit 0.05 N NaOH-Lösung in einer Küvette (Brand) verdünnt und der Nitrotyrosingehalt des nitrierten BSA wie in *Abschnitt 5.9.1.4* beschrieben bestimmt. Es wurde ein Nitrotyrosingehalt von 7.4 Moleküle pro BSA-Molekül ermittelt.

5.9.1.2 Nitro-(4.6)-Ovalbumin

Es wurden 1.5 ml PBS-Puffer in einem Rollrandglas vorgelegt, 0.5 ml einer 0.034 g/ml OVA-Lösung (0.017 g, 0.40 μ mol, 42 750 g/mol, NCBI-Datenbank: P01012) in PBS-Puffer und anschließend 30 μ l einer 1 M TNM-Lösung (0.030 mmol) in Methanol unter Rühren zupipettiert. Es wurde für 3 h und 40 min bei RT gerührt, dann erneut 15 μ l einer 1 M TNM-Lösung (0.015 mmol) in Methanol zugegeben und für 1 h bei RT gerührt. Eine PD10-Säule (Amersham Biosciences) wurde wie in *Abschnitt 5.9.1.1* vorbereitet, die Fraktionen auf einer Mikrotiterplatte aus Glas gesammelt und die Nitroproteinfraktionen im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm identifiziert. Die positiven Fraktionen wurden in einem 4-ml-Probenglas vereinigt und das Volumen notiert. Die Proteinprobe wurde 1:5 mit 0.05 N NaOH-Lösung in einer Küvette verdünnt und der Nitrotyrosingehalt des nitrierten OVA wie in *Abschnitt 5.9.1.4* beschrieben bestimmt. Es wurde ein Nitrotyrosingehalt von 3.4 Moleküle pro OVA-Molekül ermittelt.

5.9.1.3 Nitro-(3.4)-Bet v 1

Es wurden 400 μ l einer 3 mg/ml Bet v 1-Lösung (1.2 mg, 0.07 μ mol, 17 569.4 Da, NCBI-Datenbank: P43185) in PBS-Puffer in einem 2-ml-Probenglas vorgelegt, 45 μ l einer 0.5 M TNM-Lösung (0.0225 mmol) in Methanol unter Rühren zupipettiert und 90 min bei RT gerührt. Es wurde eine leichte Trübung der Lösung beobachtet, die sich im Verlauf der Reaktion wieder löste. Eine PD10-Säule (Amersham Biosciences) wurde wie in *Abschnitt 5.9.1.1* vorbereitet und 440 μ l der Reaktionslösung nach Ablauf der Reaktionszeit auf die Säule aufgetragen. Nach Einsickern der Lösung wurden weitere 2.060 ml PBS-Azid-Puffer auf die Säule pipettiert und 300 μ l-Fraktionen auf einer Mikrotiterplatte aus Glas gesammelt. Das Nitroprotein wurde anschließend durch Auftragen von 4 ml PBS-Azid-Puffer von der Säule eluiert. Zur Identifizierung der Nitroproteinfraktionen wurde die Mikrotiterplatte im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm gemessen. Die positiven Fraktionen wurden in einem 2-ml-Probenglas vereinigt und das Volumen notiert. Die Proteinprobe wurde 1:2 mit 0.1 N NaOH-Lösung in einer Küvette verdünnt und der Nitrotyrosingehalt des nitrierten Bet v 1 wie in *Abschnitt 5.9.1.4* beschrieben bestimmt. Es wurde ein Nitrotyrosingehalt von 3.4 Moleküle pro Bet v 1-Molekül ermittelt.

5.9.1.4 Spektrophotometrische Nitrotyrosinbestimmung

Es wurde eine Verdünnungsreihe von 3-Nitrotyrosin in den Konzentrationen 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.05 mM, 0.01 mM, 0.005 mM aus einer 1 mM 3-Nitrotyrosin-Lösung in 0.05 N NaOH-Lösung in Rollrandgläsern hergestellt. Die Absorptionen der Kalibrierlösungen und verdünnten Nitroproteinproben wurden am UV/VIS-Spektrophotometer in Küvetten bei

428 nm 3-mal gemessen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden gemäß der Kalibriermethode, die in *Abschnitt 5.4.2* beschrieben wurde, bestimmt. Die Berechnung des Nitrotyrosingehaltes der Nitroproteine erfolgte aus dem Verhältnis der aus der Anfangskonzentration berechneten Stoffmenge des Proteins und der ermittelten Stoffmenge von 3-Nitrotyrosin in der Küvette. Die Konzentration der Proteinprobe wurde mittels BCA-Assay als BSA- oder OVA-Äquivalent überprüft.

5.9.2 Enzymimmunoassays

5.9.2.1 Einseitiger nichtkompetitiver Immunoassay

Für die Kalibrierung des einseitigen nichtkompetitiven Enzymimmunoassays wurde eine Verdünnungsreihe von Nitro-(14.3)-BSA in PBS-Azid-Puffer in den Konzentrationen 0.1, 1, 10, 50, 100 und 1 000 µg/l aus einer 5 g/l Nitro-(14.3)-BSA-Lösung in PBS-Azid-Puffer hergestellt. 100 µl einer Kalibrierlösung wurden in 4facher Wiederholung und PBS-Azid-Puffer als Blindlösung in 8facher Wiederholung in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert, die Mikrotiterplatte mit Parafilm abgedichtet und bei RT auf dem Orbital-Schüttler über Nacht inkubiert. Straßenstaub- bzw. Feinstaubextrakte wurden in einer geeigneten Menge PBS-Azid-Puffer aufgenommen und ebenfalls in 4facher Wiederholung zu je 100 µl auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.

Die Platte wurde 3-mal mit PBS-Waschpuffer mit einem 8-Kanal-Waschgerät gewaschen, wobei die Kavitäten bei jedem Durchgang 2-mal aufgefüllt und abgesaugt wurden. Nach dem Waschschrift wurden noch anhaftende Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen entfernt. Das Blocken freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte erfolgte mit 150 µl einer 20 g/l BSA-Lösung und 100 µl einer 20 g/l Casein-Lösung in Wasser pro Kavität. Das Casein wurde zuvor durch kurzes Erhitzen gelöst. Anschließend wurde wie oben beschrieben gewaschen. Die Mikrotiterplatte wurde bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1.5 h inkubiert.

Es wurden 100 µl einer Primärantikörper-Lösung (1:2 500) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Die Primärantikörper-Lösung wurde aus 5 µl des Primärantikörpers pAb Oxis 24312, 310 µl einer 2 % BSA-Lösung in Wasser und 12.2 ml PBS-Puffer frisch hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde wie oben beschrieben gewaschen.

Es wurden anschließend 100 µl der Sekundärantikörper-Lösung (1:10 000) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde aus 1.2 µl des Sekundärantikörpers Anti-Schaf-IgG-POD, 300 µl einer 2 % BSA-Lösung in Wasser, 100 µl einer 12.5 g/l TMB-Stammlösung und 11.6 ml PBS-Puffer (wichtig: ohne Azidzusatz!) hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde wie oben beschrieben gewaschen.

Für die Enzymreaktion wurden 100 µl der frisch hergestellten Substratlösung in jede Kavität pipettiert. Die Herstellung der Substratlösung erfolgte aus 25 ml Substratpuffer, 300 µl einer 12.5 g/l TMB-Stammlösung und 100 µl einer 1 % Wasserstoffperoxid-Stammlösung. Die Enzymreaktion wurde bei RT auf dem Orbital-Schüttler für ca. 5 min durchgeführt und durch Zugabe von 100 µl einer 5 % Schwefelsäure-Lösung abgestoppt (analog in der Reihenfolge bei Zugabe der Substratlösung). Die Absorptionsmessung erfolgte stets innerhalb von 10 min nach dem Abstoppen der Enzymreaktion im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm gegen einen Referenzfilter von 620 nm.

5.9.2.2 Sandwich-Immunoassay

Es wurden 100 µl einer Fängerantikörper-Lösung (1:2 500) in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert, diese mit Parafilm abgedichtet und bei RT auf dem Orbital-Schüttler über Nacht inkubiert. Die Fängerantikörper-Lösung wurde aus 5 µl einer 3 g/l anti-Schaf-IgG-Lösung und 12.5 ml Coating-Puffer hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben gewaschen und geblockt.

Es wurden 100 µl der 1. Primärantikörper-Lösung (1:2 500) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Die 1. Primärantikörper-Lösung wurde aus 5 µl des 1. Primärantikörpers pAb Oxis 24312, 310 µl einer 2 % BSA-Lösung in Wasser und 12.2 ml PBS-Puffer frisch hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben gewaschen.

Es wurden sofort 20 µl PBS-Puffer in je eine Kavität pipettiert, damit die Platte nicht austrocknet. Für die Kalibrierung des Sandwich-Enzymimmunoassays wurde eine Verdünnungsreihe von Nitro-(14.3)-BSA in PBS-Azid-Puffer in den Konzentrationen 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 und 100 mg/l aus einer 5 g/l Nitro-(14.3)-BSA-Lösung in PBS-Azid-Puffer hergestellt. Je 100 µl einer Kalibrierlösung wurde in 4facher Wiederholung und PBS-Azid-Puffer als Blindlösung in 8facher Wiederholung in je eine Kavität pipettiert, die Mikrotiterplatte mit Parafilm abgedichtet und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Straßenstaub- bzw. Feinstaubextrakte wurden in einer geeigneten Menge PBS-Azid-Puffer aufgenommen und ebenfalls in 4facher Wiederholung zu je 100 µl auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben gewaschen.

Es wurden 100 µl der 2. Primärantikörper-Lösung (1:10 000) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1.5 h inkubiert. Die 2. Primärantikörper-Lösung wurde aus 1.5 µl des 2. Primärantikörpers mAK 39B6 (Alexis), 375 µl 2 % BSA-Lösung in Wasser und 14.62 ml PBS-Puffer frisch hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben gewaschen.

Es wurden anschließend 100 µl der Sekundärantikörper-Lösung (1:20 000) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Die Sekundärantikörper-

Lösung wurde aus 1.5 µl des Sekundärantikörpers Anti-Maus-IgG-POD (Vector Labs), 750 µl einer 2 % BSA-Lösung in Wasser, 240 µl einer 12.5 g/l TMB-Stammlösung und 29 ml PBS-Puffer (wichtig: ohne Azidzusatz!) hergestellt. Die Enzymreaktion und Absorptionsmessung wurde nach Waschen der Mikrotiterplatte wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben durchgeführt.

5.9.2.3 Kompetitiver Immunoassay

Für den kompetitiven Enzymimmunoassay wurde eine Mikrotiterplatte mit je 100 µl einer 0.05 mg/l Nitro-(14.3)-BSA-Lösung in PBS-Azid-Puffer pro Kavität bei RT auf dem Orbital-Schüttler über Nacht vorbeschichtet. Die Mikrotiterplatte wurde wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben gewaschen und geblockt.

Die Kompetition wurde mit 3-Nitrotyrosin in den Konzentrationen 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 und 1 000 µM in PBS-Puffer (pH = 9.0) durchgeführt. Die Inhibitionslösungen wurden dabei aus einer 16.7 mM 3-Nitrotyrosin-Lösung in PBS-Puffer hergestellt. Es wurden 100 µl der Inhibitionslösungen in je eine Kavität in 4facher Wiederholung und der entsprechende Puffer als Blindlösung in 8facher Wiederholung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Straßenstaub- und Feinstaubextrakte und HPLC- und IAC-Fractionen wurden evtl. nach Aufnahme in PBS-Puffer und/oder nach Verdünnung auf die Mikrotiterplatte transferiert.

Unmittelbar im Anschluss wurden 100 µl der Primärantikörper-Lösung (1:2 500) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Die Primärantikörper-Lösung wurde aus 2.5 µl des Primärantikörpers pAb Oxis 24312, 155 µl einer 2 % BSA-Lösung in Wasser und 6.1 ml PBS-Puffer hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben gewaschen.

Es wurden anschließend 100 µl der Sekundärantikörper-Lösung (1:10 000) in jede Kavität pipettiert und bei RT auf dem Orbital-Schüttler für 1 h inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde aus 1.2 µl des Sekundärantikörpers Anti-Schaf-IgG-POD, 300 µl einer 2 % BSA-Lösung in Wasser, 100 µl einer 12.5 g/l TMB-Stammlösung und 11.6 ml PBS-Puffer (wichtig: ohne Azidzusatz!) hergestellt. Die Enzymreaktion und Absorptionsmessung wurde nach Waschen der Mikrotiterplatte wie in *Abschnitt 5.9.2.1* beschrieben durchgeführt.

5.9.3 AG1-X8-Anreicherung

0.6 g AG1-X8-Anionenaustauscherharz (Bio-Rad) wurden in 6 ml Wasser suspendiert und in eine mit Fritte versehene Glassäule überführt. Das Harz wurde mit 4 ml Ethanol und 4 ml Wasser gewaschen. Es wurden 4 ml einer 1 M Essigsäure auf die Säule aufgetragen. Der Eluent hatte nach Ende der Zugabe einen pH-Wert von 2 erreicht. Anschließend wurde mit Wasser (20 ml) gewaschen bis der Eluent einen pH-Wert von 5 erreicht hatte. Auf das Harz wurde eine Fritte aufgebracht und die Säule mit 4 ml 50 mM Ammoniumacetat-Puffer

äquiliibriert. Die Aufnahme eines Straßenstaubhydrolysates, das durch Extraktion von 100 mg Straßenstaub (*Abschnitt 5.6.4*), Größenfraktionierung (*Abschnitt 5.7*) und Proteinhydrolyse HM2 (*Abschnitt 5.8.2.2*) gewonnen wurde, erfolgte durch Zugabe von 0.9 ml 50 mM Ammoniumacetat-Puffer im Hydrolysevial. Die Lösung wurde im US-Bad (10 min) gelöst und auf die Fritte der Glassäule aufgetragen. Es wurde mit 3.2 ml Wasser gewaschen und 3-Nitrotyrosin mit 4 ml 1 M Essigsäure vom Harz eluiert. Es wurde anschließend mit 2 ml Wasser nachgewaschen und jede Fraktion in einem 4-ml-Probenglas gesammelt und im Stickstoffstrom bei 30 °C zur Trockene eingedampft.

5.9.4 Immunaффinitätschromatographie (IAC)

5.9.4.1 Allgemeines

Es wurden kommerziell erhältliche HiTrap-Säulen (Amersham Biosciences) mit NHS-aktivierter Sepharose-Matrix verwendet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter mit 0.22 µm-CME-Membran (Roth) filtriert und mit Einmalspritzen (Braun) auf die Säule aufgetragen. Die Injektion von 100 µl Standardlösungen wurde mit Hilfe einer Probenschleife (PEEK, 100 µl) und einem 10-Port-2-Wege-Ventil (Rheodyne) durchgeführt. Die Säulen wurden mit Kapillaren (PEEK, 1/16", 0.02" ID), entsprechenden Fittings (1/4 - 28, 0.125" ID) und Ferrules (PEEK, 1/8") mit dem Ventil verbunden. Alle Lösungen wurden manuell mit Einmalspritzen auf die Säulen aufgetragen. Zu Beginn der Experimente wurden die γ-Globulin- und Oxis-IAC-Säule stets mit einer Flussrate von 1/2 Trp./s mit 10 ml PBS-Puffer äquiliibriert. Sowohl die Bindung des Analyten auf die Säule als auch die Elution mit PBS-Puffer erfolgte mit einer Flussrate von 1/4 Trp./s. Die Spülschritte mit organischem Lösungsmittel wurden mit einer Flussrate von 1/2 Trp./s durchgeführt. Das Eluat wurde auf einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) á 4 Trp. fraktioniert. Das Volumen einer Fraktion wurde als mittleres Volumen V_m , das sich aus dem Volumen der am Säuleneingang aufgetragenen und der entsprechenden Anzahl der am Säulenausgang eluierenden Trp. bzw. Anzahl der gesammelten Fraktionen berechnet, angegeben. Die Säulen wurden nach den Versuchen stets mit mind. 2 ml Phosphat-Azid-Puffer gespült und anschließend bei 4 °C gelagert.

5.9.4.2 Immobilisierung von γ-Globulin

Nach dem Öffnen einer HiTrap-Säule (Amersham Biosciences) wurde mit 3x2 ml eiskühler 1 mM Salzsäure gespült. Eine 5 mg/ml γ-Rinderglobulin-Lösung (Serva Electrophoresis) in Coupling-Puffer wurde in einem Multi-Reaktionsgefäß bei 20 000×g, 4 °C für

10 min (Zentrifuge Biofuge 28RS) zentrifugiert und anschließend 1 ml des Überstandes auf die HiTrap-Säule aufgetragen. Die Säule wurde für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 1.5 ml Coupling-Puffer gewaschen und das gesamte Eluat für die Bestimmung der Kopplungsausbeute in einem Multi-Reaktionsgefäß gesammelt. Es wurde mit 3x2 ml Blocking-Puffer und 3x2 ml Waschpuffer zur Entfernung überschüssiger NHS-Gruppen gespült und die Säule für 20 min bei RT inkubiert. Diese Arbeitsschritte wurden 2-mal wiederholt.

