

Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

1. Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.

2. Technische Universität München, Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **16203 N**

Entwicklung direkt gekoppelter massenspektrometrischer Verfahren zur schnellen Erfassung der biologischen Aktivität von Hausstaub

(Bewilligungszeitraum: 01.09.2009 – 31.12.2011)

der AiF-Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

Duisburg, den 24.4.2012

Dr. Thorsten Teutenberg

Freising, den 18.04.2012

PD Dr. Thomas Letzel

Ort, Datum

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	14
2	Wissenschaftlich technische Ergebnisse	15
2.1	Einleitung	15
2.2	Aufbau der (Kapillar-)HPLC-MS-Kopplung	18
2.3	Extraktion und Aufarbeitung von Hausstaubproben	19
2.3.1	Universelles Extraktionsverfahren	19
2.3.2	Membranunterstützte Aufreinigung (AMAC)	20
2.4	Entwicklung von Mikroextraktionsverfahren zur Probenvorbereitung der Hausstaubextrakte	21
2.4.1	Disposable Pipette Extraction	21
2.4.1.1	Aufarbeitung mittels DPX-Q	23
2.4.1.2	Aufarbeitung mittels DPX-RP	25
2.4.1.3	Übertragung der Methoden auf LC-MS	29
2.5	Entwicklung chromatografischer Methoden	32
2.5.1	Nutzbarer Temperaturbereich	32
2.5.2	Auswahl der Testsubstanzen	32
2.5.3	Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung	34
2.5.4	Simulation der Retentionsdaten	39
2.5.5	Korrelation der simulierten Retentionsdaten mit dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	41
2.5.6	Evaluierung der simulierten Methoden	43
2.5.6.1	Semipolare und unpolare Marker	43
2.5.6.2	Mykotoxine	45
2.5.7	Zusammenfassung	47
2.6	Modifizierung und Evaluierung der Robotereinheit (Advion) zur massenspektrometrischen Untersuchung von enzymatischen Aktivitäten	49
2.6.1	Allgemeiner Ablauf enzymatischer Reaktionen	49
2.6.2	Verschiedene Modifikationen der Robotereinheit	53
2.6.2.1	Setup 1: Infusion	53
2.6.2.2	Setup 2: Flow control	57
2.6.2.3	Setup 3: LC-Coupling	58
2.6.3	Optimierung und Etablierung von Enzym-Assays	61
2.7	Validierung der Robotereinheit (Advion) zur simultanen Erfassung parallel ablaufender enzymatischer Reaktionen	65
2.8	Evaluierung des kontinuierlichen Mischsystems	69
2.9	Optimierung des kontinuierlichen Mischsystems	72
2.9.1	Vorlage der Enzym- und Substratmischung in den Superloops	73
2.9.2	Reaktionskapillaren zur Durchmischung von Lösungen	73
2.9.3	Zwischenfazit	75
2.10	Untersuchung von Hausstaub	76
2.10.1	Enzymatische Aktivität	76
2.10.2	Enzymatische Regulatoren	76
2.11	Untersuchung von Hausstaub auf enthaltene enzymatische Regulatoren mit dem HT-KM-MS-System	78
2.11.1	Auswahl der Säule	78
2.11.2	Chromatografische Trennung	80

2.11.3	Anpassung von Enzym- und Substratkonzentrationen	80
2.11.4	Einfluss des pH-Werts auf die Chromatografie	80
2.11.5	Anpassung der Flüsse	82
2.12	Ergebnisse des Screenings von Hausstaubextrakten auf regulatorische Aktivität	83
2.12.1	Acetylcholinesterase-Assay	83
2.12.2	Chitinase-Assay	89
2.13	Projektbegleitende Programmierung von Software zur automatischen Erkennung und Auswertung enzymatischer Funktionen	91
3	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Abgrenzung zum Anschlussantrag	96
3.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrags	96
3.1.1	Entwicklung eines Reaktions-Chips	96
3.1.2	Übertragung des Verfahrens auf Lebensmitteltechnik	97
3.1.3	Chromatografische Methodenentwicklung und Mikrofluidik	98
3.1.4	Fazit	98
3.2	Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihren innovativen Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten	99
3.2.1	Mikrosystemtechnik	99
3.2.2	Analysen-, Bio- und Labortechnik	100
3.3	Zusammenstellung aller Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen	100
3.4	Angaben über gewerbliche Schutzrechte, sofern sie erworben wurden, oder ihre Anmeldung beabsichtigt ist	101
3.5	Einschätzung der Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und ggf. aktualisierten Transferkonzepts	101
4	Anhang	105
4.1	Material und Methoden	105
5	Projektbearbeiter und Autoren des Abschlussberichts	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Mischsystems.	17
Abbildung 2-2:	Aufarbeitung von Hausstaubproben zum Nachweis von Mykotoxinen: 1. Einwaage, 2. Nach der Extraktion mit 16/84 Wasser/Methanol (v/v) im Ultraschallbad, 3. Mikrofiltration des Überstands.	20
Abbildung 2-3:	Allgemeine Vorgehensweise bei der manuellen DPX-Probenaufarbeitung .	22
Abbildung 2-4:	DPX-Q-Spitze vor (links) und nach (rechts) der Extraktion. Weitere Erläuterungen: siehe Text.	24
Abbildung 2-5:	Chromatogramm einer Hausstaubprobe; Aufarbeitung: fest-flüssig Extraktion mit 100% Methanol. Chromatografische Bedingungen: Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, ab 30 min isokratisch, mobile Phase: Wasser/Acetonitril, pH 4 mit Essigsäure, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ , Temperatur: 40 °C, Detektion: ELSD.	26
Abbildung 2-6:	Chromatogramm einer Hausstaubprobe; Aufarbeitung: fest-flüssig Extraktion mit 100% Acetonitril. Chromatografische Bedingungen: Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, ab 30 min isokratisch, mobile Phase: Wasser/Acetonitril, pH 4 mit Essigsäure, stationäre Phase: Zirchrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ , Temperatur: 40 °C, Detektion: ELSD.	26
Abbildung 2-7:	Schema der Vorgehensweise bei der sequentiellen Elution eines Hausstaubextrakts mittels DPX.	27
Abbildung 2-8:	Chromatogramme der 20%,40%, 60%, 80% und 100%igen Acetonitril-Fraktion (von oben nach unten). Chromatografische Bedingungen: Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, mobile Phase: Wasser/Methanol, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ , Temperatur: 40 °C, Detektion: UV bei 254 nm.	28
Abbildung 2-9:	EIC der 1. Fraktion mit 80/20 Wasser/Acetonitril. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser/Methanol + 0,1% Ameisensäure, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,3 mL min ⁻¹ , Detektion: ESI positiv.	30
Abbildung 2-10:	EIC der 2. Fraktion mit 60/40 Wasser/Acetonitril, Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser/Methanol + 0,1% Ameisensäure, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,3 mL min ⁻¹ , Detektion: ESI positiv.	31
Abbildung 2-11:	EIC der 3. Fraktion mit 100% Acetonitril, Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser/Methanol + 0,1% Ameisensäure, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, Stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,3 mL min ⁻¹ , Detektion: ESI positiv.	31