5.9.4.3 Immobilisierung von pAk Oxis 24312

Der polyklonale Antikörper Oxis 24312 aus Schaf wurde mittels einer PD-10-Größenausschlusschromatographie-Säule (Amersham Biosciences), die zuvor mit 30 ml Coupling-Puffer äquilibriert wurde, durchgeführt. Das Schafserum wurde bei $20\,000\times g$, $4^{\circ}C$ für 10 min (Zentrifuge Biofuge 28RS) zentrifugiert und 550 μl des Überstandes auf eine HiTrap-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen. Nach Einsickern der Lösung wurden weitere 1.45 ml Coupling-Puffer aufgegeben. Es wurden weitere 2.1 ml des Coupling-Puffer auf die Säule pipettiert und die dabei eluierende Lösung als makromolekulare Fraktion in zwei Multi-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Zur Kopplung des Antikörpers an die NHS-aktivierte Sepharose-Matrix wurde 1.0 ml der makromolekularen Fraktion aufgetragen und analog wie bei der Herstellung der γ -Globulin-Säule verfahren.

5.9.4.4 Kapazitätsbestimmung

Die Kapazitätsbestimmung erfolgte über einen Vergleich der Durchbruchkurven von 3-Nitrotyrosin auf der γ -Globulin-Säule (Kurve I) und der Oxis-IAC-Säule (Kurve II) sowie von Norleucin (Kurve III) und 3-Nitrotyrosin (Kurve IV) auf der Oxis-IAC-Säule.

Durchbruchskurve I

Es wurden 2 ml einer 6 μM 3-Nitrotyrosin-Lösung in PBS-Puffer auf die γ -Globulin-Säule aufgetragen und anschließend mit 2x2 ml PBS-Puffer eluiert. Das erste Eluat (2 ml) wurde als Fraktion 1-13 ($V_m = 154 \mu l$), das zweite und dritte Eluat (je 2 ml) als Fraktion 14-26 bzw. 27-39 ($V_m = 154 \mu l$) gesammelt. 100 μl einer Fraktion wurden als Inhibitorlösung im kompetitiven EIA (*Abschnitt 5.9.2.3*) zur Detektion von 3-Nitrotyrosin eingesetzt.

Durchbruchskurve II

Es wurden 2 ml einer 6 μM 3-Nitrotyrosin-Lösung in PBS-Puffer auf die Oxis-IAC-Säule aufgetragen und anschließend mit 2 ml PBS-Puffer und 3 ml 20 % (v/v) ACN eluiert. Das erste und zweite Eluat (je 2 ml) wurden als Fraktion 1-13 bzw. als Fraktion 14-26 ($V_m =$

154 μ l), das dritte Eluat von 0.8 ml als Fraktion 27-31 gesammelt ($V_m = 154 \mu$ l). 100 μ l einer Fraktion wurden als Inhibitorlösung im kompetitiven EIA (*Abschnitt 5.9.2.3*) zur Detektion von 3-Nitrotyrosin eingesetzt.

Durchbruchskurve III und IV

Es wurden 2 ml einer Lösung aus 6 μ M 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer auf die Oxis-IAC-Säule aufgetragen und das Eluat als Fraktion 1-14 ($V_m = 143 \mu$ l) gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 2 ml 50 % MeOH gespült. Die Fraktionen wurden 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mittels Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G2 auf ihren Gehalt an Norleucin (Durchbruchskurve III) und 3-Nitrotyrosin (Durchbruchskurve IV) untersucht.

5.9.4.5 Chromatographie

Trennung von 1 nmol 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer

Es wurden 100 μ l einer Lösung aus 10 μ M 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer auf die γ -Globulin-Säule injiziert und anschließend mit 2 ml PBS-Puffer eluiert. Das Eluat wurde als Fraktion 1-13 á 4 Trp. und Fraktion 14 á 2 Trp. ($V_m = 148 \mu$ l) gesammelt. Die Fraktionen wurden 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mittels Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G2 auf ihren Gehalt an Norleucin und 3-Nitrotyrosin untersucht.

Es wurden 100 μ l einer Lösung aus 10 μ M 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer auf die Oxis-IAC-Säule injiziert und anschließend mit 2x2 ml und 1 ml PBS-Puffer eluiert. Das erste Eluat (2 ml) wurde als Fraktion 1-14 ($V_m = 146 \mu$ l), das zweite Eluat (2 ml) als Fraktion 15-29 ($V_m = 138 \mu$ l) und schließlich das dritte Eluat (1 ml) als Fraktion 30-35 á 4 Trp. und Fraktion 36 á drei Trp. ($V_m = 133 \mu$ l) gesammelt. Es wurde mit 3 ml 20 % (v/v) ACN gewaschen. Die ACN-Fraktion wurde in einem 4-ml-Probenglas aufgefangen und im Stickstoffstrom bei 30° C zur Trockene eingedampft. Der eingedampfte Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen. Die Fraktionen wurden 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mittels Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G2 auf ihren Gehalt an Norleucin und 3-Nitrotyrosin untersucht.

Trennung von 0.1 nmol 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer

Es wurden 100 μ l einer Lösung aus 1 μ M 3-Nitrotyrosin und Norleucin in PBS-Puffer auf die Oxis-IAC-Säule injiziert und anschließend mit 2x2 ml PBS-Puffer eluiert. Das erste Eluat (2 ml) wurde als Fraktion 1-14 ($V_m = 146 \mu$ l) und das zweite Eluat (2 ml) als Fraktion 15-27 á 4 Trp. und Fraktion 28 á 2 Trp. ($V_m = 143 \mu$ l) gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 2 ml 50 % MeOH und 1 ml Phosphat-Azid-Puffer gespült. 0.8 ml des Eluates wurden als Fraktion 28 á 2 Trp. und Fraktion 29-32 und Fraktion 33 á drei Trp. aufgefangen ($V_m =$

152 μ l). Die danach eluierende Lösung (2.2 ml) wurde in einem 4-ml-Probenglas aufgefangen und im Stickstoffstrom bei 30° C zur Trockene eingedampft. Die Fraktionen wurden 1:2 bzw. 1:100 verdünnt und mittels Methode NBD-F-VD2/NBD-F-G2 auf ihren Gehalt an Norleucin und 3-Nitrotyrosin untersucht. Die eingedampfte MeOH-Fraktion wurde in 250 μ l Wasser aufgenommen und unverdünnt derivatisiert.

6 DATEN

6.1 PROTEINHYDROLYSE

Tabelle 6.1: Zeitabhängigkeit der Aminosäurezusammensetzung von BSA (102 µg) und der prozentualen Übereinstimmung (CA) bei Hydrolyse in 6 M HCl, 10 %(w/v) TFA, 1 %(w/v) Phenol und 3 mM Ascorbinsäure für 30, 45 und 60 min bei 5 bar (HM7, HM8 und HM9) und Extrapolation der Hydrolysekinetikdaten (Abschnitt 3.1.4.8).

AA	Extrapolation			Hydrolyse t _H [min]					
	n _p ⁽¹⁾	n _e ⁽²⁾	n _p -n _e	30		45		60	
				n _e	n _p -n _e	n _e	n _p -n _e	n _e	n _p -n _e
Asx	54.0	58.4	4.4	57.5	3.5	56.3	2.3	56.6	2.6
Glx	79.0	82.3	3.3	84.2	5.2	82.6	3.6	82.3	3.3
Ser	28.0	29.9	1.9	24.3	3.7	21.2	6.8	18.8	9.2
His	17.0	18.1	1.1	19.1	2.1	19.0	2.0	19.6	2.6
Gly	16.0	14.5	1.5	15.7	0.3	15.2	0.8	15.3	0.7
Thr	34.0	31.7	2.3	31.2	2.8	31.0	3.0	29.6	4.4
Arg	23.0	21.4	1.6	22.3	0.7	22.9	0.1	22.9	0.1
Ala	46.0	47.4	1.4	48.9	2.9	47.6	1.6	48.1	2.1
Tyr	20.0	19.8	0.2	17.5	2.5	20.5	0.5	20.2	0.2
Val	36.0	38.3	2.3	35.9	0.1	39.5	3.5	40.2	4.2
Met	4.0	3.7	0.3	4.0	0.0	3.8	0.2	4.1	0.1
Phe	27.0	26.0	1.0	27.3	0.3	27.6	0.6	27.8	0.8
Ile	14.0	13.6	0.4	13.3	0.7	14.3	0.3	14.4	0.4
Leu	61.0	61.1	0.1	63.1	2.1	64.6	3.6	64.9	3.9
Lys	59.0	51.7	7.3	53.9	5.1	51.9	7.1	53.2	5.8
CA ⁽³⁾ [%]	100	94.4		93.8		93.0		92.2	

(1) - n_p = theoretische Aminosäureanzahl pro BSA-Molekül; (2) - n_e = experimentell ermittelte Aminosäureanzahl pro BSA-Molekül; (3) - CA = *compositional agreement* (prozentuale Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung).

Tabelle 6.2: Aufstockungswiederfindungen (AW) von Aminosäuren aus BSA in makromolekularer WSP(>5 kDa)-Matrix der PM2.5-Proben IWC05-33 und IWC05-34 (Standardadditionsexperiment **B**, Abschnitt 3.2.4.3). Histidin, Arginin und Lysin siehe (1).

AA	AW					
	103 µg BSA			10 µg BSA		
	t _H =30 [%]	t _H =45 [%]	t _H =60 [%]	t _H =30 [%]	t _H =45 [%]	t _H =60 [%]
Asx	83.4	84.4	79.9	76.9	74.8	76.4
Glx	82.1	83.7	80.4	75.8	74.8	75.7
Ser	72.6	62.3	47.2	59.0	48.4	42.4
Gly	77.7	68.5	59.5	44.7	27.5	24.9
Thr	74.9	74.1	66.2	68.7	63.2	62.5
Ala	83.0	82.5	78.0	75.1	73.4	75.1
Tyr	-(¹)	83.1	76.9	-(¹)	75.1	74.4
Val	85.7	88.2	84.1	80.4	80.6	83.1
Phe	83.1	82.9	78.3	77.6	75.2	74.8
Ile	82.8	82.7	77.9	75.2	72.6	73.3
Leu	83.5	84.3	80.0	78.7	76.7	78.4

(1) - <NWG (OPA-HPLC-Methode) in der nichtaufgestockten Probe.

Tabelle 6.3: Aufstockungswiederfindungen (AW) von Aminosäuren aus BSA relativ zu AW(Alanin) in makromolekularer WSP(>5 kDa)-Matrix der PM2.5-Proben IWC05-33 und IWC05-34 (Standardadditionsexperiment **B**, Abschnitt 3.2.4.3). Histidin, Arginin und Lysin siehe (1).

AA	AW _{rel}					
	103 µg BSA			10 µg BSA		
	t _H =30 [%]	t _H =45 [%]	t _H =60 [%]	t _H =30 [%]	t _H =45 [%]	t _H =60 [%]
Asx	100.6	102.3	102.3	102.5	101.9	101.7
Glx	99.0	101.4	103.0	100.9	101.9	100.8
Ser	87.5	75.5	60.5	78.6	65.9	56.4
Gly	93.7	83.0	76.3	59.5	37.4	33.1
Thr	90.3	89.9	84.8	91.5	86.1	83.2
Ala	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Tyr	-(¹)	100.7	98.5	-(¹)	102.3	99.0
Val	103.3	106.9	107.8	107.1	109.7	110.6
Phe	100.2	100.5	100.3	103.3	102.5	99.6
Ile	99.8	100.2	99.8	100.1	98.9	97.5
Leu	100.7	102.2	102.5	104.7	104.5	104.3

(1) - <NWG (OPA-HPLC-Methode) in der nichtaufgestockten Probe.

Tabelle 6.4: Aminosäurestoffmengen der WSP(>5 kDa)-Fraktion des gemeinsamen Extraktes der PM2.5-Proben IWC05-33 und IWC05-34 (19.8 mg PM2.5, Standardadditionsexperiment **B**, Abschnitt 3.2.4.3). Histidin, Arginin und Lysin siehe (1).

AA	CAA _{WSP(>5 kDa)}		
	t _H = 30 [nmol]	t _H = 45 [nmol]	t _H = 60 [nmol]
Asx	9.5 ± 0.3	10.2 ± 0.0	11.6 ± 0.6
Glx	9.1 ± 0.7	9.9 ± 0.7	11.6 ± 1.1
Ser	3.7 ± 0.2	4.4 ± 0.4	6.9 ± 3.4
Gly	36.9 ± 1.8	40.8 ± 2.7	43.1 ± 3.2
Thr	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3	5.3 ± 1.0
Ala	8.2 ± 0.2	8.8 ± 0.1	10.3 ± 1.1
Tyr	-(¹)	0.8 ± 0.4	1.2 ± 0.2
Val	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.0	4.4 ± 0.1
Phe	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Ile	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.7 ± 0.2
Leu	3.5 ± 0.0	3.8 ± 0.3	4.8 ± 0.0

(1) - <NWG (OPA-HPLC-Methode).

6.2 HOHENPEISSENBERG (MOHP)

Tabelle 6.5: Atmosphärische PM_{2.5}- und WSP(>5 kDa)-Konzentrationen. Messkampagne: Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg, Probenahmejahr: 2003. Blindwert (PM_{2.5}): 0.48 ± 0.28 mg (0.0-1.0 mg, N = 27), Blindwert (WSP(>5 kDa)): 0.029 ± 0.018 mg (0.012-0.054 mg, N = 7), 15 Blindfilter <NWG. Die WSP(>5 kDa)-Konzentrationen wurden nach Extraktion gemäß EM1 in PBS-Azid-Puffer (1:10), Größenfraktionierung mit PBS-Puffer (1:10) mittels BCA-Assay als BSA-Äquivalentkonzentration bestimmt. Fortsetzung: Tabelle 6.6.

Bezeichnung	Zeitraum	PM _{2.5}		WSP _{BCA} (>5 kDa)		WSP _{BCA} (>5 kDa)/ PM _{2.5}
		[mg]	[µg/m ³]	[mg]	[µg/m ³]	[%]
MOHP03-05	16.03-19.03	49.5	25.9	1.76 ± 0.02	0.92 ± 0.01	3.6
MOHP03-06	19.03-22.03	55.4	29.4	1.48 ± 0.02	0.79 ± 0.01	2.7
MOHP03-07	22.03-25.03	41.8	22.3	1.73 ± 0.02	0.92 ± 0.01	4.1
MOHP03-08	25.03-28.03	51.0	27.6	2.75 ± 0.11	1.49 ± 0.06	5.4
MOHP03-09	28.03-31.03	25.7	13.8	1.53 ± 0.09	0.82 ± 0.05	6.0
MOHP03-10	31.03-03.04	24.5	13.0	0.59 ± 0.02	0.31 ± 0.01	2.4
MOHP03-11	03.04-06.04	21.7	11.3	0.90 ± 0.02	0.47 ± 0.01	4.2
MOHP03-12	06.04-09.04	16.3	8.5	1.06 ± 0.03	0.55 ± 0.01	6.5
MOHP03-13	09.04-12.04	41.0	21.7	2.12 ± 0.05	1.12 ± 0.02	5.2
MOHP03-14	12.04-15.04	21.7	11.5	2.24 ± 0.03	1.19 ± 0.02	10.3
MOHP03-15	15.04-19.04	42.4	17.0	2.97 ± 0.07	1.19 ± 0.03	7.0
MOHP03-16	19.04-23.04	23.1	9.2	2.44 ± 0.06	0.97 ± 0.02	10.5
MOHP03-17	23.04-27.04	30.9	12.4	1.52 ± 0.01	0.61 ± 0.01	4.9
MOHP03-18	27.04-01.05	19.0	7.6	0.39 ± 0.02	0.16 ± 0.01	2.0
MOHP03-19	01.05-05.05	15.2	6.1	0.40 ± 0.02	0.16 ± 0.01	2.6
MOHP03-20	05.05-09.05	81.5	33.2	-	-	-
MOHP03-21	09.05-13.05	14.7	5.8	-	-	-
MOHP03-22	13.05-18.05	20.2	6.1	-	-	-
MOHP03-23	18.05-23.05	9.5	3.0	0.45 ± 0.02	0.14 ± 0.01	4.7
MOHP03-24	23.05-28.05	26.4	8.5	1.00 ± 0.04	0.32 ± 0.01	3.8
MOHP03-25	28.05-02.06	29.9	9.6	1.19 ± 0.06	0.38 ± 0.02	4.0
MOHP03-26	02.06-07.06	37.4	12.1	1.78 ± 0.02	0.58 ± 0.01	4.8
MOHP03-27	07.06-12.06	34.5	11.2	1.54 ± 0.05	0.50 ± 0.02	4.5
MOHP03-28	12.06-17.06	30.6	9.9	1.31 ± 0.04	0.42 ± 0.01	4.3
MOHP03-29	17.06-22.06	33.2	10.7	-	-	-
MOHP03-30	22.06-27.06	39.8	12.9	-	-	-
MOHP03-31	27.06-02.07	29.4	9.5	-	-	-
MOHP03-32	02.07-07.07	17.6	5.6	-	-	-

Tabelle 6.6: Erläuterungen vgl. Tabelle 6.75.