- Abbildung 2-12: Trennung ausgewählter Steroide mit reinem Wasser als mobiler Phase auf einer Waters XBridge C8 Säule (3,0 x 50 mm, 3,5 μm). Chromatografische Bedingungen: Temperaturgradient von 180 °C auf 200 °C in 10 Minuten; Flussrate: 1,5 mL min^{-1} ; Elutionsreihenfolge: 1) 19-Nortestosteron, 2) trans-dehydroandrosteron, 3) Testosteron, 4) Epitestosteron, 5) Etiocholan, 6) 5 α -Androstan, 7) cis-Androsteron, Detektion: UV bei 254 nm. 33
- Abbildung 2-13: Vergleich zweier Säulentestchromatogramme. Chromatografische Bedingungen: Temperatur: 30 °C, stationäre Phase: Waters XBridge C8, mobile Phase: Wasser/Acetonitril + 0,1% Ameisensäure 65/35 (v/v), Flussrate: 0,5 mL min^{-1} , isokratisch, Detektion: UV bei 254 nm. 34
- Abbildung 2-14: Basismessung 5. Trennung der Analyten aus Gruppe I mit Wasser und Tetrahydrofuran als mobiler Phase auf einer ZirChrom-PBD-Säule (150 x 2,1 mm, 3 μm). Chromatografische Bedingungen: Temperatur: 120 °C, Flussrate: 0,4 mL min^{-1} , Lösungsmittelgradient von 2 auf 100% B in 10 min (A) und in 30 min (B), Detektion: UV bei 254 nm. 39
- Abbildung 2-15: LogP in Abhängigkeit des Retentionsfaktors für berechnete logk Werte der mittels HPLC-UV-Detektion bestimmten Substanzen bei 0-20% B in 60 min und einer Temperatur von 120 °C. 42
- Abbildung 2-16: LogP in Abhängigkeit des Retentionsfaktors für berechnete logk Werte der mittels HPLC-MS-Detektion bestimmten Substanzen bei 0-20% B in 60 min und einer Temperatur von 120 °C. 42
- Abbildung 2-17: UV-Chromatogramm der Evaluierungsmessung mit Methanol, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 3 μm ; Lösungsmittelgradient: 0-20% B in 60 min, Detektion: UV bei 254 nm. 45
- Abbildung 2-18: Schematische Darstellung einer Enzymreaktion (a) und Messung von Substrat- und Produktpuren in Echtzeit mittels Massenspektrometrie (b). E: Enzym; S: Substrat. 50
- Abbildung 2-19: Schematischer Aufbau und Messung von Enzymreaktionen mittels Spritzenpumpe und Robotereinheit. 51
- Abbildung 2-20: Verlauf des nanoESI-Elektrosprays einer wässrigen Probelösung über eine Messzeit von 30 Minuten: (a) stabiler und (b) instabiler Sprayverlauf. 53
- Abbildung 2-21: Messung eines Enzym-Assays mit dem "Infusion"-Setup im Robotiersystem mit den einzelnen Pipettierschritten. Schritt 5 zeigt die Bildung des Nanoelektrosprays mit dem ESI-Chip. 54
- Abbildung 2-22: Messung eines Enzym-Assays im Infusionsmodus im Robotiersystem. Dargestellt sind die abnehmende Substratspur und zwei zunehmende Produktpuren. Signaleinbrüche durch Blockierung der Kanäle werden durch einen Strom am Chip (oben) und die Substrat- und Produktpuren massenspektrometrisch (unten) detektiert. Bei Signalabbruch wechselt die Robotereinheit automatisch den Kanal. 55
- Abbildung 2-23: Vergleich eines Enzym-Assays gemessen mit (a) Spritzenpumpe und (b), (c) mit verschiedenen Konzentrationen im Infusionsmodus mit Robotereinheit. 56
- Abbildung 2-24: Messung eines Enzym-Assays mit der Robotereinheit im Flow-Control-Modus. Der am Chip gemessene Strom (oben) und die massenspektrometrisch detektierten Substrat- und Produktpuren

	(unten) zeigen einen konstanten Verlauf (dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 Messungen).	57
Abbildung 2-25:	Schematischer Aufbau des Setups für LC-Kopplung im Robotiersystem mit den zwei verschiedenen Schaltpositionen des Ventils. In Position 1 erfolgen die Pipettier- und Mischschritte, in Position 2 erfolgt die Messung der Enzymlösung.	59
Abbildung 2-26:	Verlauf eines Enzym-Assays mit dem LC-Coupling Setup im Robotiersystem.	60
Abbildung 2-27:	Messung des Assays mit Chymotrypsin und einem Substrat mit chromophorer Gruppe am Photometer. Die Abbildung zeigt die zunehmende Produktpur bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen in der Enzymeinheit Unit mL ⁻¹ .	63
Abbildung 2-28:	Optimierte Enzym-Assays mit den Enzymen Lysozym, Chitinase, Chymotrypsin, Acetylcholinesterase, Neutrophilen-Elastase und Pankreas-Elastase für die Messung mittels Massenspektrometrie.	64
Abbildung 2-29:	Multiplexing von zwei Enzym-Assays. Verlauf der Substratspur des Neutrophilen-Elastase-Assays im Kontroll-Assay und unter Zusatz des (a) Chitinase-Assays und (b) Pankreas-Elastase-Assays.	67
Abbildung 2-30:	(a) Reaktionsverlauf eines Enzym-Assays mit dem Enzym Neutrophilen-Elastase und einem Substrat ohne Zusatz von Lösungsmittel. (b-f) Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Neutrophilen-Elastase bei Zusatz von verschiedenen Lösungsmitteln im Vergleich zum Ansatz ohne Lösungsmittel.	70
Abbildung 2-31:	Verbleibende Enzymaktivität der Enzyme Chitinase (Chi), Neutrophilen-Elastase (NE), Chymotrypsin (Chy) und Acetylcholinesterase (AChE) im Multiplexing-Ansatz mit allen vier Assays und unter Zusatz von 10% eines organischen Lösungsmittels.	72
Abbildung 2-32:	Vorlagegefäß „Superloop“ zur Bereitstellung von Enzym- oder Substratlösung im kontinuierlichen Mischsystem. Die Lösungen werden mittels HPLC-Pumpen gefördert.	73
Abbildung 2-33:	(a) Tubings und Mischstück im kontinuierlichen Mischsystem zur Durchmischung der Enzymlösung mit dem Substrat und Eluat und (b) Reaktionskapillare, stark verknotet, um eine turbulente Strömung zu erzeugen und eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten.	74
Abbildung 2-34:	Verlauf der Signalintensitäten von internem Standard (Histidin), Substrat (Peptid) und Produkt (Peptid) innerhalb eines Tages im kontinuierlichen Mischsystem.	75
Abbildung 2-35:	Extrahiertes Ionenchromatogramm von Roridin A mit vorherigem Fluss über stationäre Phase: ZirChrom-PBD 100 x 0,3 mm, 3 µm, mobile Phase: Ammoniumacetatpuffer 10 mM, pH 7,4; Flussrate: 10 µL min ⁻¹ .	79
Abbildung 2-36:	Extrahiertes Ionenchromatogramm von Roridin A mit vorherigem Fluss über stationäre Phase: ZirChrom-PBD 100 x 1 mm, 3 µm, mobile Phase: Ammoniumacetatpuffer 10 mM, pH 7,4; Flussrate: 10 µL min ⁻¹ .	79
Abbildung 2-37:	Massenspektrometrische Detektion des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System. Bei t=0 erfolgte die Injektion einer 20%igen methanolischen Lösung über die ZirChrom-PBD-Säule (100 x 1,0 mm, 3 µm). Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer	