Bezeichnung	Zeitraum	PM2.5		WSP(>5 kDa)		WSP(>5 kDa)/ PM2.5
		[mg]	[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	[mg]	[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	[%]
MOHP03-33	07.07-12.07	39.6	12.7	-	-	-
MOHP03-34	12.07-17.07	29.8	9.7	-	-	-
MOHP03-35	17.07-22.07	22.5	7.3	1.00 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01	4.4
MOHP03-36	22.07-27.07	24.4	7.9	0.98 \pm 0.01	0.32 \pm 0.00	4.0
MOHP03-37	27.07-01.08	21.1	7.0	0.91 \pm 0.04	0.30 \pm 0.01	4.3
MOHP03-38	01.08-06.08	42.3	13.7	1.35 \pm 0.03	0.44 \pm 0.01	3.2
MOHP03-39	06.08-11.08	56.9	18.5	2.15 \pm 0.03	0.70 \pm 0.01	3.8
MOHP03-40	11.08-16.08	44.9	14.5	1.79 \pm 0.14	0.58 \pm 0.04	4.0
MOHP03-41	16.08-21.08	30.2	9.7	0.99 \pm 0.03	0.32 \pm 0.01	3.3
MOHP03-42	21.08-26.08	31.9	10.3	1.23 \pm 0.03	0.40 \pm 0.01	3.9
MOHP03-43	26.08-29.08	21.2	10.8	0.71 \pm 0.03	0.36 \pm 0.01	3.3
MOHP03-44	04.11-05.11	3.1	6.1	0.11 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	3.6
MOHP03-45	05.11-10.11	38.2	12.0	1.36 \pm 0.04	0.43 \pm 0.01	3.5
MOHP03-46	10.11-15.11	-	-	-	-	-
MOHP03-47	15.11-20.11	11.9	3.8	0.57 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	4.8
MOHP03-48	20.11-25.11	15.0	4.8	0.40 \pm 0.01	0.13 \pm 0.00	2.7
MOHP03-49	25.11-30.11	22.8	7.2	0.96 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01	4.2
MOHP03-50	30.11-05.12	15.0	4.8	0.56 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	3.7
MOHP03-51	05.12-10.12	20.2	6.3	0.80 \pm 0.04	0.25 \pm 0.01	4.0
MOHP03-52	10.12-15.12	12.5	3.9	0.50 \pm 0.02	0.16 \pm 0.01	4.0
MOHP03-53	15.12-20.12	10.6	3.3	0.34 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	3.2
MOHP03-54	20.12-25.12	9.0	2.8	0.32 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	3.6
MOHP03-55	25.12-30.12	12.7	4.0	0.42 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	3.3
MOHP03-56	30.12-04.01	33.3	10.3	1.06 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01	3.2

Tabelle 6.7: Atmosphärische PM_{2.5}-Konzentrationen, Messkampagne: Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg, Probennahmejahr: 2004. Blindwert: 0.45 ± 0.30 mg (-0.1-1.0 mg, N = 32).

Bezeichnung	Zeitraum	PM _{2.5}		Bezeichnung	Zeitraum	PM _{2.5}	
		[mg]	[µg/m ³]			[mg]	[µg/m ³]
MOHP04-01	04.01-09.01	11.1	3.5	MOHP04-32	17.06-22.06	15.9	5.1
MOHP04-02	09.01-14.01	5.8	1.8	MOHP04-34	02.07-07.07	16.9	5.4
MOHP04-03	14.01-19.01	7.4	2.3	MOHP04-35	07.07-12.07	14.7	4.7
MOHP04-04	19.01-24.01	20.9	6.5	MOHP04-36	12.07-17.07	15.9	5.1
MOHP04-05	24.01-29.01	19.6	6.1	MOHP04-37	17.07-22.07	31.8	10.2
MOHP04-06	29.01-03.02	8.2	2.6	MOHP04-38	22.07-27.07	30.4	9.7
MOHP04-06A	03.02-08.02	17.6	5.5	MOHP04-39	27.07-01.08	48.6	15.6
MOHP04-07	08.02-13.02	20.1	6.2	MOHP04-39A	01.08-06.08	55.7	18.0
MOHP04-08	13.02-18.02	51.1	15.9	MOHP04-40	06.08-11.08	11.4	3.7
MOHP04-09	18.02-23.02	39.1	12.3	MOHP04-41	11.08-16.08	15.5	5.0
MOHP04-10	23.02-28.02	39.2	12.2	MOHP04-42	16.08-21.08	15.1	5.0
MOHP04-11	28.02-04.03	62.1	19.2	MOHP04-43	21.08-26.08	12.3	3.9
MOHP04-12	04.03-09.03	66.2	20.6	MOHP04-44	26.08-31.08	13.2	4.2
MOHP04-13	09.03-14.03	96.5	30.3	MOHP04-45	31.08-05.09	30.1	9.6
MOHP04-14	14.03-19.03	24.1	7.6	MOHP04-46	05.09-10.09	38.6	12.3
MOHP04-15	19.03-24.03	20.5	6.5	MOHP04-47	10.09-15.09	25.1	8.0
MOHP04-16	24.03-29.03	39.0	12.2	MOHP04-48	15.09-20.09	22.7	7.2
MOHP04-17	29.03-03.04	56.0	17.9	MOHP04-49	20.09-25.09	13.7	4.3
MOHP04-18	03.04-08.04	14.4	4.5	MOHP04-50	25.09-30.09	11.6	3.6
MOHP04-19	08.04-13.04	32.2	10.1	MOHP04-51	30.09-05.10	21.5	6.8
MOHP04-20	13.04-18.04	45.6	14.4	MOHP04-52	05.10-10.10	26.0	8.3
MOHP04-21	18.04-23.04	16.1	5.1	MOHP04-52A	10.10-15.10	16.6	5.3
MOHP04-22	23.04-28.04	33.9	10.7	MOHP04-53	15.10-20.10	6.6	2.1
MOHP04-23	28.04-03.05	21.3	6.8	MOHP04-54	20.10-25.10	13.8	4.4
MOHP04-24	03.05-08.05	11.6	3.7	MOHP04-55	25.10-30.10	14.4	4.6
MOHP04-25	08.05-13.05	16.3	5.1	MOHP04-56	30.10-4.11	12.9	4.1
MOHP04-26	13.05-18.05	25.0	7.9	MOHP04-57	4.11-09.11	23.3	7.3
MOHP04-27	18.05-23.05	34.1	10.4	MOHP04-58	9.11-14.11	28.2	8.8
MOHP04-27A	23.05-28.05	33.1	6.7	MOHP04-59	14.11-19.11	24.7	7.7
MOHP04-28	28.05-02.06	21.1	7.1	MOHP04-60	19.11-24.11	14.1	4.4
MOHP04-29	02.06-07.06	22.5	7.2	MOHP04-61	24.11-29.11	23.6	7.4
MOHP04-30	07.06-12.06	22.5	6.4	MOHP04-62	29.11-04.12	18.9	5.9
MOHP04-31	12.06-17.06	16.4	5.1	MOHP04-63	04.12-09.12	24.5	7.6

Tabelle 6.8: $CAA_{WSP(>5\text{ kDa})/Filter}$ von sechs Blindfiltern (MOHP 2004). Nachweis(NWG)- und Bestimmungsgrenzen (BG) wurden gemäß Blindwertmethode ermittelt (Abschnitt 3.2.5).

AA	MOHP04						Mittelwert [nmol]	NWG (3s) [nmol]	BG (10s) [nmol]
	-B01 [nmol]	-B04 [nmol]	-B05 [nmol]	-B11 [nmol]	-B13 [nmol]	-B22 [nmol]			
Asx	1.9	3.4	2.9	3.8	3.4	1.2 ⁽¹⁾	2.8 ± 1.0	5.8	12.7
Glx	3.1	6.9	5.4	8.7	7.5	1.2	5.5 ± 2.8	13.9	33.7
Ser	7.2 ⁽¹⁾	7.2 ⁽¹⁾	7.5 ⁽¹⁾	7.1 ⁽¹⁾	7.3 ⁽¹⁾	6.9 ⁽¹⁾	7.2 ± 0.2	7.8	9.3
His	0.6 ⁽¹⁾	0.6 ⁽¹⁾	0.7 ⁽¹⁾	0.6 ⁽¹⁾	0.7 ⁽¹⁾	0.6 ⁽¹⁾	0.6 ± 0.0	0.7	0.8
Gly	2.4	7.2	3.3	4.7	7.0	2.1	4.4 ± 2.3	11.2	27.0
Thr	1.4 ⁽¹⁾	1.5 ⁽¹⁾	1.4 ⁽¹⁾	1.4 ⁽¹⁾	1.5 ⁽¹⁾	1.4 ⁽¹⁾	1.5 ± 0.0	1.6	1.9
Arg	0.6 ⁽¹⁾	1.2	0.9	0.9	1.2	0.6 ⁽¹⁾	0.9 ± 0.2	1.6	3.3
Ala	1.5	4.1	2.1	2.8	2.0	0.9 ⁽¹⁾	2.3 ± 1.1	5.6	13.5
Tyr	0.3 ⁽¹⁾	0.3 ± 0.0	0.4	0.4					
Val	0.6	1.5	0.9	1.9	1.0	0.5 ⁽¹⁾	1.1 ± 0.5	2.7	6.4
Phe	0.4 ⁽¹⁾	0.5	0.6	0.7	0.8	0.4 ⁽¹⁾	0.6 ± 0.2	1.1	2.3
Ile	0.5	1.1	0.8	1.7	1.2	0.4 ⁽¹⁾	1.0 ± 0.5	2.4	5.8
Leu	1.0	1.8	1.7	2.5	2.5	0.5 ⁽¹⁾	1.7 ± 0.8	4.0	9.5
Lys	0.6 ⁽¹⁾	2.0	0.7	1.8	1.3	0.6 ⁽¹⁾	1.2 ± 0.6	3.1	7.4

(1) - angegeben ist die auf den Filter hochgerechnete NWG (OPA-HPLC-Methode).

Tabelle 6.9: $CAA_{WSP(>5\text{ kDa})}$ von atmosphärischen PM_{2.5}-Proben (MOHP 2004). Fettgedruckte Aminosäuren <NWG gemäß Tabelle 6.8. Fortsetzung: Tabelle 6.10.

AA	$CAA_{WSP(>5\text{ kDa})/Filter}$						
	MOHP-01 [nmol]	MOHP-07 [nmol]	MOHP-14 [nmol]	MOHP-19 [nmol]	MOHP-26 [nmol]	MOHP-34 [nmol]	MOHP-64 [nmol]
Asx	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.2	12.4	8.3 ± 0.1	9.0	7.2	4.2
Glx	4.3 ± 0.1	5.0 ± 0.0	12.1	7.1 ± 0.1	8.9	6.5	7.1
Ser	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎
His	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎
Gly	13.9 ± 0.2	15.4 ± 0.1	44.3	48.4 ± 2.3	95.9	28.1	26.6
Thr	₍₁₎	₍₁₎	3.4	3.0 ± 0.6	2.8	2.3	1.5
Arg	₍₁₎	₍₁₎	0.8	₍₁₎	1.0	0.6	0.7
Ala	2.5 ± 0.3	3.1 ± 0.3	10.2	7.5 ± 0.2	6.2	5.9	5.9
Tyr	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	₍₁₎	0.5	₍₁₎	₍₁₎
Val	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	2.4	1.5 ± 0.2	1.5	1.8	2.2
Phe	₍₁₎	₍₁₎	0.8	₍₁₎	0.7	0.4	0.4
Ile	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.6	0.8 ± 0.0	1.1	1.5	1.2
Leu	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	2.8	1.6 ± 0.2	2.2	1.7	2.1
Lys	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.1	2.0	1.7 ± 0.1	1.9	1.8	1.8

(1) - <NWG (OPA-HPLC-Methode).

Tabelle 6.12: Aminosäurezusammensetzung verschiedener Proteine. Erläuterungen vgl. Abbildung 3.66.

AA	Stoffmengenanteil					
	WSP(>5 kDa) [mol%]	PGRS36 [mol%]	GRP2 [mol%]	GRP1 [mol%]	BSA [mol%]	Betv1 [mol%]
Asx	11.1 ± 1.1	9.4	9.5	7.8	9.3	11.3
Glx	9.1 ± 1.7	3.1	8.9	7.2	13.6	10.0
Ser	4.7 ± 1.1	6.3	4.2	7.8	4.8	6.9
His	0.4 ± 0.2	0.8	0.0	0.0	2.9	2.5
Gly	39.7 ± 6.2	39.3	38.7	39.2	2.7	8.8
Thr	4.1 ± 0.6	3.1	3.6	3.0	5.8	5.6
Arg	1.2 ± 1.1	2.0	7.1	7.8	3.9	1.9
Ala	8.5 ± 1.2	13.8	5.4	4.2	7.9	6.9
Tyr	0.3 ± 0.2	1.0	6.0	5.4	3.4	4.4
Val	2.2 ± 0.7	4.1	3.6	3.0	6.2	7.5
Phe	0.6 ± 0.2	2.2	3.6	3.0	4.6	5.0
Ile	1.4 ± 0.4	2.4	2.4	2.4	2.4	8.1
Leu	2.2 ± 0.5	6.7	2.4	2.4	10.5	5.6
Lys	2.5 ± 1.4	0.2	1.2	2.4	10.1	9.4
Trp, Pro, Cys, Met	11.8	5.5	3.6	4.2	11.8	6.3

6.3 MÜNCHEN-GROSSHADERN (IWC)

Tabelle 6.13: Atmosphärische PM_{2.5}-Konzentrationen, Messkampagne: Insitut für Wasserchemie und chemische Balneologie München-Großhadern (IWC), Probennahmejahr: 2005. Blindwert: 0.76 ± 0.34 mg (0.4-1.9 mg, N = 25).

Bezeichnung	Zeitraum	PM _{2.5}		Bezeichnung	Zeitraum	PM _{2.5}	
		[mg]	[µg/m ³]			[mg]	[µg/m ³]
IWC05-01	23.12-28.12	21.0	6.5	IWC05-33	09.05-13.05	17.7	6.8
IWC05-02	28.12-02.01	21.7	6.6	IWC05-34	13.05-17.05	21.5	8.3
IWC05-03	02.01-07.01	13.0	3.9	IWC05-35	17.05-21.05	26.0	10.0
IWC05-04	07.01-12.01	24.5	7.5	IWC05-36	21.05-25.05	15.9	6.2
IWC05-05	12.01-17.01	50.2	15.3	IWC05-37	25.05-29.05	26.8	10.5
IWC05-06	17.01-22.01	16.1	4.9	IWC05-38	29.05-03.06	36.1	11.3
IWC05-07	22.01-27.01	45.4	13.8	IWC05-39	03.06-08.06	20.5	6.3
IWC05-08	27.01-01.02	74.1	22.4	IWC05-40	08.06-13.06	28.0	8.7
IWC05-09	01.02-06.02	50.8	15.4	IWC05-41	13.06-18.06	30.1	9.4
IWC05-10	06.02-10.02	87.6	33.8	IWC05-42	18.06-23.06	35.7	11.2
IWC05-11	10.02-14.02	10.3	4.0	IWC05-43	23.06-28.06	46.1	14.6
IWC05-12	14.02-18.02	41.4	15.8	IWC05-44	28.06-03.07	25.0	7.8
IWC05-13	18.02-22.02	61.5	23.5	IWC05-45	03.07-08.07	14.7	4.6
IWC05-14	22.02-26.02	124.8	48.2	IWC05-46	08.07-13.07	24.2	7.5
IWC05-15	26.02-02.03	62.1	23.4	IWC05-47	13.07-23.07	67.0	10.6
IWC05-16	02.03-06.03	113.6	44.4	IWC05-48	23.07-02.08	60.2	9.5
IWC05-17	06.03-10.03	56.7	21.5	IWC05-49	02.08-12.08	44.7	7.0
IWC05-18	10.03-14.03	31.1	11.9	IWC05-50	12.08-22.08	65.7	10.2
IWC05-19	14.03-18.03	28.9	11.2	IWC05-51	22.08-01.09	68.7	10.7
IWC05-20	18.03-22.03	34.5	13.3				
IWC05-21	22.03-26.03	64.9	25.1				
IWC05-22	26.03-30.03	40.4	15.7				
IWC05-23	30.03-03.04	64.9	24.9				
IWC05-24	03.04-07.04	42.7	16.5				
IWC05-25	07.04-11.04	25.8	9.9				
IWC05-26	11.04-15.04	59.9	23.2				
IWC05-27	15.04-19.04	24.1	9.4				
IWC05-28	19.04-23.04	22.8	8.8				
IWC05-29	23.04-27.04	17.3	6.7				
IWC05-30	27.04-01.05	18.1	7.0				
IWC05-31	01.05-05.05	22.1	8.7				
IWC05-32	05.05-09.05	13.5	5.2				

Tabelle 6.14: Gesamtaminosäuregehalt der TP-Fraktion (TAA_{TP}) von Blindfilter- und PM2.5-Proben (IWC 2005).

AA	TAA_{TP}					
	IWC05-B19 [nmol]	IWC05-B21 [nmol]	IWC05-B25 [nmol]	IWC05-37 [nmol]	IWC05-40 [nmol]	IWC05-43 [nmol]
Asx	17.2 ± 0.2	15.6 ± 0.0	42.2 ± 2.2	133.7 ± 2.5	92.5 ± 10.0	176.1 ± 3.3
Glx	31.3 ± 0.1	26.7 ± 0.3	77.0 ± 2.7	160.6 ± 1.7	101.5 ± 3.7	169.5 ± 1.9
Ser	29.4 ± 0.5	15.9 ± 1.1	34.4 ± 1.3	67.1 ± 13.0	83.0 ± 30.5	40.0 ± 5.1
His	3.6 ± 0.3	2.5 ± 0.0	6.6 ± 0.6	21.2 ± 0.8	-(¹)	18.7 ± 0.3
Gly	63.5 ± 1.4	51.9 ± 0.8	76.4	442.7 ± 25.9	502.3 ± 14.9	780.0 ± 2.2
Thr	7.9 ± 0.4	5.5 ± 0.0	17.4 ± 0.6	51.5 ± 3.4	43.9 ± 6.5	44.2 ± 0.5
Arg	10.1 ± 0.1	10.3 ± 0.3	37.1 ± 1.5	43.6 ± 1.1	29.5 ± 0.6	39.0 ± 0.5
Ala	15.2 ± 0.1	16.1 ± 0.6	41.1 ± 1.9	163.9 ± 8.4	128.1 ± 13.8	186.4 ± 0.1
Tyr	3.7 ± 0.2	4.1 ± 0.2	10.1 ± 0.7	-(²)	-(²)	-(²)
Val	13.5 ± 0.5	14.6 ± 0.3	39.8 ± 2.8	72.5 ± 5.2	45.0 ± 1.1	71.3 ± 5.8
Phe	3.7 ± 0.1	4.2 ± 0.0	11.2 ± 0.5	26.9 ± 0.3	16.9 ± 0.5	28.3 ± 0.7
Ile	7.7 ± 0.1	10.0 ± 0.1	18.1 ± 0.6	45.3 ± 1.3	43.6 ± 2.0	49.1 ± 0.5
Leu	11.3 ± 0.5	11.5 ± 0.1	35.4 ± 0.9	75.7 ± 0.7	41.1 ± 3.8	76.2 ± 5.0
Lys	9.4 ± 1.2	9.5 ± 0.8	13.1 ± 0.1	124.1 ± 3.3	98.8 ± 11.3	129.2 ± 7.5

(1) - <NWG (OPA-HPLC-Methode); (2) - nicht quantifizierbar - Coelution.