- detektieren Signale für das Substrat Acetylcholin und das Produkt Cholin über die gesamte Messzeit von 30 Minuten. 84
- Abbildung 2-38: Massenspektrometrische Detektion des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System. Bei $t=0$ erfolgte die Injektion von $50 \mu\text{M}$ des Inhibitors Galanthamin über die ZirChrom-PBD-Säule ($100 \times 1,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$). Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektieren Signale für das Substrat Acetylcholin, das Produkt Cholin und den Inhibitor Galanthamin. (a) zeigt alle Signale über die gesamte Messzeit von 30 Minuten, (b) zeigt einen Ausschnitt mit Fokus auf die abnehmende Produktpur im Bereich des Inhibitors. 85
- Abbildung 2-39: Massenspektrometrische Detektion des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System. Bei $t=0$ erfolgte die Injektion des Hausstaubextrakts „B10“ mit (a) Zusatz von $50 \mu\text{M}$ Inhibitor Galanthamin und (b) ohne Zusatz von Galanthamin. Die Injektion erfolgte über die ZirChrom-PBD-Säule ($100 \times 1,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$). Die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse von deutlich erkennbaren Signalen sind exemplarisch dargestellt. 86
- Abbildung 2-40: (a) Messung wie in Abbildung 2-39 oben und (b) Messung wie in Abbildung 2-39 unten dargestellt. Hier wurden die Daten nach FFT-Glättung mit der Grenzfrequenz $0,59 \text{ Hz}$ geglättet. Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektieren Signale für das Substrat Acetylcholin (rot), das Produkt Cholin (blau) und den Inhibitor Galanthamin (schwarz). Zusätzlich in (b) exemplarisch aufgeführt sind aus dem Hausstaubextrakt stammende unbekannte Signale mit $m/z = 365$ (grün), $m/z = 324$ (hellblau), $m/z = 425$ (gelb) und $m/z = 447$ (violett). Die linke Achse zeigt die Signalintensität für die Substrat- und Produktpur, die rechte Achse zeigt die Intensität für die Galanthaminspur und die unbekanntene Signale. 88
- Abbildung 2-41: Massenspektrometrische Detektion des Chitinase-Assays im HT-KM-MS-System. (a) Bei $t=0$ erfolgte die Injektion einer 20%igen methanolischen Lösung, bei (b) die Injektion des potenziellen Inhibitors $(\text{GlcNAc})_3$ mit $750 \mu\text{M}$ und bei (c) die Injektion des Staubextrakts „B10“ über die ZirChrom-PBD-Säule ($100 \times 1,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$). Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektieren Signale für das Substrat $(\text{GlcNAc})_6$, das Produkt 1 $(\text{GlcNAc})_2$, Produkt 2 $(\text{GlcNAc})_3$ und Produkt 3 $(\text{GlcNAc})_4$. Exemplarisch in (c) aufgeführt sind aus dem Hausstaubextrakt stammende unbekannte Signale mit $m/z = 365$, $m/z=347$, $m/z = 442$ und $m/z = 384$. 90
- Abbildung 2-42: Benutzeroberfläche der Software Achroma. (a) Laden der Daten, (b) Darstellung von extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC), (c) Glättung der Daten, (c, d, e) Erkennung und Berechnung der Fläche von positiven und negativen Signalen und (f) Vergleich von zwei Spektren. 92
- Abbildung 2-43: Darstellung von extrahierten Ionenchromatogrammen mit der Achroma Software. Abgebildet ist die Produktpur im Masse-zu-Ladungsbereich von $m/z = 104$ bis $m/z = 105$ des Acetylcholinesterase-Assays im kontinuierlichen Mischsystem. 93

- Abbildung 2-44: Bildung eines Differenzspektrums aus dem extrahierten Ionenchromatogramm zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Software Achroma. 94
- Abbildung 2-45: Vergleich von zwei extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC) mit der Achroma Software. (a) Quotient aus dem EIC der Produktpur (b) und des internen Standards (c). 95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Für die sequentielle Elution verwendete Markersubstanzen; Säule: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Eluent: A: Wasser+20 mmol L ⁻¹ Ammoniumformiat-Puffer pH 2, B: Methanol + 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumformiat-Puffer; Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, Flussrate: 0,3 mL min ⁻¹ , Detektion: ESI-MS, positiv, MRM.	30
Tabelle 2-2:	Ausgewählte Markersubstanzen, die für die Methodenentwicklung verwendet und mittels UV- bzw. massenspektrometrischer Detektion gemessen wurden. Zugeordnet sind die entsprechenden Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P).	36
Tabelle 2-3:	Parameter der Basismessungen für die Methodenentwicklung mittels UV-Detektion.	37
Tabelle 2-4:	Parameter der Basismessungen für die Methodenentwicklung mittels HPLC-MS-Detektion.	38
Tabelle 2-5:	Berechnete Retentionsfaktoren k für die Simulation eines Lösungsmittelgradienten von 0-20% B in 60 min auf Grundlage der Daten der Basismessungen mittels HPLC-UV-Detektion. Stationäre Phase A: Waters XBridge C18 50 x 3,0 mm, 2,5 µm; Stationäre Phase B: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 3 µm, Temperatur: 120 °C.	40
Tabelle 2-6:	Berechnete Retentionsfaktoren k für die Simulation eines Gradienten von 0-20% B in 60 min auf Grundlage der Daten der Basismessungen mittels HPLC-MS-Detektion, Temperatur: 120 °C.	40
Tabelle 2-7:	Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Retentionsfaktoren für die mittels HPLC-UV-Detektion ausgewählten Substanzen, Lösungsmittelgradient: 0-20% B in 60 Minuten.	44
Tabelle 2-8:	Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Retentionsfaktoren für die Mykotoxine mittels HPLC-MS-Detektion.	46
Tabelle 2-9:	Gegenüberstellung der massenpektrometrischen Messung von Enzymreaktionen mit Spritzenpumpe und mit der Robotiereinheit „Nanomate“.	52
Tabelle 2-10:	Übersicht und Vergleich aller vier Setups für die Messung von Enzymreaktionen mit dem Robotiersystem.	61
Tabelle 2-11:	Gegenüberstellung der erforderlichen Parameter bei der Messung von Enzymreaktionen mittels Photometrie und Massenspektrometrie.	62
Tabelle 2-12:	Mögliche beeinflussende Faktoren beim Multiplexing von zwei Enzym-Assays.	66
Tabelle 2-13:	Mögliche Kombinationen von zwei Enzym-Assays und deren Kompatibilität. Kombinationen mit einer Umsatzrate ≥ 50% im Vergleich zum Kontroll-Assay sind grün und Kombinationen mit einer Umsatzrate < 50% im Vergleich zum Kontroll-Assay sind rot unterlegt.	68
Tabelle 2-14:	Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf den Substratabbau der Enzym-Assays. Assays mit einer Substrat-Umsatzrate ≥ 50% im Vergleich zum Kontroll-Assay sind grün und Kombinationen mit einer Umsatzrate < 50% im Vergleich zum Kontroll-Assay sind rot unterlegt.	71

Tabelle 2-15:	Übersicht über die relevanten Enzymklassen mit Beispielen für das System Hausstaub.	77
Tabelle 2-16:	Retentionszeiten ausgewählter Analyten in Abhängigkeit des pH-Werts. Mobile Phase: Wasser/Methanol, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,3 mL min ⁻¹ , Temperatur: 40 °C, Detektion: ESI positiv	82
Tabelle 3-1:	Aktualisierter und fortgeschriebener Plan zum Transfer der Ergebnisse in die industrielle Praxis.	101
Tabelle 4-1:	Verwendete Chemikalien.	105
Tabelle 4-2:	<i>m/z</i> der verwendeten Analyten.	107
Tabelle 4-3:	Verwendete Geräte.	107
Tabelle 4-4:	Ausgewählte Analyten und die verwendeten Konzentrationen in der Probenaufarbeitung.	107

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
AMAC	accelerated membrane-assisted clean-up (beschleunigte membranunterstützte Aufreinigung)
BaA	Benz[a]anthracen
BaP	Benzo[a]pyren
BBP	Benzylbutylphthalat
Chi	Chitinase
Chy	α -Chymotrypsin
DEHP	Diethylhexylphthalat
DEP	Diethylphthalat
d. h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung
DPX	Disposable Pipette Extraction
DPX-RP	Disposable Pipette Extraction Reversed-Phase (DPX mit Co-Polymer Umkehrphase)
EIC	Extracted Ion Chromatogram (extrahiertes Ionenchromatogramm)
ELSD	Evaporative Light Scattering Detection (Verdampfungslichtstreu-Detektion)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
et al.	et alia
EtOH	Ethanol
FFT	Fast Fourier Transformation
g	Gramm
GC	Gas chromatography (Gaschromatografie)
GCB	graphitized carbon black (graphitisierter Kohlenstoff)
(GlcNAc)	N-Acetylglucosamin
HT-HPLC	High-temperature high performance liquid chromatography (Hochtemperatur Flüssigkeitschromatografie)
HT-KM-MS	Hochtemperatur-HPLC gekoppelt mit dem kontinuierlichen Mischsystem und Massenspektrometer
Hz	Hertz

IPA	2-Propanol
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik
KRdL	Kommission Reinhaltung der Luft
L	Liter
LC	Liquid chromatography (Flüssigkeitschromatografie)
logP	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (auch logP _{ow})
LSS	Linear Solvent Strength
mg	Milligramm
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	millimolar
µM	mikromolar
mmol	Millimol
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MeOH	Methanol
MEPS	Micro Extraction by Packed Sorbents
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer (mass spectrometry, mass spectrometer)
NE	Neutrophilen-Elastase
ng	Nanogramm
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
PBD	Polybutadiene (Polybutadien)
PE	Pankreas-Elastase oder Polyethylen
pH	potentium hydrogenii
POM	particulate organic matter
PSA	primary and secondary amine exchange material
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
SBS	Sick Building Syndrome
SPE	solid phase extraction
SVOC	semi volatile organic compounds
T	Temperatur

TOF	Time-of-flight
TUM	Technische Universität München
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
v. a.	vor allem
VOC	Volatile organic compounds
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde ein analytisches Verfahren auf Grundlage der direkt gekoppelten Hochtemperatur-HPLC mit einem enzymatischen Assay zur Analyse von Hausstaubproben entwickelt. Hauptbestandteile dieses Verfahrens sind die Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatografie, das kontinuierliche Mischsystem, welches den Enzym-Assay beinhaltet, sowie eine massenspektrometrische Detektionseinheit.

Es erfolgte zunächst die Entwicklung der chromatografischen Methoden zur Trennung eines Hausstaubextrakts sowie die Bestimmung der allgemeinen Grenzen des Verfahrens mittels Hochtemperatur-HPLC. Dazu wurden Markersubstanzen mit unterschiedlichen Polaritäten ausgewählt. Durch die Auswahl von Substanzen verschiedener Polaritäten, wie beispielsweise den polaren Mykotoxinen mit einem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) unter 1 und dem unpolaren Ergosterin ($\log P = 8,86$), sollte die Matrix Hausstaub für die Methodenentwicklung mittels Simulationssoftware dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass für die Analyse komplexer Proben eine stationäre Phase auf Basis eines beschichteten Metalloxids für die gleichzeitige Analyse sowohl polarer als auch unpolarer Bestandteile am geeignetsten ist. Diese stationäre Phase zeichnet sich durch eine ausreichende Temperaturstabilität und eine geringere Hydrophobizität als eine Hybridphase auf Basis von Silikagel aus. In Bezug auf die Auswahl geeigneter Lösungsmittelsysteme sollte eine mobile Phase aus Wasser und Isopropanol verwendet werden, wenn die Elution unpolarer Komponenten im Vordergrund steht. Hinsichtlich der Kopplung mit dem Enzymsystem stellte sich jedoch heraus, dass die Verwendung von Wasser-Methanol-Gemischen die beste Kompatibilität aufweist.

Parallel hierzu wurden Enzymassays mit kommerziell erhältlichen Enzymen etabliert und optimiert. Dabei standen Enzyme, die durch im Hausstaub enthaltene Moleküle beeinflusst werden, im Vordergrund der Untersuchungen. Die einzelnen Enzymreaktionen wurden mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) online verfolgt. Nach Festlegung der endgültigen Enzymmodelle sowie des finalen Analysenaufbaus (Hochtemperatur-Chromatografie, kontinuierliches Mischsystem und Massenspektrometer) wurde der Hausstaub auf enthaltene regulativ wirkende Substanzen untersucht. Unterschiedliche Hausstaubproben ergaben dabei keine erkennbare Inhibierung der ausgewählten Enzymsysteme.

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.

2 Wissenschaftlich technische Ergebnisse

2.1 Einleitung

Im Rahmen des IGF-Forschungsvorhabens 16203 N sollte ein analytisches Verfahren entwickelt werden, mit dessen Hilfe Moleküle und deren enzymregulierende Eigenschaften in Hausstaubextrakten erkannt werden können.

Aktuelle Studien zum Sick Building Syndrom (SBS) zeigen, dass eine Verbindung sowohl zu persönlichen, aber insbesondere auch zu umweltbedingten Risikofaktoren besteht¹. Die Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftwechselrate sowie Gebäudefeuchtigkeit in Verbindung mit dem Vorkommen von Schimmelpilzen bilden Größen, die das Auftreten von SBS beeinflussen. Die Exposition in Innenräumen gegenüber verschiedenen Chemikalien wird ebenfalls als ein bedeutender Risikofaktor für SBS genannt.

Bei den Innenraumchemikalien kann aufgrund ihres Dampfdrucks zwischen flüchtigen organischen Verbindungen (engl. volatile organic compounds, VOC), semi volatile organic compounds (SVOC) und partikulär gebundenen organischen Verbindungen (particulate organic matter, POM) unterschieden werden. Insbesondere SVOC und POM sind im Innenraum staubgebunden und somit den üblichen Raumlufuntersuchungen mittels Adsorbentien kaum zugänglich². Durch die Untersuchung von gesammeltem Innenraumstaub können die Inhaltsstoffe dieses Passivsammlers nachgewiesen werden^{3,4}.

Bisherige analytische Verfahren zur Untersuchung von Hausstaub basieren häufig auf der selektiven Extraktion von bestimmten Substanzgruppen, die gegebenenfalls durch weitere Aufreinigung und Derivatisierung einer chromatografischen Targetanalyse zugänglich gemacht werden. Hierbei ist entscheidend, dass die gesamte analytische Methode das Ziel

¹ Norback, D. (2009). An update on sick building syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, 55-59.

² Salthammer, T., and Bahadir, M. (2009). Occurrence, Dynamics and Reactions of Organic Pollutants in the Indoor Environment. *Clean-Soil Air Water* 37, 417-435.

³ Butte, W., and Heinzow, B. (2002). Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 175, Volume 175. (New York: Springer-Verlag), pp. 1-46.

⁴ Portner, C. (2012). Entwicklung flüssigkeitschromatographisch massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub. In *Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften*. (Carl von Ossietzky Universität Oldenburg), p. 155.

verfolgt, bekannte Analyten quantitativ zu untersuchen⁵. Methoden zur Einschätzung von adversen Effekten durch Innenraumschadstoffe bestehen in der Verwendung von biologischen Testsystemen. Hier besteht z. B. die Möglichkeit, den gentoxischen Effekt eines Hausstaubs als Summenparameter zu bestimmen. Ein Nachteil dieser Verfahren stellt die daraus resultierende substanzunspezifische Information dar.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Verfahren zur Targetanalytik in Umweltmatrizes und den summenparametrischen Verfahren wurde in diesem Vorhaben die Absicht verfolgt, beide Vorteile zu vereinen und sowohl substanzspezifische Informationen durch eine chromatografische Trennung zu erhalten als auch die enzymatisch regulatorische Aktivität der chromatografisch getrennten Substanzen in Form ihrer enzymhemmenden Wirkung zu ermitteln.

Mit dieser Methodik besteht die Möglichkeit, weitere Effekte zu untersuchen, die z. B. SBS auslösen könnten. Da im Dienstleistungssektor das Mitarbeitergehalt einen großen Kostenfaktor darstellt, können Investitionen in die Innenraumhygiene schon durch geringe Produktivitätssteigerungen profitabel sein⁶.

Das Verfahren basiert auf der Grundlage der direkt gekoppelten Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatografie (HT-HPLC) mit einem enzymatischen Assay. Als grundlegender Ansatz wird ein von de Boer et al. entwickeltes Verfahren herangezogen, wobei komplexe Gemische mittels HPLC getrennt und online einem Enzym-Assay zugänglich gemacht werden⁷.

In diesem Projekt erfolgte zunächst die Entwicklung der chromatografischen Methoden zur Trennung eines Hausstaubextrakts mittels Hochtemperatur-HPLC anhand von Markersubstanzen mit unterschiedlichen Polaritäten. Parallel hierzu wurden Enzym-Assays mit kommerziell erhältlichen Enzymen (wie Proteasen, Glycosidasen, Esterasen etc.) etabliert und optimiert.

⁵ Salthammer, T., and Uhde, E. (2009). *Organic Indoor Air Pollutants* (2nd Edition), 2 Edition, (Weinheim: WILEY-VCH).

⁶ Norback, D. (2009). An update on sick building syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9, 55-59.