Tabelle 6.15: Aminosäuregehalt von Methoden-, Extraktions-, SEC- und Hydrolyseblindproben.

AA	TAA_{TP}	TAA_{TP}	TAA_{WSP}	$CAA_{WSP(>5\text{ kDa})}$	$CAA_{WSP(>5\text{ kDa})}$	$CAA_{WSP(>5\text{ kDa})}$
	Methode [nmol]	Extraktion [nmol]	Extraktion [nmol]	Extraktion [nmol]	SEC [nmol]	Hydrolyse [nmol]
Asx	8.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.0	0.7
Glx	14.1 ± 0.2	0.9 ± 0.0	10.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	2.2 ± 0.0	1.1
Ser	11.9 ± 0.3	4.2 ± 0.3	2.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.7
His	1.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1
Gly	30.7 ± 0.2	7.3 ± 0.3	15.1 ± 0.2	2.6 ± 0.1	3.8 ± 0.2	1.6
Thr	3.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.3
Arg	5.0 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.3
Ala	6.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	4.4 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.0	0.5
Tyr	1.9 ± 0.1	-(¹)	1.6 ± 0.1	-(¹)	0.3 ± 0.0	0.1
Val	7.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0	3.2 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.4
Phe	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2
Ile	3.3 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.2
Leu	5.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.8 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5
Lys	3.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	4.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5

(1) - nicht quantifizierbar - Coelution.

Tabelle 6.16: Freier (FAA), gebundener (CAA) und gesamter Aminosäuregehalt (TAA) der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktionen des Blindfilters IWC05-B25.

AA	IWC05-B25					
	TAA _{TP} [nmol]	CAA _{TP} [nmol]	TAA _{WSP} [nmol]	FAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP(>5 kDa)} [nmol]
Asx	42.2 ± 2.2	13.1 ± 2.2	44.6 ± 0.3	29.1 ± 0.3	15.5 ± 0.5	6.0 ± 0.1
Glx	77.0 ± 2.7	70.3 ± 2.7	111.7 ± 0.6	6.7 ± 0.3	105.0 ± 0.7	13.3 ± 0.2
Ser	34.4 ± 1.3	-83.8 ± 1.8	42.7 ± 0.5	118.2 ± 1.2	-75.5 ± 1.3	7.4 ± 0.3
His	6.6 ± 0.6	1.6 ± 0.7	12.3 ± 0.3	5.0 ± 0.4	7.3 ± 0.5	1.2 ± 0.1
Gly	76.4	17.7 ± 0.3	104.8 ± 2.0	58.8 ± 0.3	46.0 ± 2.0	10.9 ± 0.2
Thr	17.4 ± 0.6	-7.2 ± 0.8	16.8 ± 0.0	24.5 ± 0.5	-7.8 ± 0.5	3.7 ± 0.1
Arg	37.1 ± 1.5	35.6 ± 1.5	4.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.2	0.9 ± 0.0
Ala	41.1 ± 1.9	2.1 ± 1.9	49.5 ± 0.5	39.1 ± 0.1	10.5 ± 0.5	4.1 ± 0.1
Tyr	10.1 ± 0.7	4.6 ± 0.7	6.0 ± 0.0	5.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	-(¹)
Val	39.8 ± 2.8	28.4 ± 2.9	17.1 ± 0.4	11.4 ± 0.4	5.7 ± 0.5	2.1 ± 0.0
Phe	11.2 ± 0.5	6.8 ± 0.5	4.1 ± 0.0	4.4 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.0
Ile	18.1 ± 0.6	11.4 ± 0.7	8.0 ± 0.1	6.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.0
Leu	35.4 ± 0.9	27.3 ± 1.0	10.4 ± 0.0	8.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.4 ± 0.0
Lys	13.1 ± 0.1	9.0 ± 0.9	18.4 ± 0.6	4.1 ± 0.9	14.3 ± 1.0	2.6 ± 0.1

(1) - nicht quantifizierbar - Coelution.

Tabelle 6.17: Freier (FAA), gebundener (CAA) und gesamter Aminosäuregehalt (TAA) der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktionen der PM2.5-Probe IWC05-48.

AA	IWC05-48					
	TAA _{TP} [nmol]	CAA _{TP} [nmol]	TAA _{WSP} [nmol]	FAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP(>5 kDa)} [nmol]
Asx	326.2 ± 6.9	280.8 ± 7.0	147.4 ± 3.3	45.4 ± 1.4	102.0 ± 3.5	28.7 ± 0.4
Glx	331.4 ± 2.5	307.6 ± 2.6	159.2 ± 1.1	23.8 ± 0.7	135.4 ± 1.3	22.7 ± 0.2
Ser	105.1 ± 11.9	15.4 ± 11.9	96.5 ± 9.2	89.6 ± 0.0	6.8 ± 9.2	17.4 ± 0.1
His	44.2 ± 1.2	39.9 ± 1.3	9.3 ± 0.3	4.2 ± 0.6	5.0 ± 0.6	1.9 ± 0.1
Gly	1023.9 ± 21.8	819.4 ± 26.8	822.1 ± 12.6	204.5 ± 15.5	617.6 ± 20.0	104.4 ± 1.5
Thr	100.6 ± 4.1	90.6 ± 4.2	33.3 ± 0.3	10.0 ± 0.7	23.4 ± 0.8	12.3 ± 0.2
Arg	94.4 ± 5.9	78.6 ± 6.0	17.4 ± 0.8	15.9 ± 0.9	1.52 ± 1.2	3.0 ± 0.0
Ala	358.9 ± 4.1	222.7 ± 4.6	190.9 ± 1.8	136.1 ± 1.9	54.8 ± 2.6	26.1 ± 0.3
Tyr	40.2 ± 1.3	-(²)	-(¹)	-(¹)	-(²)	-(¹)
Val	158.5 ± 6.6	152.8 ± 6.6	30.0 ± 0.3	5.7 ± 0.4	24.3 ± 0.5	8.7 ± 0.2
Phe	66.0 ± 0.2	63.6 ± 0.2	11.6 ± 0.6	2.4 ± 0.0	9.2 ± 0.6	2.1 ± 0.0
Ile	106.1 ± 0.4	101.9 ± 0.5	19.6 ± 0.5	4.3 ± 0.3	15.3 ± 0.6	4.9 ± 0.1
Leu	180.2 ± 1.3	162.6 ± 1.3	40.0 ± 1.9	17.6 ± 0.2	22.3 ± 1.9	9.1 ± 0.0
Lys	202.2 ± 4.2	151.1 ± 4.2	61.1 ± 1.2	51.1 ± 0.7	10.0 ± 1.4	16.1 ± 0.2

(1) - nicht quantifizierbar - Coelution; (2) - siehe FAA_{WSP}.

Tabelle 6.18: Freier (FAA), gebundener (CAA) und gesamter Aminosäuregehalt (TAA) der TP-, WSP- und WSP(>5 kDa)-Fraktionen der PM2.5-Probe IWC05-50.

AA	IWC05-50					
	TAA _{TP} [nmol]	CAA _{TP} [nmol]	TAA _{WSP} [nmol]	FAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP(>5 kDa)} [nmol]
Asx	-	-	134.8 ± 4.2	33.0 ± 0.3	101.8 ± 4.2	29.4 ± 0.2
Glx	-	-	130.1 ± 0.8	15.0 ± 0.0	115.1 ± 0.8	23.6 ± 0.4
Ser	-	-	100.8 ± 16.7	28.7 ± 0.2	72.1 ± 16.7	11.4 ± 1.1
His	-	-	8.2 ± 0.2	3.1 ± 0.0	5.1 ± 0.2	2.5 ± 0.0
Gly	-	-	755.1 ± 39.5	167.8 ± 0.0	587.3 ± 39.5	120.1 ± 0.8
Thr	-	-	33.5 ± 2.0	5.1 ± 0.0	28.4 ± 2.0	11.7 ± 0.1
Arg	-	-	12.2 ± 0.0	10.6 ± 1.8	1.5 ± 1.8	3.6 ± 0.0
Ala	-	-	204.4 ± 2.5	100.0 ± 1.3	104.4 ± 2.8	29.0 ± 0.2
Tyr	-	-	39.5 ± 0.3	_(2)	_(2)	_(2)
Val	-	-	24.1 ± 0.1	_(2)	_(1)	8.4 ± 0.1
Phe	-	-	9.6 ± 0.1	_(1)	_(1)	1.8 ± 0.1
Ile	-	-	17.6 ± 0.2	_(2)	_(1)	5.2 ± 0.0
Leu	-	-	32.5 ± 0.5	10.2 ± 0.1	22.3 ± 0.5	8.6 ± 0.1
Lys	-	-	56.0 ± 4.0	43.6 ± 1.6	12.4 ± 4.3	20.2 ± 0.4

(1) - <NWG (OPA-HPLC-Methode); (2) - nicht quantifizierbar - Coelution; (3) - siehe FAA_{WSP}.

Tabelle 6.19: Freier (FAA), gebundener (CAA) und gesamter Aminosäuregehalt (TAA) der TP-, WSP- und WSP(>5k Da)-Fraktionen der PM2.5-Probe IWC05-51.

AA	IWC05-51					
	TAA _{TP} [nmol]	CAA _{TP} [nmol]	TAA _{WSP} [nmol]	FAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP} [nmol]	CAA _{WSP(>5 kDa)} [nmol]
Asx	323.2 ± 0.8	280.7 ± 1.3	138.4 ± 7.7	42.6 ± 1.0	95.8 ± 7.7	23.8 ± 0.9
Glx	359.5 ± 2.0	344.0 ± 2.1	153.7 ± 4.9	15.5 ± 0.4	138.2 ± 4.9	20.2 ± 0.1
Ser	96.4 ± 0.5	13.2 ± 3.0	100.2 ± 9.5	83.1 ± 3.0	17.1 ± 9.9	10.1 ± 0.4
His	45.7 ± 0.9	44.1 ± 1.0	5.6 ± 0.0	1.5 ± 0.3	4.1 ± 0.3	1.5 ± 0.0
Gly	1156.8 ± 30.8	1077.7 ± 31.5	810.8 ± 14.6	79.1 ± 6.3	731.7 ± 15.9	111.3 ± 12.5
Thr	106.6 ± 1.3	99.9 ± 1.3	34.0 ± 0.4	6.7 ± 0.2	27.3 ± 0.5	8.8 ± 0.1
Arg	94.0 ± 1.0	84.8 ± 1.2	9.0 ± 0.0	9.2 ± 0.6	-0.2 ± 0.6	2.1 ± 0.0
Ala	372.4 ± 1.9	275.5 ± 1.9	199.5 ± 9.6	96.9 ± 0.5	102.6 ± 9.6	25.2 ± 0.0
Tyr	57.0 ± 0.7	_(2)	_(2)	_(1)	_(2)	_(1)
Val	178.0 ± 16.0	174.7 ± 16.0	29.3 ± 0.5	3.4 ± 0.3	25.9 ± 0.6	7.0 ± 0.3
Phe	80.5 ± 1.9	_(2)	11.8 ± 0.3	_(1)	_(2)	1.4 ± 0.0
Ile	113.9 ± 1.3	_(2)	20.1 ± 0.1	_(1)	_(2)	3.6 ± 0.1
Leu	204.6 ± 9.2	182.6 ± 9.2	45.8 ± 1.2	22.0 ± 0.5	23.9 ± 1.3	8.4 ± 0.1
Lys	231.8 ± 3.2	165.7 ± 3.2	73.0 ± 4.4	66.1 ± 0.0	7.0 ± 4.4	22.1 ± 1.1

(1) - nicht quantifizierbar - Coelution; (2) - keine Berechnung möglich, da Coelution bei FAA_{WSP}-Bestimmung.

Tabelle 6.20: Aminosäurezusammensetzung von atmosphärischen PM_{2.5}-Proben (Abschnitt 3.2.6.4).

AA	Stoffmengenanteil					
	IWC05-48		IWC05-50		IWC05-51	
	WSP [mol%]	WSP(>5 kDa) [mol%]	WSP [mol%]	WSP(>5 kDa) [mol%]	WSP [mol%]	WSP(>5 kDa) [mol%]
Asx	8.1	9.4	6.5	8.7	6.1	7.9
Glx	10.2	7.5	7.0	6.6	8.3	6.3
Ser	0.8	5.7	6.9	5.1	1.6	5.1
His	0.4	0.6	0.3	0.7	0.3	0.5
Gly	52.3	34.3	39.9	37.8	49.4	39.3
Thr	2.1	4.1	2.1	3.9	2.0	3.3
Arg	0.1	1.0	0.1	1.0	-0.0	0.6
Ala	4.4	8.6	6.7	8.6	6.5	8.4
Tyr	_(4)	_(4)	_(5)	_(5)	_(6)	_(6)
Val	1.9	2.9	-	2.5	1.7	2.4
Phe	0.8	0.7	-	0.5	-	0.5
Ile	1.2	1.6	-	1.5	-	1.2
Leu	1.8	3.0	1.4	2.5	1.5	2.8
Lys	0.7	5.3	0.7	5.3	0.4	6.6
(1)	15.3	15.3	-	15.3	-	15.3
(2)	-	-	-	-	22.2	-
(3)	-	-	28.5	-	-	-

(1) - Tyr, Trp, Pro, Cys, Met; (2) - Tyr, Phe, Ile, Trp, Pro, Cys, Met; (3) - Tyr, Val, Phe, Ile, Trp, Pro, Cys, Met;
(4) - siehe FAA_{WSP} und CAA_{WSP(>5 kDa)} in *Tabelle 6.17*; (5) - siehe FAA_{WSP} und CAA_{WSP(>5 kDa)} in *Tabelle 6.18*;
(6) - siehe FAA_{WSP} und CAA_{WSP(>5 kDa)} in *Tabelle 6.19*.

6.4 ZUGSPITZE (SCAVEX)

Tabelle 6.21: Atmosphärische PM_{2.5}-Konzentrationen, Messkampagne: Schneefernerhaus Zugspitze, Probenahmejahr: 2003. Blindwerte: 0.11 ± 0.77 mg (-0.5-1.4 mg, N = 5), 1 Ausreißer: 5.3 mg.