⁷ de Boer, A.R., Alcaide-Hidalgo, J.M., Krabbe, J.G., Kolkman, J., Boas, C.N.V., Niessen, W.M.A., Lingeman, H., and Irth, H. (2005). High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Anal. Chem.* 77, 7894-7900.

Dabei wurden sowohl in Hausstaub vorkommende Enzyme als auch solche, die durch im Hausstaub enthaltene Moleküle beeinflusst werden, betrachtet. Die einzelnen Enzymreaktionen wurden mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) online verfolgt⁸. Nach Festlegung der endgültigen Enzymmodelle sowie des finalen Analysenaufbaus (Hochtemperatur-Chromatografie, kontinuierliches Mischsystem und Massenspektrometer) erfolgte die Untersuchung des Hausstaubs auf enthaltene regulativ wirkende Substanzen. Der Aufbau dieses kontinuierlichen Mischsystems ist in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt.

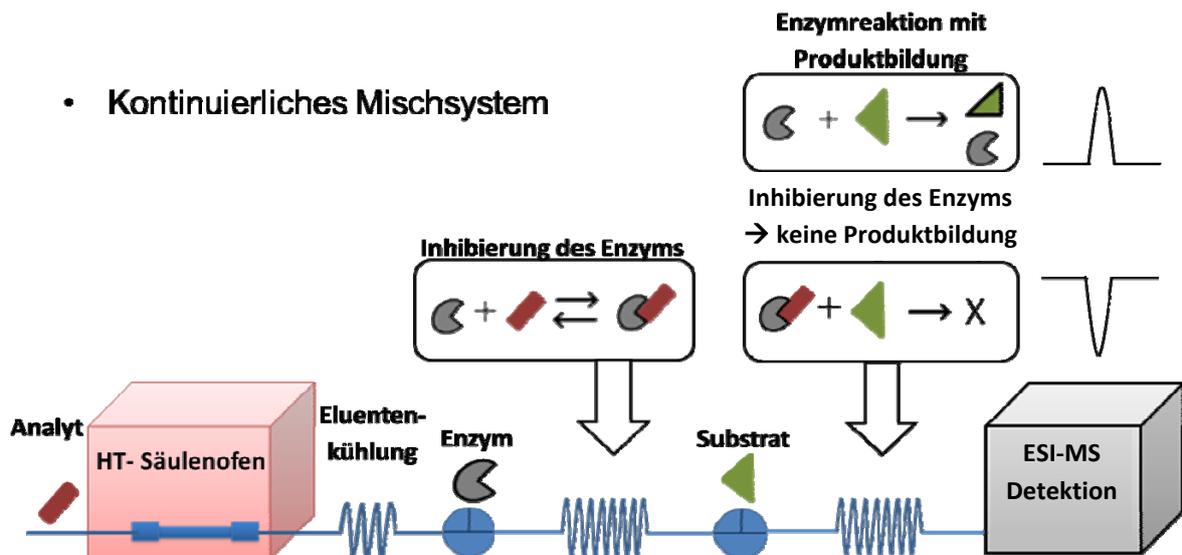


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Mischsystems.

Die Forschungsbereiche sind auf die beiden Projektpartner Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA) und Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München (TUM) nach den jeweiligen Fachkompetenzen aufgeteilt.

⁸Letzel, T. (2008). Real-time mass spectrometry in enzymology. Anal Bioanal Chem 390, 257-261.

2.2 Aufbau der (Kapillar-)HPLC-MS-Kopplung

Zu Beginn des Projekts erfolgte der Aufbau der Kapillar-HPLC-MS-Kopplung. Hierzu wurde ein Kapillar-HPLC-System mit einem Time-of-Flight-Massenspektrometer (ToF-MS) gekoppelt. Im weiteren Projektverlauf musste jedoch von diesem ursprünglich geplanten Versuchsaufbau abgewichen werden, da die Kopplung der Systemkomponenten es erforderlich machte, Säulen mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm zu verwenden. Der Grund hierfür lag u. a. darin, dass bei einer Reduzierung des Säuleninnendurchmessers auf 300 µm auch alle weiteren Totvolumina im System verringert werden müssen, um die Bandenverbreiterung zu minimieren. Vor diesem Hintergrund wurde der instrumentelle Aufbau der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie jeweils für die Aufgabenstellung der zu bearbeitenden Problemstellung angepasst. Für die Entwicklung von HT-HPLC Methoden konnte deshalb auf ein konventionelles Heizsystem sowie auf ein konventionelles HPLC-System mit UV-Detektion zurückgegriffen werden (siehe Kapitel 2.5). Darüber hinaus kam ein Lichtstreuendetektor zum Einsatz, um die Matrix der komplexen Hausstaubproben für die Entwicklung von Probenaufarbeitungsmethoden sichtbar zu machen (Kapitel 2.4). Auch die Kopplung von HT-HPLC und einem Hybridmassenspektrometer erwies sich von Vorteil, um Matrixkomponenten von potenziellen Inhibitoren unterscheiden zu können und Analyten für die Methodenentwicklung eindeutig zu identifizieren. Deshalb wurden verschiedene Versuchsaufbauten für die Methodenentwicklung und die Messungen mittels Online-System verwendet. Alle weiteren Daten zu den jeweiligen Versuchsaufbauten und Geräten finden sich im Anhang (Kapitel 4.1).

2.3 Extraktion und Aufarbeitung von Hausstaubproben

2.3.1 Universelles Extraktionsverfahren

Aus der Literatur⁹ ist bekannt, dass Hausstaub eine Passivsammlerfunktion für viele Innenraumschadstoffe besitzt. So wurde u. a. bereits die Anreicherung von Holzschutzmitteln erfolgreich nachgewiesen. In ähnlicher Weise können mittel- und schwerflüchtige Substanzen akkumulieren, weshalb Hausstaub potenziell einen idealen Indikator für eine Innenraumkontamination mit Schadstoffen darstellt. Die Probenahme erfolgt nach den Empfehlungen der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN-Normenausschuss in der Regel mittels Staubsauger. Generell ist hierbei zu beachten, dass der Staubsaugerbeutel mindestens halb gefüllt sein muss, um eine repräsentative Probe zu erhalten. Ohne die Filterwirkung des gesammelten Staubs ist die Rückhaltung der Feinstaubfraktion < 10 µm nicht hoch genug^{10,11}.

Um eine repräsentative, homogene Probe zu erhalten, wird der gesamte Staubsaugerbeutelinhalt in Anlehnung an DIN 66165-2 und VDI 4300-8 von Hand gesiebt. Die Siebung erfolgt in zwei Schritten, zuerst mit einem 2 mm und anschließend mit einem 63 µm Sieb. Die Hausstaubfraktion ≤ 63 µm wird als Probenmaterial eingesetzt¹². Aufgrund der unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Schadstoffe im Hausstaub wird ein an Literaturangaben angelehntes und im IUTA evaluiertes universelles Extraktionsverfahren angewandt. Dieses Verfahren dient u. a. der Extraktion von Mykotoxinen. Hierbei werden 0,5 g Probenmaterial der Hausstaubfraktion ≤ 63 µm für 20 Minuten im Ultraschallbad mit 5 mL eines Gemisches aus Wasser/Methanol (16/84) extrahiert. Anschließend wird die Probe über einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und bei -18 °C gelagert. Der generelle Ablauf für die Aufarbeitung von Hausstaubproben ist in Abbildung 2-2 wiedergegeben.

⁹Butte, W. (2004). Bewertung von Bioziden, PAH und Phthalaten im Hausstaub. In KRdL Staub und Staubinhaltsstoffe. (Düsseldorf), pp. 285-303.

¹⁰ Butte, W., and Heinzow, B. (2002). Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 175, Volume 175. (New York: Springer-Verlag), pp. 1-46.

¹¹ Ingenieure, V.D. (2001). VDI 4300-Messen von Innenraumlufiverunreinigungen Probenahme von Hausstaub. Volume Blatt 8, V.D. Ingenieure, ed. (Düsseldorf), pp. 1-28.