Bezeichnung	Zeitraum	PM _{2.5}	
		[mg]	[$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
SCAVEX03-01	09.09 - 13.09	4,5	2,0
SCAVEX03-02	13.09 - 17.09	4,4	2,0
SCAVEX03-03	17.09 - 21.09	13,0	5,8
SCAVEX03-04	21.09 - 25.09	14,7	6,5
SCAVEX03-05	25.09 - 29.09	10,8	4,8
SCAVEX03-06	29.09 - 03.10	7,3	3,2
SCAVEX03-07	03.10 - 06.10	0,9	0,6

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Aminosäure(n)
ACN	Acetonitril
AF	Aufstockungsfaktor
API	<i>atmospheric chemical ionization</i>
AW	Aufstockungswiederfindung
b	Ordinatenabschnitt
BG	Bestimmungsgrenze
CA	<i>compositional agreement</i>
CAA	<i>combined amino acids</i> (proteingebundene Aminosäuren)
d	Durchmesser
DABS-Cl	4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonyl-chlorid
EC	<i>elemental carbon</i> (elementarer Kohlenstoff)
EIA	Enzymimmunoassay
ESI	<i>electrospray ionization</i>
EtOH	Ethanol
FMOC-Cl	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid
F_{ver}	derivatisierungsbezogener Verdünnungsfaktor
HOAc	Essigsäure
HM	Hydrolysemethode
HSA	Humanserumalbumin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HULIS	<i>humic-like substances</i> (huminstoffähnliche Substanzen)
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IC	Ionenchromatographie
ISTD	Interner Standard
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

LC	Flüssigchromatographie
m	Steigung der Kalibriergeraden
mAk	monoklonaler Antikörper
M	mol/l
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MeOH	Methanol
MOHP	Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektrometrie
M_{t,25}	25 % getrimmtes Mittel
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Anzahl Kalibrierlösungen bzw. Datenpunkte
N'	Anzahl Parallelmessungen je Kalibrierlösung
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NBD-F	4-Fluoro-7-nitro-benzoxadiazol
N_H	Anzahl von Protonen als Ladungsträger
NTP	Normalbedingungen (p = 1013,25 hPa, T = 0 °C)
NWG	Nachweisgrenze
OC	<i>organic carbon</i> (organischer Kohlenstoff)
OPA	o-Phthaldialdehyd
OVA	Ovalbumin
pAk	polyklonaler Antikörper
PBAP	primäre biologische Aerosolpartikel
PEEK	Polyetherethylketon
p_H	Hydrolisedruck
PITC	Phenylisothiocyanat
PM	<i>particulate matter</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RG	XP1500 Reaktionsgefäß
RefG	XP-1500 Referenzreaktionsgefäß
RH	Relative Feuchte
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
SEC	Größenausschlusschromatographie

SDS	Natriumdodecylsulfat
TAA	<i>total amino acids</i> (Gesamtaminosäuren)
TC	<i>total carbon</i> (Gesamtkohlenstoff)
t_H	Hydrolysezeit
T_H	Hydrolysetemperatur
TNM	Tetranitromethan
TP	<i>total protein</i> (Gesamtprotein)
Trp.	Tropfen
TSP	<i>total suspended particles</i>
V_{inj}	Injektionsvolumen
V_n	Probenahmenvolumen
w_{1/2}	Peakbreite auf halber Peakhöhe
WSP	wasserlösliches Protein

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. Lahl, W. Steven. Feinstaub - eine gesundheitspolitische Herausforderung. *Pneumologie* **2005**, *59*, 704-714.
- [2] N Künzli, R. Kaiser, S. Medina, M. Studnicka, O. Chanel, P. Filliger, M. Herry, F. Horak Jr, V. Puybonnieux-Textier, P. Quénel, J. Schneider, R. Seethaler, J. C. Vergnaud, H. Sommer. Public-Health Impact of Outdoor and Traffic-Related Air Pollution: A European Assessment. *Lancet* **2000**, *356*, 795-801.
- [3] B. Brunekreef, S. T. Holgate. Air Pollution and Health. *Lancet* **2002**, *360*, 1233-1244.
- [4] R. Görgen, G. Jain, T. P. Knobloch, O. Schall. *Feinstaub - Magazin des Bundesumweltministeriums*, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Berlin, **2004**.
- [5] E. Hermann-Kunz. Allergische Krankheiten in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **2000**, *43*, 400-406.
- [6] G. D'Amato, G. Liccardi, M. D'Amato, M. Cazzola. Outdoor Air Pollution, Climatic Changes and Allergic Bronchial Asthma. *Eur. Respir. J.* **2002**, *20*, 763-776.
- [7] G. D'Amato. Urban Air Pollution and Plant-Derived Respiratory Allergy. *Clin. & Exp. Allergy* **2000**, *30*, 628-636.
- [8] J. Ring, U. Krämer, T. Schäfer, H. Behrendt. Why are Allergies Increasing? *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 701-709.
- [9] U. Wahn. What Drives the Allergic March? *Allergy* **2000**, *55*, 591-599.
- [10] T. Franze. Analyse und Reaktivität von Proteinen in atmosphärischen Aerosolen und Entwicklung neuer Immunoassays zur Messung von Nitroproteinen. *Dissertation*, Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik, Technische Universität München, **2004**.
- [11] T. Franze, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Enzyme Immunoassay for the Investigation of Protein Nitration by Air Pollutants. *Analyst* **2003**, *128*, 824-831.
- [12] T. Franze, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Comparison of Nitrotyrosine Antibodies and Development of Immunoassays for the Detection of Nitrated Proteins. *Analyst* **2004**, *129*, 589-596.

- [13] T. Franze, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Protein Nitration by Polluted Air. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1673-1678.
- [14] M. K. Owen, D. S. Ensor, L. E. Sparks. Airborne Particle Sizes and Sources Found in Indoor Air. *Atmos. Environ.* **1992**, *26A*, 2149-2162.
- [15] F. Raes, R. Van Dingenen, E. Vignati, J. Wilson, J. P. Putaud, J. H. Seinfeld, P. Adams. Formation and Cycling of Aerosols in the Global Troposphere. *Atmos. Environ.* **2000**, *34*, 4215-4240.
- [16] W. Schrader. Atmosphäre - ein chemischer Reaktor: Bildungsmechanismus sekundärer organischer Aerosole. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1468-1470.
- [17] C. Bliefert. *Umweltchemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2002**.
- [18] A. Gelencsér. *Carbonaceous Aerosol*, Springer Verlag, Dordrecht, **2004**.
- [19] P. Saxena, L. M. Hildemann. Water-Soluble Organics in Atmospheric Particles: A Critical Review of the Literature and Application of Thermodynamics to Identify Candidate Compounds. *J. Aerosol Chem.* **1996**, *24*, 57-109.
- [20] W. F. Rogge, M. A. Mazurek, L. M. Hildemann, G. R. Cass, B. R. T. Simoneit. Quantification of Urban Aerosols at a Molecular Level: Identification, Abundance and Seasonal Variation. *Atmos. Environ.* **1993**, *27*, 1309-1330.
- [21] S. Zappoli, A. Andracchio, S. Fuzzi, M. C. Facchini, A. Gelencsér, G. Kiss, Z. Krivacsy, A. Molnar, E. Meszaros, H. C. Hansson. Inorganic, Organic and Macromolecular Components of Fine Aerosol in Different Areas of Europe in Relation to Their Water Solubility. *Atmos. Environ.* **1999**, *33*, 2733-2743.
- [22] H. Puxbaum, M. Tenze-Kunit. Size Distribution and Seasonal Variation of Atmospheric Cellulose. *Atmos. Environ.* **2003**, *37*, 3693-3699.
- [23] S. Kobayashi, H. Uyama. Biomacromolecules and Bio-Related Macromolecules. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 235-256.
- [24] M. Kunit, H. Puxbaum. Enzymatic Determination of the Cellulose Content of Atmospheric Aerosols. *Atmos. Environ.* **1996**, *30*, 1233-1236.
- [25] P. M. Medeiros, M. H. Conte, J. C. Weber, B. R. T. Simoneit. Sugars as Source Indicators of Biogenic Organic Carbon in Aerosols Collected above the Howland Experimental Forest, Maine. *Atmos. Environ.* **2006**, *40*, 1694-1705.
- [26] B. R. T. Simoneit. Lignin Pyrolysis Products, Lignans, and Resin Acids as Specific Tracers of Plant Classes in Emissions from Biomass Combustion. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2533-2541.
- [27] A. Gelencsér, A. Hoffer, G. Kiss, E. Tombácz, R. Kurdi, L. Bencze. In-Situ Formation of Light-Absorbing Organic Matter in Cloud Water. *J. Aerosol Sci.* **2003**, *45*, 25-33.
- [28] O. L. Mayol-Bracero, P. Guyon, B. Graham, G. Roberts, M. O. Andreae, S. Decesari, M. C. Facchini, S. Fuzzi, P. Artaxo. Water-Soluble Organic Compounds in Biomass

- Burning Aerosols Over Amazonia - 2. Apportionment of the Chemical Composition and Importance of the Polyacidic Fraction. *J. Geophys. Res.* **2002**, *107*, LBA59/1-LBA59/15.
- [29] A. Limbeck, M. Kulmala, H. Puxbaum. Secondary Organic Aerosol Formation in the Atmosphere via Heterogeneous Reaction of Gaseous Isoprene on Acidic Particles. *Geophys. Res. Lett.* **2003**, *30*, ASC6/1-ASC6/4.
- [30] N. Havers, P. Burba, J. Lambert, D. Klockow. Spectroscopic Characterization of Humic-Like Substances in Airborne Particulate Matter. *J. Atmos. Chem.* **1998**, *29*, 45-54.
- [31] E. R. Graber, Y. Rudich. Atmospheric HULIS: How Humic-Like are They? A Comprehensive and Critical Review. *Atmos. Chem. Phys.* **2006**, *6*, 729-753.
- [32] R. M. B. O. Duarte, C. A. Pio, A. C. Duarte. Spectroscopic Study of the Water-Soluble Organic Matter Isolated From Atmospheric Aerosols Collected Under Different Atmospheric Conditions. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *530*, 7-14.
- [33] A. Gelencsér, T. Meszaros, M. Blazso, G. Kiss, Z. Krivacsy, A. Molnar, E. Meszaros. Structural Characterisation of Organic Matter in Fine Tropospheric Aerosol by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Atmos. Chem.* **2000**, *37*, 173-183.
- [34] A. Hoffer, G. Kiss, M. Blazso, A. Gelencsér. Chemical Characterization of Humic-Like Substances (HULIS) Formed from a Lignin-Type Precursor in Model Cloud Water. *Geophys. Res. Lett.* **2004**, *31*.
- [35] G. Kiss, E. Tombacz, B. Varga, T. Alsberg, L. Persson. Estimation of the Average Molecular Weight of Humic-Like Substances Isolated from Fine Atmospheric Aerosol. *Atmos. Environ.* **2003**, *37*, 3783-3794.
- [36] Q. Zhang, C. Anastasio. Free and Combined Amino Compounds in Atmospheric Fine Particles (PM_{2.5}) and Fog Waters from Northern California. *Atmos. Environ.* **2003**, *37*, 2247-2258.
- [37] Q. Zhang, C. Anastasio. Chemistry of Fog Waters in California's Central Valley - Part 3: Concentrations and Speciation of Organic and Inorganic Nitrogen. *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 5629-5643.
- [38] Q. Zhang, C. Anastasio, M. Jimenez-Cruz. Water-Soluble Organic Nitrogen in Atmospheric Fine Particles (PM_{2.5}) from Northern California. *J. Geophys. Res.* **2002**, *107*, AAC3/1-AAC3/9.
- [39] S. Cornell, A. Rendell, T. Jickells. Atmospheric Inputs of Dissolved Organic Nitrogen to the Oceans. *Nature* **1995**, *376*, 243-246.
- [40] K. C. Weathers, G. M. Lovett, G. E. Likens, N. F. M. Caraco. Cloudwater Inputs of Nitrogen to Forest Ecosystems in Southern Chile: Forms, Fluxes, and Sources. *Ecosystems* **2000**, *3*, 590-595.

- [41] H. A. Burge, C. A. Rogers. Outdoor Allergens. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 653-659.
- [42] B. Graham, P. Guyon, P. E. Taylor, P. Artaxo, W. Maenhaut, M. M. Glovsky, R. C. Flagan, M. O. Andreae. Organic Compounds Present in the Natural Amazonian Aerosol: Characterization by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Geophys. Res.* **2003**, *108*, AAC6/1-AAC6/13.
- [43] B. Graham, P. Guyon, W. Maenhaut, P. E. Taylor, M. Ebert, S. Matthias-Maser, O. L. Mayol-Bracero, R. H. M. Godoi, P. Artaxo, F. X. Meixner, M. A. Lima Moura, C. H. Eca D'Almeida Rocha, R. Van Grieken, M. M. Glovsky, R. C. Flagan, M. O. Andreae. Composition and Diurnal Variability of the Natural Amazonian Aerosol. *J. Geophys. Res.* **2003**, *108*, AAC5/1-AAC5/16.
- [44] P. J. Milne, R. G. Zika. Amino Acid Nitrogen in Atmospheric Aerosols: Occurrence, Sources and Photochemical Modification. *J. Atmos. Chem.* **1993**, *16*, 361-398.
- [45] M. Kuznetsova, C. Lee, J. Aller. Characterization of the Proteinaceous Matter in Marine Aerosols. *Mar. Chem.* **2005**, *96*, 359-377.
- [46] C. D. O'Dowd, M. C. Facchini, F. Cavalli, D. Ceburnis, M. Mircea, S. Decesari, S. Fuzzi, Y. J. Yoon, J. P. Putaud. Biogenically Driven Organic Contribution to Marine Aerosol. *Nature* **2004**, *431*, 676-680.
- [47] S. Matthias-Maser, R. Jaenicke. The Size Distribution of Primary Biological Aerosol Particles With Radii $> 0.2 \mu\text{m}$ in an Urban/Rural Influenced Region. *Atmos. Res.* **1995**, *39*, 279-286.
- [48] A.G. Miguel, G.R. Cass, M. Weiss, M. M. Glovsky. Latex Allergens in Tire Dust and Airborne Particles. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 1180-1186.
- [49] A.G. Miguel, G.R. Cass, M. M. Glovsky, J. Weis. Allergens in Paved Road Dust and Airborne Particles. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 4159-4168.
- [50] H. Bauer, A. Kasper-Giebl, M. Löflund, H. Giebl, R. Hitzemberger, F. Zibuschka, H. Puxbaum. The Contribution of Bacteria and Fungal Spores to the Organic Carbon Content of Cloud Water, Precipitation and Aerosols. *Atmos. Res.* **2002**, *64*, 109-119.
- [51] T. O. Womiloju, J. D. Miller, P. M. Mayer, J. R. Brook. Methods to Determine the Biological Composition of Particulate Matter Collected from Outdoor Air. *Atmos. Environ.* **2003**, *37*, 4335-4344.
- [52] M. Puc. Characterization of Pollen Allergens. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2003**, *10*, 143-149.
- [53] T. H. Roulston, J. H. Cane, S. L. Buchmann. What Governs Protein Content of Pollen: Pollinator Preferences, Pollen-Pistil Interactions, or Phylogeny? *Ecol. Monographs* **2000**, *70*, 617-643.

- [54] G. F. Schäppi, P.E. Taylor, M. C. F. Pain, P. A. Cameron, A. W. Dent, I.A. Staff, C. Suphioglu. Concentrations of Major Grass Group 5 Allergens in Pollen Grains and Atmospheric Particles: Implications for Hay Fever and Allergic Asthma Sufferers Sensitized to Grass Pollen Allergens. *Clin. & Exp. Allergy* **1999**, *29*, 633-641.
- [55] M. V. Zubkov, B. M. Fuchs, H. Eiler, P. H. Burkill, R. Amann. Determination of Total Protein Content of Bacterial Cells by SYPRO Staining and Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3251-3257.
- [56] E. Barbarino, S. O. Lourenco. An Evaluation of Methods for Extraction and Quantification of Protein from Marine Macro- and Microalgae. *J. Appl. Phycol.* **2005**, *17*, 447-460.
- [57] U. Risse, J. Tomczok, J. Huss-Marp, U. Darsow, H. Behrendt. Health-Relevant Interaction Between Airborne Particulate Matter and Aeroallergens (Pollen). *J. Aerosol Sci.* **2000**, *31*, S27-S28.
- [58] H. Behrendt, W. M. Becker. Localization, Release and Bioavailability of Pollen Allergens: The Influence of Environmental Factors. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 709-715.
- [59] H. Behrendt, W. M. Becker, K. H. Friedrichs, U. Darsow, R. Tomingas. Interaction between Aeroallergens and Airborne Particulate Matter. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1992**, *99*, 425-428.
- [60] G. F. Schäppi, P. E. Taylor, I. A. Staff, C. Suphioglu, R. B. Knox. Source of Bet v 1 Loaded Inhalable Particles from Birch Revealed. *Sex. Plant Reprod.* **1997**, *10*, 315-323.
- [61] G. F. Schäppi, C. Suphioglu, P. E. Taylor, R. B. Knox. Concentrations of the Major Birch Tree Allergen Bet v 1 in Pollen and Respirable Fine Particles in the Atmosphere. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1997**, *100*, 656-661.
- [62] G. F. Schäppi, C. Monn, B. Wüthrich, H. U. Wanner. Direct Determination of Allergens in Ambient Aerosols: Methodological Aspects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1996**, *119*, 364-370.
- [63] A. N. Ankilov, A. M. Baklanov, B. D. Belan, A. I. Borodulin, G. A. Buryak, A. L. Vlasenko, Y. V. Marchenko, S. E. Ol'kin, M. V. Panchenko, V. V. Penenko, O. V. P'yanov, I. K. Reznikova, A. S. Safatov, A. N. Sergeev, E. A. Tsvetova. Annual Variation of Protein Concentration in Biogenic Component of Atmospheric Aerosol in Southwestern Siberia. *Atmos. Oceanic Opt.* **2001**, *14*, 473-477.
- [64] J. Boreson, A. M. Dillner, J. Peccia. Correlating Bioaerosol Load with PM_{2.5} and PM_{10cf} Concentrations: A Comparison Between Natural Desert and Urban-Fringe Aerosols. *Atmos. Environ.* **2004**, *38*, 6029-6041.

- [65] A. N. Ankilov, A. M. Baklanov, A. I. Borodulin, G. A. Buryak, S. B. Malyskin, S. E. Ol'kin, O. V. P'yankov, O. G. P'yankova, A. S. Safatov, A. N. Sergeev. Estimate of the Biological Component of the Atmospheric Aerosol in Southwestern Siberia. *Atmos. Oceanic Opt.* **1999**, *12*, 488-492.
- [66] E. Scheller. Amino Acids in Dew - Origin and Seasonal Variation. *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 2179-2192.
- [67] K. Mopper, R. G. Zika. Free Amino Acids in Marine Rains: Evidence for Oxidation and Potential Role in Nitrogen Cycling. *Nature* **1987**, *325*, 246-249.
- [68] S. Cornell, K. Mace, S. Coeppicus, R. Duce, B. Huebert, T. Jickells, L. Z. Zhuang. Organic Nitrogen in Hawaiian Rain and Aerosol. *J. Geophys. Res.* **2001**, *106*, 7973-7983.
- [69] K. Gorzelska, J. N. Galloway, K. Watterson, W. C. Keene. Water-Soluble Primary Amine Compounds in Rural Continental Precipitation. *Atmos. Environ.* **1992**, *26A*, 1005-1018.
- [70] T. E. Graedel, P. J. Crutzen. *Chemie der Atmosphäre: Bedeutung für Klima und Umwelt*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1994**.
- [71] E. Bolzacchini, M. Bruschi, J. Hjorth, S. Meinardi, M. Orlandi, B. Rindone, E. Rosenbohm. Gas-Phase Reaction of Phenol. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2975-2982.
- [72] M. A. J. Harrison, S. Barra, D. Borghesi, D. Vione, C. Arsene, R. I. Olariu. Nitrated Phenols in the Atmosphere: A Review. *Atmos. Environ.* **2005**, *39*, 231-248.
- [73] C. Schauer, R. Niessner, U. Pöschl. Analysis of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Liquid Chromatography with Fluorescence and Mass Spectrometry Detection: Air Particulate Matter, Soot, and Reaction Product Studies. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 725-736.
- [74] J. K. Lin, K. J. Chen, G. Y. Liu, Y. R. Chu, S. Y. Lin-Shiau. Nitration and Hydroxylation of Aromatic Amino Acid and Guanine by the Air Pollutant Peroxyacetyl Nitrate. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *127*, 219-236.
- [75] J. A. Thornton, J. P. D. Abbat. N₂O₅ Reaction on Submicron Sea Salt Aerosol: Kinetics, Products, and the Effect of Surface Active Organics. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 10004-10012.
- [76] B. J. Finlayson-Pitts, M. J. Ezell, J. N. Pitts. Formation of Chemically Active Chlorine Compounds by Reactions of Atmospheric NaCl Particles with Gaseous N₂O₅ and ClONO₂. *Nature* **1989**, *337*, 241-244.
- [77] A. Petersen, G. Schramm, M. Schlaak, W. M. Becker. Post-Translational Modifications Influence IgE Reactivity to the Major Allergen Phl p 1 of Timothy Grass Pollen. *Clin. Exp. Allergy* **1998**, *28*, 315-321.

- [78] M.J. Mamula, R. J. Gee, J. I. Elliott, A. Sette, S. Southwood, P. J. Jones, P. R. Blier. Isoaspartyl Post-Translational Modification Triggers Autoimmune Responses to Self-Proteins. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22321-22327.
- [79] H. A. Doyle, M. J. Mamula. Posttranslational Modifications of Self-Antigens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1050*, 1-9.
- [80] B. Brunekreef. NO₂: The Gas that Won't Go Away. *Clin. Exp. Allergy* **2001**, *31*, 1170-1172.
- [81] C. Barck, T. Sandström, J. Lundahl, G. Halldén, M. Svartengren, V. Strand, S. Rak, G. Bylin. Ambient Level of NO₂ Augments the Inflammatory Response to Inhaled Allergen in Asthmatics. *Respiratory Medicine* **2002**, *96*, 907-917.
- [82] M. Svartengren, V. Strand, G. Bylin, L. Järup, G. Pershagen. Short-Term Exposure to Air Pollution in a Road Tunnel Enhances the Asthmatic Response to Allergen. *Eur. Respir. J.* **2000**, *15*, 716-724.
- [83] Y. K. Gruijthuisen, I. Grieshuber, A. Stöcklinger, U. Tischler, T. Fehrenbach, M. G. Weller, L. Vogel, S. Vieths, U. Pöschl, A. Duschl. Nitration Enhances the Allergenic Potential of Proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2006**, *141*, 265-275.
- [84] R. L. Persinger, W. M. Blay, N. H. Heintz, D. R. Hemenway, Y. M. W. Janssen-Heininger. Nitrogen Dioxide Induces Death in Lung Epithelial Cells in a Density-Dependent Manner. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *24*, 583-590.
- [85] A. A. Andreadis, S. I. Hazen, S. A. A. Comhair, S. C. Erzurum. Oxidative and Nitrosative Events in Asthma. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 213-225.
- [86] A. J. P. Martin, R. L. M. Synge. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases 1. A Theory of Chromatography 2. Application to the Micro-Determination of the Higher Monoamino Acids in Proteins. *Biochem. J.* **1941**, *35*, 1358-1368.
- [87] R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin. Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatographic Method Using Paper. *Biochem. J.* **1944**, *38*, 65-68.
- [88] R. L. M. Synge. Analysis of a Partial Hydrolysate of Gramicidin by Partition Chromatography with Starch. *Biochem. J.* **1944**, *38*, 285-294.
- [89] R. L. M. Synge. 'Gramicidin S': Over-All Chemical Characteristics and Amino Acid Composition. *Biochem. J.* **1945**, *39*, 363-365.
- [90] F. Sanger, E. O. P. Thompson. The Amino Acid Sequence in the Glycyl Chain of Insulin. 1. The Identification of Lower Peptides from Partial Hydrolysates. *Biochem. J.* **1953**, *53*, 353-366.
- [91] F. Sanger, E. O. Thompson. The Amino Acid Sequence in the Glycyl Chain of Insulin. 2. The Investigation of Peptides from Enzymic Hydrolysates. *Biochem. J.* **1953**, *53*, 366-374.

- [92] F. Sanger, H. Tuppy. The Amino Acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin. 1. The Identification of Lower Peptides From Partial Hydrolysates. *Biochem. J.* **1951**, *49*, 463-481.
- [93] F. Sanger, H. Tuppy. The Amino Acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin. 2. The Investigation of Peptides from Enzymic Hydrolysates. *Biochem. J.* **1951**, *49*, 481-490.
- [94] W. H. Stein, S. Moore. Chromatography of Amino Acids on Starch Columns. Separation of Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Methionine, Tyrosine and Valine. *J. Biol. Chem.* **1948**, *176*, 337-365.
- [95] S. Moore, W. H. Stein. Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **1948**, *176*, 367-388.
- [96] S. Moore, W. H. Stein. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. *J. Biol. Chem.* **1951**, *192*, 663-681.
- [97] S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1185-1190.
- [98] D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1190-1206.
- [99] L. S. Ettre, C. W. Gehrke. The Development of the Amino Acid Analyzer. *LC GC N. Am.* **2006**, *24*, 390.
- [100] The Royal Swedish Academy of Sciences. The Nobel Prize of Chemistry 1972 - Press Release. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/press.html, **1972**, Zugriffsdatum: 19.09.2006.
- [101] R. L. Heinrikson, S. C. Meredith. Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 65-74.
- [102] M. Fountoulakis, H. W. Lahm. Hydrolysis and Amino Acid Composition Analysis of Proteins. *J. Chromatogr. A* **1998**, *826*, 109-134.
- [103] Y. Ohkura, M. Kai, H. Nohta. Fluorogenic Reactions for Biomedical Chromatography. *J. Chromatogr. B* **1994**, *659*, 85-107.
- [104] V. Walker, G. A. Mills. Quantitative Methods for Amino Acid Analysis in Biological Fluids. *Ann. Clin. Biochem.* **1995**, *32*, 28-57.
- [105] P. Husek. Advances in Amino Acid Analysis. *LC GC N. Am.* **2001**, *19*, 986-999.
- [106] R. F. Ebert. Amino Acid Analysis by HPLC - Optimized Conditions for Chromatography of Phenylthiocarbamyl Derivatives. *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 431-435.
- [107] A. S. Feste. Reversed-Phase Chromatography of Phenylthiocarbamyl Amino Acid Derivatives of Physiological Amino Acids - An Evaluation and a Comparison with Analysis by Ion-Exchange Chromatography. *J. Chromatogr. B* **1992**, *574*, 23-43.

- [108] P. Lindroth, K. Mopper. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with *o*-Phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1667-1674.
- [109] B. N. Jones, S. Pääbo, S. Stein. Amino Acid Analysis and Enzymatic Sequence Determination of Peptides by an Improved *o*-Phthaldialdehyde Precolumn Labeling Procedure. *J. Liquid Chromatogr.* **1981**, *4*, 565-586.
- [110] H. Umagat, P. Kucera, L. F. Wen. Total Amino Acid Analysis Using Pre-Column Fluorescence Derivatization. *J. Chromatogr. A* **1982**, *239*, 463-474.
- [111] R. Knecht, J. Y. Chang. Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids after Gas-Phase Hydrolysis and Derivatization with (Dimethylamino)azobenzenesulfonyl Chloride. *Anal. Chem.* **1986**, *1986*, 2375-2379.
- [112] Y. Watanabe, K. Imai. Pre-Column Labelling For High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids with 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and its Application to Protein Hydrolysates. *J. Chromatogr. A* **1982**, *239*, 723-732.
- [113] K. Imai, Y. Watanabe, T. Toyo'oka. Fluorometric Assay of Amino Acids and Amines by Use of 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F) in High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **1982**, *16*, 214-215.
- [114] S. Einarsson, S. Folestad, B. Josefsson, S. Lagerkvist. High-Resolution Reversed-Phase Liquid Chromatography System for the Analysis of Complex Solutions of Primary and Secondary Amino Acids. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1638-1643.
- [115] R. A. Bank, E. J. Jansen, B. Beekman, J. M. Te Koppele. Amino Acid Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Improved Derivatization and Detection Conditions with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 167-176.
- [116] M. Nemati, M. R. Oveisi, H. Abdollahi, O. Sabzevari. Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins Using Principal Component Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 485-492.
- [117] I. Molnár-Perl, I. Bozor. Comparison of the Stability and UV and Fluorescence Characteristics of the *o*-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic acid and *o*-Phthaldialdehyde/*N*-Acetyl-cysteine Reagents and those of their Amino Acid Derivatives. *J. Chromatogr. A* **1998**, *798*, 37-46.
- [118] A. Vasanits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl. Retention/Quantitation Properties of the *o*-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic Acid and the *o*-Phthaldialdehyde/*N*-Acetyl-Cysteine Amino Acid Derivatives in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 271-287.
- [119] I. Molnár-Perl, A. Vasanits. Stability and Characteristics of the *o*-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic Acid and *o*-Phthaldialdehyde/*N*-Acetyl-*L*-cysteine Reagents and

- Their Amino Acid Derivatives Measured by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *835*, 73-91.
- [120] Y. Mengerink, D. Kutlán, F. Tóth, A. Csámpai, I. Molnár-Perl. Advances in the Evaluation of the Stability and Characteristics of the Amino Acid and Amine Derivatives Obtained with the *o*-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic Acid and *o*-Phthaldialdehyde/*N*-Acetyl-cysteine Reagents High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Study. *J. Chromatogr. A* **2002**, *949*, 99-124.
- [121] E. L. Schwarz, W. L. Roberts, M. Pasquali. Analysis of Plasma Amino Acids by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *354*, 83-90.
- [122] J. K. Lin, C. C. Lai. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Naturally Occuring Primary and Secondary Amines with Dabsyl Chloride. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 630-635.
- [123] S. Uchiyama, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai. Effects of the Substituent Groups at the 4- and 7-Positions on the Fluorescence Characteristics of Benzofurazan Compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2165-2174.
- [124] S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai. Fluorogenic and Fluorescent Labeling Reagents with a Benzofurazan Skeleton. *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 295-318.
- [125] K. Imai, S. Uzu, T. Toyo'oka. Fluorogenic Reagents, Having Benzofurazan Structure, in Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 1395-1403.
- [126] K. Imai, S. Uzu, S. Kanda, W. R. G. Baeyens. Availability of Fluorogenic Reagents Having a Benzofurazan Structure in the Biosciences. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *290*, 3-20.
- [127] Y. Watanabe, K. Imai. Sensitive Determination of Amino Acids in Human Serum and Dried Blood Disc of 3 mm Diameter for Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. *J. Chromatogr. A* **1984**, *309*, 279-286.
- [128] K. Imai, Y. Watanabe. Fluorometric Determination of Secondary Amino Acids by 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal. Chim. Acta* **1981**, *130*, 377-383.
- [129] H. Miyano, T. Toyo'oka, K. Imai, T. Nakajima. Influences of Metal Ions on the Reaction of Amino and Imino Acids with Fluorogenic Reagents. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 125-130.
- [130] M. Friedman. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 385-406.
- [131] F. Lottspeich, H. Zorbas. *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1998**.

- [132] S. Udenfried, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele. Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science* **1972**, *178*, 871-872.
- [133] J. R. Benson, P. E. Hare. *o*-Phthalaldehyde: Fluorogenic Detection of Primary Amines in the Picomole Range. Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin. *PNAS* **1975**, *72*, 619-622.
- [134] P. Böhlen, M. Mellet. Automated Fluorometric Amino Acid Analysis: The Determination of Proline and Hydroxyproline. *Anal. Biochem.* **1978**, *94*, 313-321.
- [135] J. A. Polta, D. C. Johnson. The Direct Electrochemical Detection of Amino Acids at a Platinum Electrode in an Alkaline Chromatographic Effluent. *J. Liquid Chromatogr.* **1983**, *6*, 1727-1743.
- [136] P. Jandik, A. P. Clarke, N. Avdalovic, D. C. Andersen, J. Cacia. Analyzing Mixtures of Amino Acids and Carbohydrates using Bi-modal Integrated Amperometric Detection. *J. Chromatogr. B* **1999**, *732*, 193-201.
- [137] A. P. Clarke, P. Jandik, R. D. Rocklin, Y. Liu, N. Avdalovic. An Integrated Amperometry Waveform for the Direct, Sensitive Detection of Amino Acids and Amino Sugars Following Anion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2774-2781.
- [138] R. W. Zumwalt, J. Desgres, K. C. Kuo, J. E. Pautz, C. W. Gehrke. Amino Acid Analysis by Capillary Gas Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, *70*, 253-262.
- [139] P. Husek. Rapid Derivatization and Gas Chromatographic Determination of Amino Acids. *J. Chromatogr. A* **1991**, *552*, 289-299.
- [140] P. Husek. Chloroformates in Gas Chromatography as General Purpose Derivatizing Agents. *J. Chromatogr. B* **1998**, *717*, 57-91.
- [141] W. M. Lamkin, C. W. Gehrke. Quantitative Gas Chromatography of Amino Acids. Preparation of *n*-Butyl *N*-Trifluoroacetyl Esters. *Anal. Chem.* **1965**, *37*, 383-389.
- [142] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux. Determination of 20 Underivatized Proteinic Amino Acids by Ion-Pairing Chromatography and Pneumatically Assisted Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 191-202.
- [143] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux. Ion-Pair Chromatography on a Porous Graphitic Carbon Stationary Phase for the Analysis of Twenty Underivatized Protein Amino Acids. *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 245-254.
- [144] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux. A Comparative Study of Commercial Liquid Chromatographic Detectors for the Analysis of Underivatized Amino Acids. *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 9-21.

- [145] H. M. H. Van Eijk, D. R. Rooyackers, P. B. Soeters, N. E. P. Deutz. Determination of Amino Acid Isotope Enrichment Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **1998**, *271*, 8-17.
- [146] K. Gartenmann, S. Kochhar. Short-Chain Peptide Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometer after Derivatization with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5068.
- [147] C. W. Gehrke, L. L. Wall, J. S. Absheer, F. E. Kaiser, R. W. Zumwalt. Sample Preparation for Chromatography of Amino Acids: Acid Hydrolysis of Proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, *68*, 811-821.
- [148] E. L. Smith, A. Stockell. Amino Acid Composition of Crystalline Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 501-514.
- [149] E. L. Smith, A. Stockell, J. R. Kimmel. Crystalline Papain. III. Amino Acid Composition. *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 551-561.
- [150] C. H. W. Hirs, W. H. Stein, S. Moore. The Amino Acid Composition of Ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **1954**, *211*, 941-950.
- [151] A.J. Darragh, D. J. Garrick, P. J. Moughan, W. H. Hendriks. Correction for Amino Acid Loss during Acid Hydrolysis of a Purified Protein. *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 199-207.
- [152] E. A. Noltmann, T. A. Mahowald, S. A. Kuby. Studies on Adenosine Triphosphate Transphosphorylases. I. Amino Acid Composition of Adenosine Triphosphate-Creatine Transphosphorylase. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1146-1154.
- [153] G. O. Kohler, R. Palter. Studies on Methods for Amino Acid Analysis of Wheat Products. *Cereal Chem.* **1967**, *44*, 512-520.
- [154] A. P. Adebisi, D. H. Jin, T. Ogawa, K. Muramoto. Acid Hydrolysis of Protein in a Microcapillary Tube for the Recovery of Tryptophan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 255-257.
- [155] L. T. Ng, A. Pascaud, M. Pascaud. Hydrochloric-Acid Hydrolysis of Proteins and Determination of Tryptophan by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Anal. Biochem.* **1987**, *167*, 47-52.
- [156] K. Muramoto, H. Kamiya. Recovery of Tryptophan in Peptides and Proteins by High-Temperature and Short-Term Acid Hydrolysis in the Presence of Phenol. *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 223-230.
- [157] A. Tsugita, J. J. Scheffler. A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 585-588.