¹² Portner, C. (2012). Entwicklung flüssigkeitschromatographisch massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub. In Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften. (Carl von Ossietzky Universität Oldenburg), p. 155.

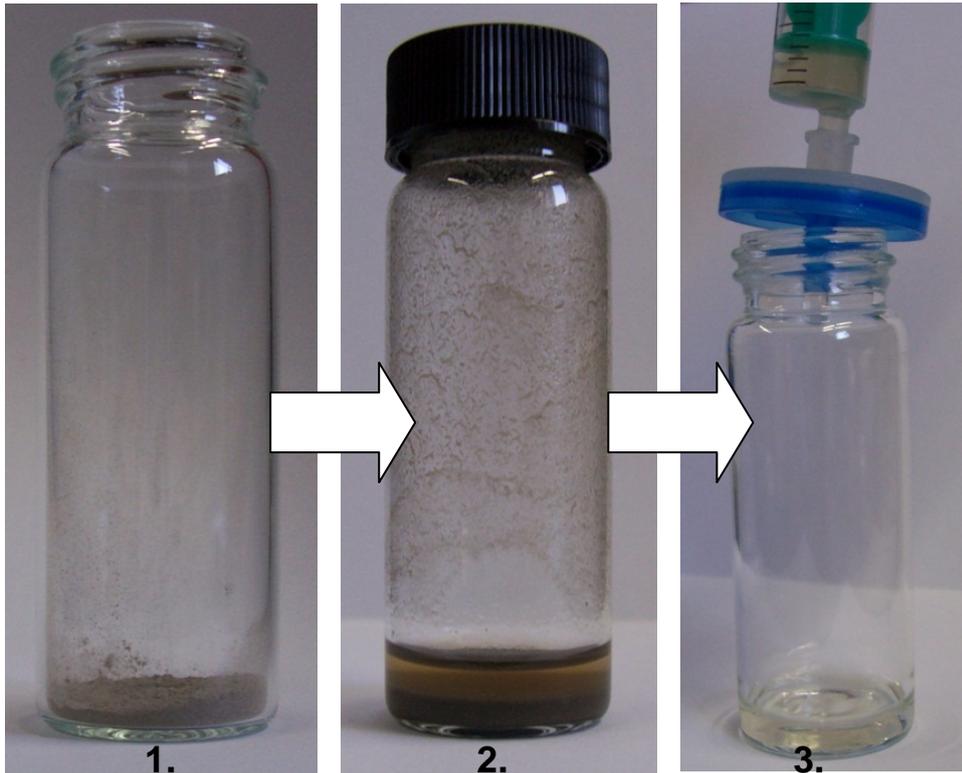


Abbildung 2-2: Aufarbeitung von Hausstaubproben zum Nachweis von Mykotoxinen: 1. Einwaage, 2. Nach der Extraktion mit 16/84 Wasser/Methanol (v/v) im Ultraschallbad, 3. Mikrofiltration des Überstands.

2.3.2 Membranunterstützte Aufreinigung (AMAC)

Parallel zu diesem etablierten Verfahren wurden weitere Extraktionstechniken evaluiert. Ein solches Verfahren basiert auf der von Streck et al. entwickelten Methode der beschleunigten membranunterstützten Aufreinigung von Extrakten¹³. Hierbei wird ein flüssiger Extrakt in einen PE-Beutel eingeschweißt und dann mittels beschleunigter Lösungsmittel-Extraktion aufgereinigt. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in der Abtrennung von schwer eluierbaren Verbindungen bzw. der Matrixabtrennung. Die weitere Aufreinigung der Extrakte ist von besonderer Bedeutung, um die Komplexität der zu analysierenden Extrakte zu reduzieren. Dies würde sich auch positiv auf die Reduktion von Matrixeffekten auf die massenspektrometrische Detektion auswirken.

Die mit Hausstaubextrakten erzielten Ergebnisse waren allerdings nicht zufrieden stellend, da für einzelne Targetanalyten (Sterigmatocystin, Zearalenon) Wiederfindungsraten kleiner 10% in einem Konzentrationsbereich von 50 ng mL^{-1} erreicht wurden. Vor diesem Hintergrund fanden nur die durch das universelle Extraktionsverfahren erzeugten Extrakte für die weiteren Untersuchungen Verwendung.

¹³ Streck, H.G., Schulze, T., and Brack, W. (2008). Accelerated membrane-assisted clean-up as a tool for the clean-up of extracts from biological tissues. *J Chromatogr A* 1196-1197C, 33-40.

2.4 Entwicklung von Mikroextraktionsverfahren zur Probenvorbereitung der Hausstaubextrakte

2.4.1 Disposable Pipette Extraction

Zum Zeitpunkt der Antragsstellung wurde erwogen, ein online gekoppeltes Mikroextraktionsverfahren auf Basis von gepackten Sorbentien (MEPS, „**M**icro **E**xtraction by **P**acked **S**orbents“) zu verwenden, da dieses Verfahren mit der am IUTA vorhandenen Gerätekonfiguration als echtes Online-Extraktionsverfahren genutzt werden kann. Als problematisch hat sich hierbei aber die Reinigung der MEPS-Spritzen erwiesen, wenn ein komplexer Hausstaubextrakt aufgezogen wird.

Da der Austausch dieser MEPS-Kartuschen mit hohen Kosten verbunden ist, wurde ein alternatives Verfahren, das unter dem Namen „Disposable Pipette Extraction“ (DPX) bekannt ist, evaluiert. Bei dieser Technik handelt es sich um eine Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction), die im Gegensatz zur konventionellen SPE nicht mit gepackten Adsorbentien in Kartuschen, sondern mit einer Einwegpipettenspitze arbeitet. In der DPX-Pipettenspitze befindet sich das Sorbensmaterial lose eingelegt und frei beweglich zwischen zwei Fritten, wie in Abbildung 2-3 zu erkennen ist. Der Vorteil der DPX-Technik im Vergleich zu MEPS ist darin zu sehen, dass die Pipettenspitzen nach Aufarbeitung einer Probe entsorgt werden können und somit das Risiko von Kreuzkontaminationen durch die Probenvorbereitung ausgeschlossen wird. Die Strategie der Probenvorbereitung auf Basis von DPX besteht darin, dass hochmolekulare Matrixkomponenten, die nicht unter den für die Chromatografie definierten Randbedingungen von der Säule eluiert werden können, entfernt werden. Die Abbildung 2-3 veranschaulicht die grundsätzliche Vorgehensweise bei der manuellen Extraktion mittels DPX. Der eigentlichen Aufnahme der Probe kann zunächst ein Konditionierungsschritt vorangestellt werden. Die Probe wird anschließend durch Aufziehen der Probenlösung in die DPX-Spitze mit dem Festphasenmaterial vermischt. Durch zusätzliches Aufziehen von Luft wird eine Verwirbelung des losen Festphasenmaterials mit der Probenlösung erreicht und somit der Stoffaustausch verbessert. Danach wird die aufgereinigte Probenlösung ausgestoßen und in das HPLC-System injiziert.