- [158] A. Tsugita, T. Uchida, H. W. Mewes, T. Ataka. A Rapid Vapor-Phase Acid (Hydrochloric Acid and Trifluoroacetic Acid) Hydrolysis of Peptide and Protein. *J. Biochem.* **1987**, *102*, 1593-1597.
- [159] F. C. Westall, J. Scotchle, A. B. Robinson. Use of Propionic Acid Hydrochloric Acid-Hydrolysis in Merrifield Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3363-3365.
- [160] F. Hanft, P. Koehler. Quantitation of Dityrosine in Wheat Flour and Dough by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2418-2423.
- [161] Y. Yokote, K. M. Arai, K. Akahane. Recovery of Tryptophan from 25-Minute Acid Hydrolysates of Protein. *Anal. Biochem.* **1986**, *152*, 245-249.
- [162] L. Joergensen, H. N. Thestrup. Determination of Amino Acids in Biomass and Protein Samples by Microwave Hydrolysis and Ion-Exchange Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1995**, *706*, 421-428.
- [163] S. H. Chiou, K. T. Wang. Simplified Protein Hydrolysis with Methanesulphonic Acid at Elevated Temperature for the Complete Amino Acid Analysis of Proteins. *J. Chromatogr. A* **1988**, *448*, 404-410.
- [164] M. Weiss, M. Manneberg, J. F. Juranville, H. W. Lahm, M. Fountoulakis. Effect of the Hydrolysis Method on the Determination of the Amino Acid Composition of Proteins. *J. Chromatogr. A* **1998**, *795*.
- [165] R. J. Simpson, M. R. Neuberger, T. Y. Liu. Complete Amino Acid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1936-1940.
- [166] T. Y. Liu, Y. H. Chang. Hydrolysis of Proteins with *p*-Toluolsulfonic Acid. Determination of Tryptophan. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2842-2848.
- [167] N. M. Meltzer, G. I. Tous, S. Gruber, S. Stein. Gas-Phase Hydrolysis of Proteins and Peptides. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 356-361.
- [168] F. Sanger, E. O. Thompson. Halogenation of Tyrosine During Acid Hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *71*, 468-471.
- [169] J. Kroll, H. Rawel, R. Kröck. Microwave Digestion of Proteins. *Eur. Food Res. Technol.* **1998**, *207*, 202-206.
- [170] E. Tatár, M. Khalifa, G. Záray, I. Molnár-Perl. Comparison of the Recovery of Amino Acids in Vapour-Phase Hydrolysates of Proteins Performed in a Pico Tag Work Station and in a Microwave Hydrolysis System. *J. Chromatogr. A* **1994**, *672*, 109-115.
- [171] A. Pecavar, M. Prosek, D. Fercej-Temeljotov, J. Marsel. Quantitative Evaluation of Amino Acids Using Microwave Accelerated Hydrolysis. *Chromatographia* **1990**, *30*, 159-162.

- [172] K. A. Walsh. Internal Standards for Amino Acid Analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, *58*, 596-598.
- [173] M. L. G. Gardner. A Comparison of Internal and External Standardization in Amino Acid Analysis. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 174-177.
- [174] S. J. Meade, E. A. Reid, J. A. Gerrard. The Impact of Processing on the Nutritional Quality of Food Proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **2005**, *88*, 904-922.
- [175] K. M. Koshy, J. M. Boggs. Interference of Carbohydrates in the Quantitation of Protein-Bound Citrulline by Amino Acid Analysis. *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 375-381.
- [176] K. J. Siebert, N. V. Troukhanova, P. Y. Lynn. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 80-85.
- [177] H. M. Rawel, K. Meidtnr, J. Kroll. Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4228-4235.
- [178] R. Hayashi, F. Suzuki. Determination of Methionine Sulfoxide in Protein and Food by Hydrolysis with *p*-Toluenesulfonic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *149*, 521-528.
- [179] M. C. Allred, J. L. McDonald. Determination of Sulfur Amino Acids and Tryptophan in Foods and Food And Feed Ingredients: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1988**, *71*, 603-606.
- [180] C. W. Gehrke. Quantitative Analysis of Cystine, Methionine, Lysine, and Nine Other Amino Acids by a Single Oxidation-4 Hour Hydrolysis Method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, *70*, 171-174.
- [181] M. Manneberg, H. W. Lahm, M. Fountoulakis. Quantification of Cysteine Residues Following Oxidation to Cystic Acid in the Presence of Sodium Azide. *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 349-353.
- [182] I. Molnár-Perl. Tryptophan Analysis in Peptides and Proteins, Mainly by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *763*.
- [183] T. E. Hugli, S. Moore. Determination of the Tryptophan Content of Proteins by Ion Exchange Chromatography of Alkaline Hydrolysates. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 2828-2834.
- [184] F. Wu, E. Tanoue. Sensitive Determination of Dissolved Tryptophan in Freshwater by Alkaline Hydrolysis and HPLC. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 1063-1066.
- [185] H. Edelhoch. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* **1967**, *6*, 1948-1954.
- [186] E. J. Robel, A. B. Crane. An Accurate Method for Correcting Unknown Amino Acid Losses from Protein Hydrolyzates. *Anal. Biochem.* **1972**, *48*, 233-246.
- [187] A. M. Rowan, P. J. Moughan, J. Wilson. Effect of Hydrolysis Time on the Determination of the Amino Acid Composition of Diet, Ileal Digesta, and Feces Samples and on

- the Determination of Dietary Amino Acid Digestibility Coefficients. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 981-985.
- [188] A. J. Darragh, P. J. Moughan. The Effect of Hydrolysis Time on Amino Acid Analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **2005**, *88*, 888-893.
- [189] J. C. Anders. Advances in Amino Acid Analysis. *Biopharm - Appl. T. Bio.* **2002**, *15*, 32-36.
- [190] T. Teerlink. Derivatization of Posttranslationally Modified Amino Acids. *J. Chromatogr. B* **1994**, *659*, 185-207.
- [191] L. Gorbics, L. Urge, L. Otvos. Comparative and Optimized Dabsyl-Amino Acid Analysis of Synthetic Phosphopeptides and Glycopeptides. *J. Chromatogr. A* **1994**, *676*, 169-176.
- [192] L. Gorbics, L. Urge. Determination of Amino Sugars in Synthetic Glycopeptides During the Conditions of Amino Acid Analysis Utilizing Precolumn Derivatization and High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr. A* **1993**, *637*, 43-53.
- [193] S. R. Pennington, M. R. Wilkins, D. F. Hochstrasser, M. J. Dunn. Proteome Analysis: From Protein Characterization to Biological Function. *Trends Cell Biol.* **1997**, *7*, 168-173.
- [194] J. Barrett, P. M. Brophy, J. V. Hamilton. Analysing Proteomic Data. *Int. J. Parasitol.* **2005**, *35*, 543-553.
- [195] C. Pasquali, S. Frutiger, M. R. Wilkins, G. J. Hughes, R. D. Appel, A. Bairoch, D. Schaller, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser. Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Escherichia Coli Homogenates: The Escherichia Coli SWISS-2DPAGE Database. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 547-555.
- [196] R. Aebersold, D. R. Goodlett. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 269-295.
- [197] D. Voet, J. G. Voet. *Biochemistry*, Wiley Verlag, New York, **1995**.
- [198] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, L. Tonella, K. L. Ou, M. Tyler, J. C. Sanchez, A. A. Gooley, B. J. Walsh, A. Bairoch, R. D. Appel, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser. Protein Identification with N- and C-Terminal Sequence Tags in Proteome Projects. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 599-608.
- [199] G. J. Hughes, S. Frutiger, N. Paquet, F. Ravier, C. Pasquali, J. C. Sanchez, R. James, J. D. Tissot, B. Bjellqvist, D. F. Hochstrasser. Plasma Protein Map - An Update by Microsequencing. *Electrophoresis* **1992**, *13*, 707-714.
- [200] R. D. Appel, A. Bairoch, D. F. Hochstrasser. A New Generation of Information Retrieval Tools for Biologists: The Example of the ExPASy WWW Server. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 258-269.

- [201] M. Fountoulakis, J. F. Juranville, P. Berndt. Large-Scale Identification of Proteins of Haemophilus Influenzae by Amino Acid Composition Analysis. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2968-2977.
- [202] M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. L. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. J. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser. From Proteins to Proteomes: Large-Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Biotechnology* **1996**, *14*, 61-65.
- [203] C. H. Wheeler, S. L. Berry, M. R. Wilkins, J. M. Corbett, K. L. Ou, A. A. Gooley, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, M. J. Dunn. Characterisation of Proteins from Two-Dimensional Electrophoresis Gels by Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry and Amino Acid Compositional Analysis. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 580-587.
- [204] J. X. Yan, M. R. Wilkins, K. L. Ou, A. A. Gooley, K. L. Williams, J. C. Sanchez, O. Golaz, C. Pasquali, D. F. Hochstrasser. Large-Scale Amino Acid Analysis for Proteome Studies. *J. Chromatogr. A* **1996**, *736*, 291-302.
- [205] O. Golaz, M. R. Wilkins, J. C. Sanchez, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams. Identification of Proteins by their Amino Acid Composition: An Evaluation of the Method. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 573-579.
- [206] M. R. Wilkins, K. L. Ou, R. D. Appel, J. C. Sanchez, J. X. Yan, O. Golaz, V. Farnsworth, P. Cartier, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams, A. A. Gooley. Rapid Protein Identification Using N-Terminal "Sequence Tag" and Amino Acid Analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *221*, 609-613.
- [207] A. A. Gooley, K. L. Ou, J. Russell, M. R. Wilkins, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams. A Role of Edman Degradation in Proteome Studies. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1068-1072.
- [208] M. R. Wilkins, K. L. Williams. Cross-Species Protein Identification using Amino Acid Composition, Peptide Mass Fingerprinting, Isoelectric Point and Molecular Mass: A Theoretical Evaluation. *J. Theor. Biol.* **1997**, *186*, 7-15.
- [209] G. S. Sittampalam, R. M. Ellis, D. J. Miner, E. C. Rickard, D. K. Clodfelter. Evaluation of Amino Acid Analysis as Reference Method to Quantitate Highly Purified Proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1988**, *71*, 833-838.
- [210] N. Ritter, J. E. McEntire. Determining Protein Concentration - Part 1: Methodology. *Biopharm - Appl. T. Bio.* **2002**, *15*, 12-22.
- [211] J. C. Anders, B. F. Parten, G. E. Petrie, R. L. Marlowe, J. E. McEntire. Using Amino Acid Analysis to Determine Absorptivity Constants - A Validation Case Study Using Bovine Serum Albumin. *Biopharm Int.* **2003**, *16*, 30-37.

- [212] M. J. Hunter. A Method for the Determination of Protein Partial Specific Volumes. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3285-3292.
- [213] J. Bernhardt, H. Pauly. Partial Specific Volumes in Highly Concentrated Protein Solutions. 2. Mixtures of Water, Bovine Hemoglobin and Sodium Chloride. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1290-1295.
- [214] J. Bernhardt, H. Pauly. Partial Specific Volumes in Highly Concentrated Protein Solutions. I. Water-Bovine Serum Albumin and Water-Bovine Hemoglobin. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 584-590.
- [215] Y. Nozaki. Determination of the Concentration of Protein by Dry Weight - A Comparison with Spectrophotometric Measurements. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *249*, 437-446.
- [216] M. O. Dayhoff, G. E. Perlmann, D. A. MacInnes. The Partial Specific Volumes, in Aqueous Solution, of Three Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*.
- [217] H. B. Bull, K. Breese. Concentrations and Partial Volumes of Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *197*, 199-204.
- [218] R. Goodrich, F. J. Reithel. Macromolecule Dry Weight Determination with a Vacuum Balance. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 538-543.
- [219] R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith, P. Sporns. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, Wiley Verlag, New Jersey, **2005**.
- [220] F. W. Sosulski, G. I. Imafidon. Amino Acid Composition and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Animal and Plant Foods. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1351-1356.
- [221] C. A. Lang. Simple Microdetermination of Kjeldahl Nitrogen in Biological Materials. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1692-1694.
- [222] A. Hiller, J. Plazin, D. D. Van Slyke. A Study of Conditions for Kjeldahl Determination of Nitrogen in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1948**, *176*, 1401-1420.
- [223] G. L. Miller, E. E. Miller. Determination of Nitrogen in Biological Materials. *Anal. Chem.* **1948**, *20*.
- [224] P. F. Kane. Comparison of HgO and CuSO₄/TiO₂ as Catalysts in Manual Kjeldahl Digestion for Determination of Crude Protein in Animal Feed: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, *70*, 907-911.
- [225] F. C. Koch, T. L. McMeekin. A New Direct Nesslerization Micro-Kjeldahl Method and a Modification of the Nessler-Folin Reagent for Ammonia. *J. Am. Chem. Soc.* **1924**, *46*, 2066-2069.
- [226] A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751-766.

- [227] C. V. Sapan, A. Lundblad, N. C. Price. Colorimetric Protein Assay Techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 99-108.
- [228] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
- [229] O. Folin, V. Ciocalteu. On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73*, 627-650.
- [230] N. Hollemann, E. Wieberg. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, **1995**.
- [231] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- [232] A. L. Winters, F. R. Minchin. Modification of the Lowry Assay to Measure Proteins and Phenols in Covalently Bound Complexes. *Anal. Biochem.* **2005**, *346*, 43-48.
- [233] P. Kamath, T. N. Pattabiraman. Phenols Interfere in Protein Estimation by the Bicinchoninic Acid Assay Method. *Biochem. Arch.* **1988**, *4*, 17-23.
- [234] M. Fountoulakis, J. F. Juranville, M. Manneberg. Comparison of the Coomassie Brilliant Blue, Bicinchoninic Acid and Lowry Quantitation Assays, Using Non-Glycosylated and Glycosylated Proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1992**, *24*, 265-274.
- [235] M. M. Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *1976*, 248-254.
- [236] W. W. You, R. P. Haugland, D. K. Ryan, R. P. Haugland. 3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxyaldehyde, a Reagent with Broad Dynamic Range for the Assay of Proteins and Lipoproteins in Solution. *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 277-282.
- [237] R. P. Haugland, V. L. Singer, A. D. Jones, T. H. Steinberg. Non-Specific Protein Staining Using Merocyanine Dyes. *US Patent 5616502* **1997**.
- [238] L. J. Jones, R. P. Haugland, V. L. Singer. Development and Characterization of the NanoOrange Protein Quantification Assay: A Fluorescence-Based Assay of Proteins in Solution. *Biotechniques* **2003**, *34*, 850-861.
- [239] M. D. Harvey, V. Bablekis, P. R. Banks, C. D. Skinner. Utilization of the Non-Covalent Fluorescent Dye, NanoOrange, as a Potential Clinical Diagnostic Tool Nanomolar Human Serum Albumin Quantitation. *J. Chromatogr. B* **2001**, *754*, 345-356.
- [240] H. Jun, S. Y. Hong, S. S. Yoon, C. Kang, M. Suh. Fluorescent Hydrophobic Probes Based on Intramolecular Charge Transfer State for Sensitive Protein Detection in Solution. *Chemistry Letters* **2004**, *33*, 690-691.

- [241] Y. Suzuki, K. Yokoyama. Design and Synthesis of Intramolecular Charge Transfer-Based Fluorescent Reagents for the Highly-Sensitive Detection of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17799-17802.
- [242] A. R. Goldfarb, L. J. Saidel, E. Mosovich. The Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 397-404.
- [243] A. H. Woods, P. R. O'Bar. Absorption of Proteins and Peptides in Far Ultraviolet. *Science* **1970**, *167*, 179-181.
- [244] D. B. Wetlaufer. Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids. *Adv. Protein Chem.* **1962**, *17*, 303-390.
- [245] R. K. Scopes. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* **1974**, *59*, 277-282.
- [246] G. H. Beaven, E. R. Holiday. Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. *Adv. Protein Chem.* **1952**, *7*, 319-382.
- [247] L. J. Saidel, A. R. Goldfarb, S. Waldman. The Absorption Spectra of Amino Acids in the Region Two Hundred to Two Hundred and Thirty Millimicrons. *J. Biol. Chem.* **1952**, *197*, 285-291.
- [248] M. P. Tombs, F. Souter, N. F. Maclagan. Spectrophotometric Determination of Protein at 210 m μ . *Biochem. J.* **1959**, *73*, 167-171.
- [249] W. J. Waddel. A Simple Ultraviolet Spectrophotometric Method for the Determination of Protein. *J. Lab. Clin. Med.* **1956**, *48*, 311-314.
- [250] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray. How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411-2423.
- [251] W. E. Groves, F. C. Davis, B. H. Sells. Spectrophotometric Determination of Microgram Quantities of Protein without Nucleic Acid Interference. *Anal. Biochem.* **1968**, *22*, 195-210.
- [252] O. Warburg, W. Christian. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* **1942**, *310*, 384-421.
- [253] M. Hamdan, P. G. Righetti. Modern Strategies for Protein Quantification in Proteome Analysis: Advantages and Limitations. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 287-302.
- [254] T. M. Annesley. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1041-1044.
- [255] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold. Quantitative Analysis of Complex Protein Mixtures Using Isotope-Coded Affinity Tags. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999.
- [256] D. R. Goodlett, A. Keller, J. D. Watts, R. Newitt, E. C. Yi, S. Purvine, J. K. Eng, P. Haller, R. Aebersold, E. Kolker. Differential Stable Isotope Labeling of Peptides for

- Quantitation and *de novo* Sequence Derivation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1214-1221.
- [257] G. Cagney, A. Emili. *De novo* Peptide Sequencing and Quantitative Profiling of Complex Protein Mixtures Using Mass-Coded Abundance Tagging. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 163-170.
- [258] B. Herbert, M. Galvani, M. Hamdan, E. Olivieri, J. MacCarthy, S. Pederson, P. G. Righetti. Reduction and Alkylation of Proteins in Preparation of Two-Dimensional Map Analysis: Why, When, and How? *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2046-2057.
- [259] W. Dröge. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47-95.
- [260] A. Daiber, V. Ullrich. Radikalchemie im Organismus. Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit. *Chemie in unserer Zeit* **2002**, *36*, 366-375.
- [261] A. Van der Vliet, J. P. Eiserich, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross. Tyrosine Modification by Reactive Nitrogen Species: A Closer Look. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 341-349.
- [262] H. Kaur, B. Halliwell. Evidence for Nitric Oxide-Mediated Oxidative Damage in Chronic Inflammation. Nitrotyrosine in Serum and Synovial Fluid from Rheumatoid Patients. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 9-12.
- [263] A. Castegna, V. Thongboonkerd, J. B. Klein, B. Lynn, W. R. Markesbery, D. A. Butterfield. Proteomic Identification of Nitrated Proteins in Alzheimer's Disease Brain. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 1394 - 1401.
- [264] D. A. Butterfield. Proteomics: A New Approach to Investigate Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain. *Brain Res.* **2004**, *1000*, 1-7.
- [265] H. Ischiropoulos. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *356*, 1-11.
- [266] S. A. B. Greenacre, H. Ischiropoulos. Tyrosine Nitration: Localisation, Quantification, Consequences for Protein Function and Signal Transduction. *Free Rad. Res.* **2001**, *34*, 541-581.
- [267] K. S. Aulak, M. Miyagi, L. Yan, K. A. West, D. Massillon, J. W. Crabb. Proteomic Method Identifies Proteins Nitrated *in vivo* During Inflammatory Challenge. *PNAS* **2001**, *98*, 12056-12061.
- [268] B. Alvarez, R. Radi. Peroxynitrite Reactivity with Amino Acids and Proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 295-311.
- [269] E. R. Stadtman, R. L. Levine. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 207-218.