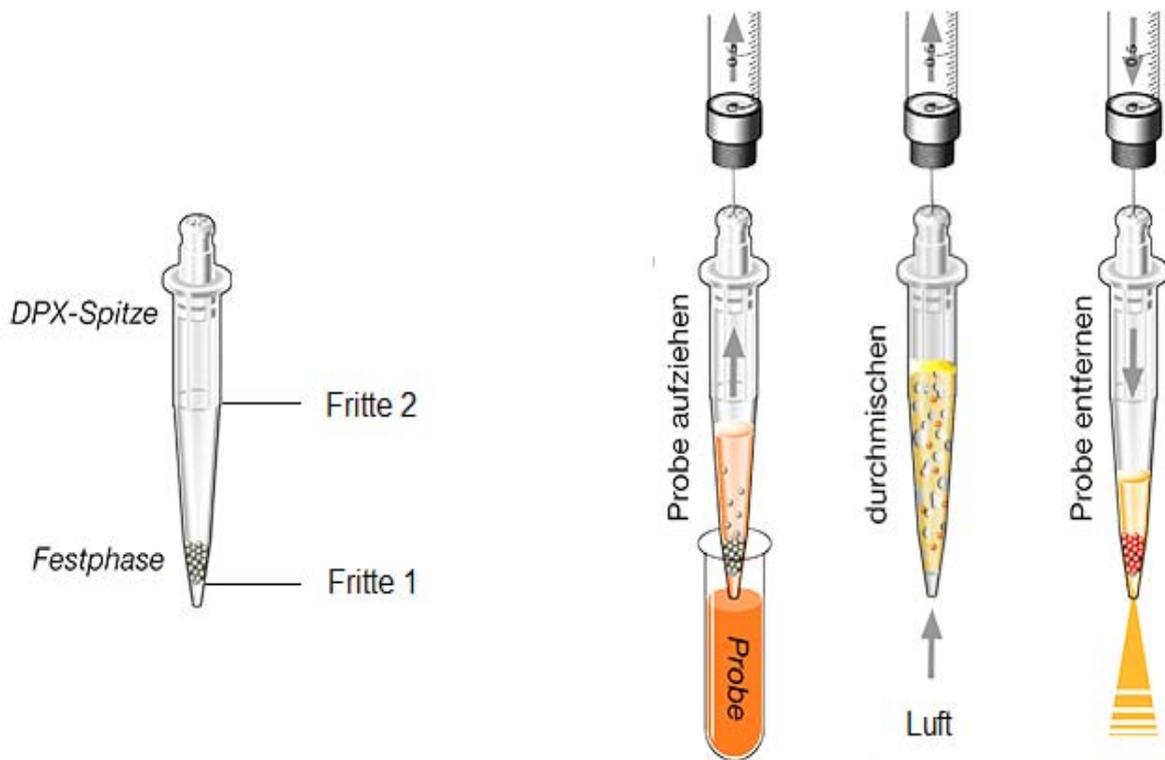


Abbildung 2-3: Allgemeine Vorgehensweise bei der manuellen DPX-Probenaufarbeitung¹⁴.

Darüber hinaus können weitere Waschschr itte angeschlossen und Substanzen, die auf dem Sorbens verblieben sind, im nächsten Schritt eluiert werden. Somit kann ein Aufreinigungsschritt mit einer Anreicherung kombiniert werden. Zus atztlich ist die Möglichkeit gegeben, den Hausstaubextrakt sequentiell zu extrahieren, um die Komplexität der chromatografischen Trennung zu reduzieren. Es wurden Analyten verschiedener Polaritäten, repräsentiert durch den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$ oder $\log P_{OW}$, siehe Formel 2-1), ausgewählt. Der $\log P$ ist ein Maß für die Polarität einer Substanz und gibt das Verhältnis der Konzentrationen (c) in einem Zweiphasensystem, bestehend aus Octanol ($c_{n-Octanol}$) und Wasser (c_{Wasser}), an.

$$P_{OW} = \frac{c_{n-Octanol}}{c_{Wasser}}$$

$$\log P_{OW} = \log \left(\frac{c_{n-Octanol}}{c_{Wasser}} \right)$$

Formel 2-1

¹⁴ Gerstel (2009). Automated Multi-Residue Pesticide Analysis in Fruits and Vegetables by Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry.

Dieses Verhältnis korreliert ebenfalls mit dem Verhalten der Analyten in der RP-HPLC und kann für die Auswertung der in Kapitel 2.5 ermittelten Retentionsdaten herangezogen werden^{15,16}.

2.4.1.1 Aufarbeitung mittels DPX-Q

Ein weiteres Verfahren auf Grundlage von DPX basiert auf der von Anastassiades et al. entwickelten QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) Extraktion¹⁷. Mittels dieses Verfahrens können u. a. Pestizide extrahiert und via GC-MS oder LC-MS analysiert werden. Das Verfahren basiert auf einer fest-flüssig Extraktion, wobei durch Zugabe von Salzen der pH-Wert der Probe eingestellt wird. In einem folgenden Schritt wird durch Zugabe von Adsorbens störende Matrix entfernt, um hohe Wiederfindungen zu erhalten. Aufgrund der Möglichkeit, störende Matrixbestandteile mit geringem Aufwand abzutrennen, wurde es im Rahmen dieses Projekts auch auf Hausstaubproben angewendet.

Um die einzelnen Schritte noch effizienter zu gestalten, wurden Aufarbeitungsschritte zusammengefasst und in Form der DPX-Q Spitzen auf den Markt gebracht. Diese Pipettentips enthalten bereits die entsprechenden Salze und das Adsorbens, sodass Zeit für die Probenaufarbeitung eingespart werden kann. Zusätzlich bietet diese Form der Aufarbeitung die Möglichkeit zur Automatisierung der Probenvorbereitung. Zur Auswahl stehen verschiedene Phasenmaterialien, wie z. B. Magnesiumsulfat mit Sorbens (primary and secondary amine exchange material, PSA) und zusätzlich mit grafitisiertem Kohlenstoff (graphitized carbon black, GCB), zum Entfärben von Pflanzenextrakten¹⁸. Hierbei ist anzumerken, dass dieses Phasenmaterial nur für die Aufreinigung von rein organischen Extrakten entwickelt wurde. Die Hausstaubextrakte bestanden jedoch aus einem Gemisch aus 16/84 Wasser/Methanol (v/v) bzw. aus 16/84 Wasser/Acetonitril (v/v), um die polaren und semipolaren Substanzen zu erfassen.

¹⁵ Du, C.M., Valko, K., Bevan, C., Reynolds, D., and Abraham, M.H. (2001). Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient (log P-oct) from isocratic RP-HPLC and a hydrogen bond acidity term (A). *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 24, 635-649.

¹⁶ 117, O.G.f.T.o.C. (1989). Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.

¹⁷ Anastassiades, M., Lehota, S.J., Stajnbaher, D., and Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of Aoac International* 86, 412-431.

¹⁸ Gerstel (2009). Automated Multi-Residue Pesticide Analysis in Fruits and Vegetables by Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry.

Während der Aufarbeitung mit den DPX-Q und DPX-Qg-Tips war deshalb zu beobachten, dass aufgrund des Wasseranteils in der Extraktionslösung das Phasenmaterial allmählich aufgelöst wurde (siehe Abbildung 2-4) und später im Injektionsvial als feiner weißer Niederschlag wieder auskristallisierte. Das DPX-Q-Phasenmaterial eignete sich folglich nicht für die sequentielle Aufarbeitung der wässrig-organischen Extrakte.

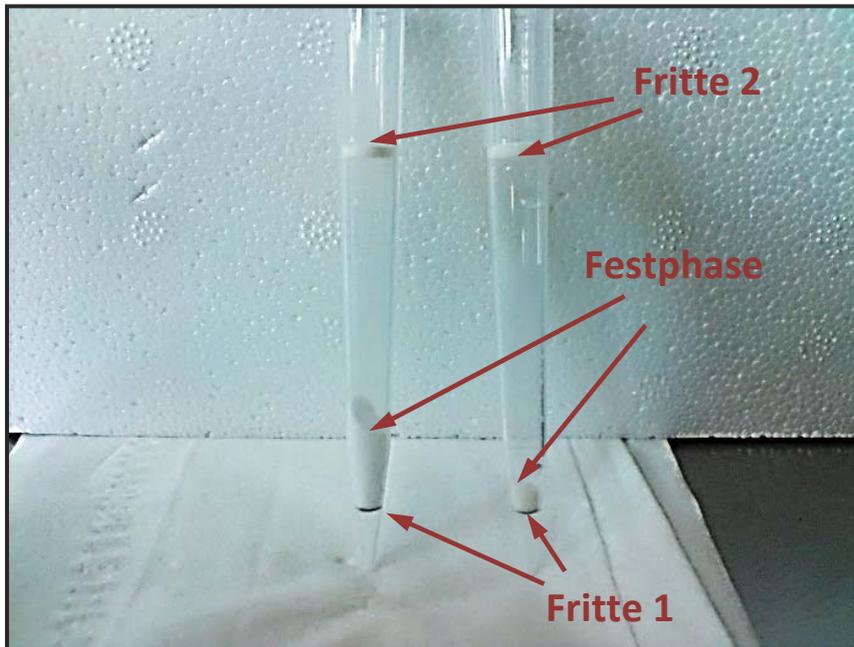


Abbildung 2-4: DPX-Q-Spitze vor (links) und nach (rechts) der Extraktion. Weitere Erläuterungen: siehe Text.