- [270] C. X. Santos, M. G. Bonini, O. Augusto. Role of the Carbonate Radical Anion in Tyrosine Nitration and Hydroxylation by Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *377*, 146-152.
- [271] J. M. Souza, E. Daikhin, M. Yudkoff, C. S. Raman, H. Ischiropoulos. Factors Determining the Selectivity of Protein Tyrosine Nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *371*, 169-178.
- [272] J. B. Sampson, Y. Z. Ye, H. Rosen, J. S. Beckman. Myeloperoxidase and Horseradish Peroxidase Catalyze Tyrosine Nitration in Proteins from Nitrite and Hydrogen Peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *356*, 207-213.
- [273] J. P. Eisenrich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, A. Van der Vliet. Formation of Nitric Oxide Derived Inflammatory Oxidants by Myeloperoxidase in Neutrophils. *Nature* **1998**, *391*, 393-397.
- [274] R. J. Singh, S. P. A. Goss, J. Joseph, B. Kalyanaraman. Nitration of γ -Tocopherol and Oxidation of α -Tocopherol by Copper-Zinc Superoxide Dismutase/H₂O₂/NO₂⁻: Role of Nitrogen Dioxide Free Radical. *PNAS* **1998**, *95*, 12912-12917.
- [275] O. M. Panasenko, K. Briviba, L. O. Klotz, H. Sies. Oxidative Modification and Nitration of Human Low-Density Lipoproteins by the Reaction of Hypochlorous Acid with Nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *343*, 254-259.
- [276] J. P. Eisenrich, C. E. Cross, A. D. Jones, B. Halliwell, A. Van der Vliet. Formation of Nitrating and Chlorinating Species by Reaction of Nitrite with Hypochlorous Acid. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19199-19208.
- [277] J. M. Souza, I. Choi, Q. Chen, M. Weisse, E. Daikhin, M. Yudkoff, M. Obin, J. Ara, J. Horwitz, H. Ischiropoulos. Proteolytic Degradation of Tyrosine Nitrated Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *380*, 360-366.
- [278] M. W. Duncan. A Review of Approaches to the Analysis of 3-Nitrotyrosine. *Amino Acids* **2003**, *25*, 351-361.
- [279] C. Herce-Pagliai, S. Kotecha, D. E. G. Shuker. Analytical Methods for 3-Nitrotyrosine as a Marker of Exposure to Reactive Nitrogen Species: A Review. *Nitric Oxide* **1998**, *2*, 324-336.
- [280] X. Zhan, D. M. Desiderio. The Human Pituitary Nitroproteome: Detection of Nitrotyrosyl-Proteins with Two-Dimensional Western Blotting, and Amino Acid Sequence Determination with Mass Spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 1180-1186.
- [281] J. Kanski, C. Schöneich. Protein Nitration in Biological Aging: Proteomic and Tandem Mass Spectrometric Characterization of Nitrated Sites. *Meth. Enzymol.* **2005**, *396*, 160-171.

- [282] B. B. Willard, C. I. Ruse, J. A. Keightley, M. Bond, M. Kinter. Site-Specific Quantitation of Protein Nitration Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2370-2376.
- [283] W. Walcher, T. Franze, M. G. Weller, U. Pöschl, C. G. Huber. Liquid- and Gas-Phase Nitration of Bovine Serum Albumin Studied by LC-MS and LC-MS/MS Using Monolithic Columns. *J. Proteome Res.* **2003**.
- [284] A. S. Petersson, H. Steen, D. E. Kalume, K. Caidahl, P. Roepstorff. Investigation of Tyrosine Nitration in Proteins by Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 616-625.
- [285] K. D. Greis. Identification of Nitration Sites on Surfactant Protein A by Tandem Electrospray Mass Spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *335*, 396-402.
- [286] M. Sokolovsky, J. F. Riordan, B. L. Vallee. Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosyl Residues in Proteins. *Biochemistry* **1966**, *5*, 3582-3589.
- [287] G. Nikov, V. Bhat, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum. Analysis of Nitrated Proteins by Nitrotyrosine-Specific Affinity Probes and Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 214-222.
- [288] D. Tsikas, J. C. Frölich. Trouble with the Analysis of Nitrite, Nitrate, S-Nitrosothiols and 3-Nitrotyrosine: Freezing-Induced Artifacts? *Nitric Oxide* **2004**, *11*, 209-213.
- [289] M. T. Frost, B. Halliwell, K. P. Moore. Analysis of Free and Protein-Bound Nitrotyrosine in Human Plasma by a Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method that Avoids Nitration Artifacts. *Biochem. J.* **2000**, *345*, 453-458.
- [290] D. Yi, B. A. Ingelse, M. W. Duncan, G. A. Smythe. Quantification of 3-Nitrotyrosine in Biological Tissues and Fluids: Generating Valid Results by Eliminating Artifactual Formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 578-586.
- [291] M. K. Shigenaga, H. H. Lee, B. C. Blount, S. Christen, E. T. Shigeno, H. Yip, B. N. Ames. Inflammation and NO_x-Induced Nitration: Assay for 3-Nitrotyrosine by HPLC with Electrochemical Detection. *PNAS* **1997**, *94*, 3211-3216.
- [292] H. Ohshima, I. Celan, L. Chazotte, B. Pignatelli, H. F. Mower. Analysis of 3-Nitrotyrosine in Biological Fluids and Protein Hydrolyzates by High-Performance Liquid Chromatography Using a Postseparation, On-line Reduction Column and Electrochemical Detection: Results with Various Nitrating Agents. *Nitric Oxide* **1999**, *3*, 132-141.
- [293] L. W. Morton, I. B. Puddey, K. D. Croft. Comparison of Nitration and Oxidation of Tyrosine in Advanced Human Carotid Plaque Proteins. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 339-344.
- [294] T. Delatour, P. A. Guy, R. H. Stadler, R. J. Turesky. 3-Nitrotyrosine Butyl Ester: A Novel Derivative to Assess Tyrosine Nitration in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Detection. *Anal. Biochem.* **2002**, *302*, 10-18.

- [295] H. Jiang, M. Balazy. Detection of 3-Nitrotyrosine in Human Platelets Exposed to Peroxynitrite by a New Gas Chromatography-Mass Spectrometry Assay. *Nitric Oxide* **1998**, *2*, 350-359.
- [296] D. Tsikas, K. Caidahl. Recent Methodological Advances in the Mass Spectrometric Analysis of Free and Protein-Associated 3-Nitrotyrosine in Human Plasma. *J. Chromatogr. B* **2005**, *814*, 1-9.
- [297] T. Franze. Untersuchungen zur Nitrierung von Proteinen durch atmosphärische Spurenstoffe. *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Umweltanalytik, Hydrochemie und Umweltanalytik, Technische Universität, **2000**.
- [298] M. Du, W. Wu, N. Ercal, Y. Ma. Simultaneous Determination of 3-Nitrotyrosine, *o*-, *m*-, and *p*-Tyrosine in Urine Samples by Liquid Chromatography-Ultraviolet Absorbance Detection with Pre-Column Cloud Point Extraction. *J. Chromatogr. B* **2004**, *803*, 321-329.
- [299] Y. Kamisaki, K. Wada, K. Nakamoto, Y. Kishimoto, M. Kitano, T. Itoh. Sensitive Determination of Nitrotyrosine in Human Plasma by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B* **1996**, *685*, 343-347.
- [300] N. Ishida, T. Hasegawa, K. Mukai, M. Watanabe, H. Nishino. Determination of Nitrotyrosine by HPLC-ECD and its Application. *J. Vet. Med. Sci.* **2002**, *64*, 401-404.
- [301] W. Maruyama, Y. Hashizume, K. Matsubara, M. Naoi. Identification of 3-Nitrotyrosine, a Product of Nitric Oxide and Superoxide, as an Indicator of Oxidative Stress in the Human Brain. *J. Chromatogr. B* **1996**, *676*, 153-158.
- [302] J. P. Gaut, J. Byun, H. D. Tran, J. W. Heinecke. Artifact-Free Quantification of Free 3-Chlorotyrosine, 3-Bromotyrosine, and 3-Nitrotyrosine in Human Plasma by Electron Capture-Negative Chemical Ionization Gas Chromatography Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2002**, *300*, 252-259.
- [303] T. Delatour. Performance of Quantitative Analyses by Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry: From External Calibration to Isotopomer-Based Exact Matching. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 515-523.
- [304] R. C. Dougherty. Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 625A-636A.
- [305] D. Tsikas, A. Mitschke, M. T. Suchy, F. M. Gutzki, D. O. Stichenoeth. Determination of 3-Nitrotyrosine in Human Urine at the Basal State by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Evaluation of the Excretion after Oral Intake. *J. Chromatogr. B* **2005**, *827*, 146-156.

- [306] J. R. Crowley, K. Yarasheski, C. Leeuwenburgh, J. Turk, J. W. Heinecke. Isotope Dilution Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine in Proteins and Tissues is Facilitated by Reduction to 3-Aminotyrosine. *Anal. Biochem.* **1998**, *259*, 127-135.
- [307] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlag, Weinheim, **1995**.
- [308] M. Strandh, H. S. Andersson, S. Ohlson. Weak Affinity Chromatography. *Methods in Molecular Biology - Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, Hrsg.: P. Bailon, G. K. Ehrlich, W. J. Fung, W. Berthold, 1. Auflage, Humana Press, Totowa, **2000**, 7-23.
- [309] M. L. Yarmush, K. P. Antonsen, S. Sundaram, D. M. Yarmush. Immunoabsorption: Strategies for Antigen Elution and Production of Reusable Adsorbents. *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 168 - 178.
- [310] M. G. Weller. Immunochromatographic Techniques - A Critical Review. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 635-645.
- [311] M. G. Weller. Immunochromatographische Kopplungen. *HPLC richtig optimiert - Ein Handbuch für Praktiker*, Hrsg.: S. Kromidas, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**, 529-548.
- [312] M. Nisnevitch, M. A. Firer. The Solid Phase in Affinity Chromatography: Strategies for Antibody Attachment. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 467-480.
- [313] R. L. Wimalasena, G. S. Wilson. Factors Affecting the Specific Activity of Immobilized Antibodies and their Biologically Active Fragments. *J. Chromatogr. A* **1991**, *572*, 85-102.
- [314] J. N. Lin, I. N. Chang, J. D. Andrade, J. N. Herron, D. A. Christensen. Comparison of Site-Specific Coupling Chemistry for Antibody Immobilization on Different Solid Supports. *J. Chromatogr. A* **1991**, *542*.
- [315] W. Clarke, J. D. Beckwith, A. Jackson, B. Reynolds, E. M. Karle, D. S. Hage. Antibody Immobilization to High-Performance Liquid Chromatography Supports - Characterization of Maximum Loading Capacity for Intact Immunoglobulin G and F(ab) Fragments. *J. Chromatogr. A* **2000**, *888*, 13-22.
- [316] M. R. Oates, W. Clarke, E. M. Marsh, D. S. Hage. Kinetic Studies on the Immobilization of Antibodies to High-Performance Liquid Chromatographic Supports. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 459-465.
- [317] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 625-636.
- [318] R. Arshady. Beaded Polymer Supports and Gels. I. Manufacturing Techniques. *J. Chromatogr. A* **1991**, *586*, 181-197.

- [319] R. Arshady. Beaded Polymer Supports and Gels. II. Physico-Chemical Criteria and Functionalization. *J. Chromatogr. A* **1991**, 586, 199-219.
- [320] J. M. Van Emon, C. L. Gerlach, K. Bowman. Bioseparation and Bioanalytical Techniques in Environmental Monitoring. *J. Chromatogr. B* **1998**, 715, 211-228.
- [321] A. Denizli, E. Piskin. DNA-Immobilized Polyhydroxyethylmethacrylate Microbeads for Affinity Sorption of Human Immunoglobulin G and Anti-DNA Antibodies. *J. Chromatogr. B* **1995**, 666, 215-222.
- [322] S. Ohlson, A. Lundblad, D. Zopf. Novel Approach to Affinity Chromatography Using "Weak" Monoclonal Antibodies. *Anal. Biochem.* **1988**, 169, 204-208.
- [323] S. Ohlson, M. Bergström, P. Pahlsson, A. Lundblad. Use of Monoclonal Antibodies for Weak Affinity Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, 758, 199-208.
- [324] S. Curry, P. Brick, N. P. Franks. Fatty Acid Binding to Human Serum Albumin: New Insights from Crystallographic Studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 131-140.
- [325] National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, **2006**, U.S. National Library of Medicine, Zugriffsjahr: 2006.
- [326] C. Hilger, F. Grigioni, C. De Beaufort, G. Michel, J. Freilinger, F. Hentges. Differential Binding of IgG and IgA Antibodies to Antigenic Determinants of Bovine Serum Albumin. *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, 123, 387-394.
- [327] T. Saeed, A. Salahuddin. Preparation and Characterization of Fragments from the N-Terminal End of Bovine Serum Albumin under Native Conditions. *Biochem. J.* **1993**, 296, 347-350.
- [328] R. Feng, Y. Konishi, A. W. Bell. High Accuracy Molecular Weight Determination and Variation Characterization of Proteins up to 80 ku by Ionspray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, 387-401.
- [329] R. R. Wilcox. *Fundamentals of Modern Statistical Methods: Substantially Improving Power and Accuracy*, Springer Verlag, New York, **2001**.
- [330] Y. Shimomura, M. Ito. Human Hair Keratin-Associated Proteins. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2005**, 10, 230-233.
- [331] S. Kromidas. *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1999**.
- [332] N. G. Kroll, H. M. Rawel, S. Rohn. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, 9, 205-218.
- [333] H. M. Rawel, S. Rohn, H. P. Kruse, J. Kroll. Structural Changes Induced in Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Chlorogenic Acid. *Food Chem.* **2002**, 78, 443-445.
- [334] M. Naczek, S. Grant, R. Zadernowski, E. Barre. Protein Precipitating Capacity of Phenolics of Wild Blueberry Leaves and Fruits. *Food Chem.* **2006**, 96, 640-647.

- [335] W. D. Loomis, J. D. Lile, R. P. Sandstrom, A. J. Burbott. Adsorbent Polystyrene as an Aid in Plant Enzyme Isolation. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1049-1054.
- [336] D. M. Smith, M. W. Montgomery. Improved Methods for the Extraction of Polyphenol Oxidase from d'Anjou Pears. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 901-904.
- [337] F. Cremer, C. Van de Walle. Method for Extraction of Proteins from Green Plant Tissues for Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **1985**, *147*, 22-26.
- [338] N. S. Isaacs, R. Van Eldik. A Mechanistic Study of the Reduction of Quinones by Ascorbic Acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 1465-1467.
- [339] C. Ringli, B. Keller, U. Ryser. Glycine-Rich Proteins as Structural Components of Plant Cell Walls. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *58*, 1430-1441.
- [340] R. Girault, I. His, C. Andeme-Onzighi, A. Driouich, C. Morvan. Identification and Partial Characterization of Proteins and Proteoglycans Encrusting the Secondary Cell Walls of Flax Fibres. *Planta* **2000**, *211*, 256-264.
- [341] G. I. Cassab. Plant Cell Wall Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 281-309.
- [342] C. Morvan, C. Andeme-Onzighi, R. Girault, D. S. Himmelsbach, A. Driouich, D. E. Akin. Building Flax Fibres: More than One Brick in the Walls. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*.
- [343] M. B. Hinman, J. A. Jones, R. V. Lewis. Synthetic Spider Silk: A Modular Fiber. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 374-379.
- [344] S. Banu, N. Honoré, B. Saint-Joanis, D. Philpott, M. C. Prévost, S. T. Cole. Are the PE-PGRS Proteins of *Mycobacterium Tuberculosis* Variable Surface Antigens? *Mol. Microbiol.* **2002**, *44*, 9-19.
- [345] M. J. Brennan, G. Delogu. The PE Multigene Family: A 'Molecular Mantra' for Mycobacteria. *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 246-249.
- [346] M. G. Weller. Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden. *Dissertation*, Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik, Technische Universität, **1992**.
- [347] S. Bhowmik. Nitrotyrosin-Analytik. *Abschlussbericht*, Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik, Technische Universität München, **2005**.
- [348] R. W. Giese. Nitrotyrosine Internal Standard for Amino Acid Analysis. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 588-592.
- [349] W. Gottwald. *Statistik für Anwender*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2000**.