Im Rahmen dieser Versuchsreihen wurde auch der Matrixeffekt auf die Elektrosprayionisation für die LC-MS-Detektion in Anlehnung an Studien von Bonfiglio et al.¹⁹ und Matuszewski et al.²⁰ untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Ionisierung untersucht²¹. Hierbei stellte sich heraus, dass Acetonitril eine geringere Signalunterdrückung als Methanol bewirkt, so dass höhere Wiederfindungen erreicht wurden.

¹⁹ Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., and Merkle, K. (1999). The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 1175- 1185.

²⁰ Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., and Chavez-Eng, C.M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 3019-3030.

²¹ Ingenbosch, K. (2011). Untersuchung des Einflusses von Matrixeffekten auf die Quantifizierung mittels LC-MS/MS am Beispiel von Mykotoxinen im Hausstaub. In *Chemie und Biotechnologie*. (Hochschule Niederrhein Krefeld), p. 72.

2.4.1.2 Aufarbeitung mittels DPX-RP

Aufgrund der hohen Salzfracht in den mittels DPX-Q aufgearbeiteten Proben fanden im weiteren Projektverlauf Pipettentips Verwendung, die ein Co-Polymer als Phasenmaterial enthalten (DPX-RP). Dieses Co-Polymer verhält sich wie eine Umkehrphase und sollte somit für die Entfernung unpolarer Matrixkomponenten geeignet sein. Um eventuelle Matrixbestandteile zu detektieren, wurde das HPLC-System zusätzlich zum UV-Detektor mit einem ELS-Detektor (Lichtstreuendetektor) gekoppelt. Zum Vergleich wurde die Aufarbeitung ohne DPX-Spitzen (siehe Kapitel 2.3.1, 16/84 Wasser/Methanol) herangezogen. Auf Grundlage der Ergebnisse aus Kapitel 2.4.1.1 wurde die Aufarbeitung sowohl mit Acetonitril als auch mit Methanol durchgeführt, um eventuelle Unterschiede zu verdeutlichen. Im Gegensatz zu den im vorherigen Kapitel beschriebenen Versuchen erfolgte die Detektion mittels ELSD. Der Vergleich der in Abbildung 2-5 und Abbildung 2-6 dargestellten Chromatogramme zeigt einen Unterschied in der Matrixbelastung der beiden unterschiedlich aufgearbeiteten Hausstaubextrakte. Mit der Verwendung von Acetonitril zeigt sich ein geringeres Vorhandensein von polaren und semipolaren Komponenten der aufgearbeiteten Proben, d. h. im vorderen Elutionszeitfenster. Für die Methodenentwicklung mittels Markersubstanzen war dies von Vorteil, da wie bereits beschrieben eine geringere Signalunterdrückung erreicht wurde. Für das Screening auf regulatorische Aktivität der Proben mittels Online-System musste aber beachtet werden, dass diese Komponenten relevant sind.

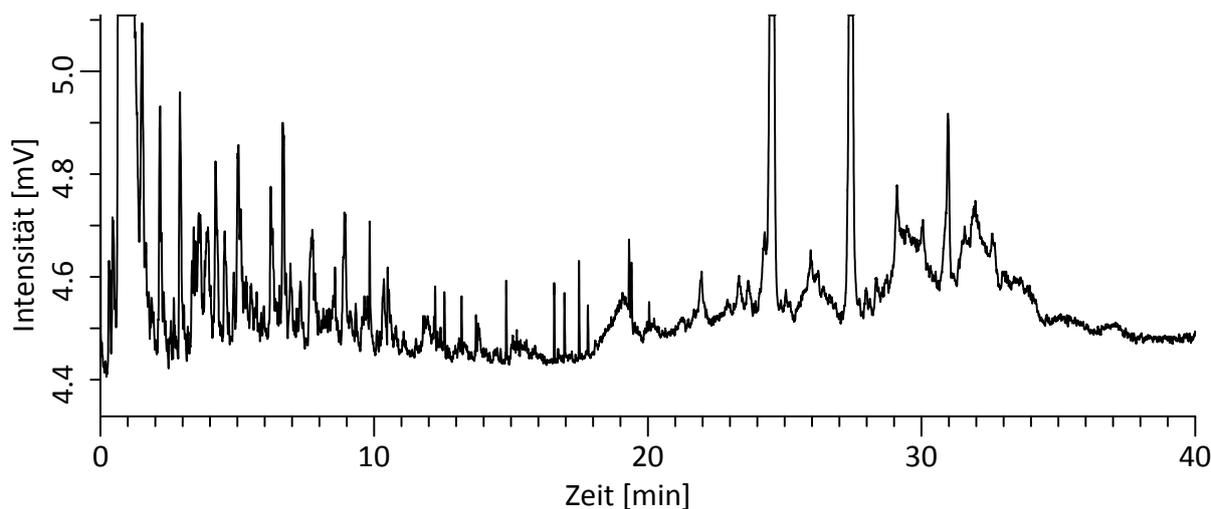


Abbildung 2-5: Chromatogramm einer Hausstaubprobe; Aufarbeitung: fest-flüssig Extraktion mit 100% Methanol. Chromatografische Bedingungen: Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, ab 30 min isokratisch, mobile Phase: Wasser/Acetonitril, pH 4 mit Essigsäure, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,5 mL min⁻¹, Temperatur: 40 °C, Detektion: ELSD.

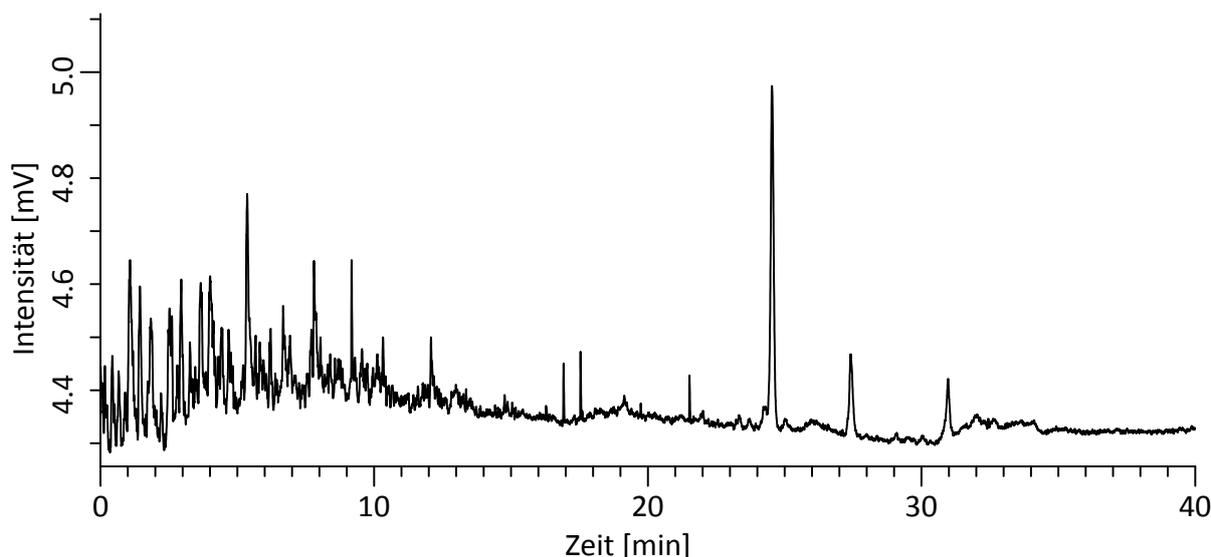


Abbildung 2-6: Chromatogramm einer Hausstaubprobe; Aufarbeitung: fest-flüssig Extraktion mit 100% Acetonitril. Chromatografische Bedingungen: Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, ab 30 min isokratisch, mobile Phase: Wasser/Acetonitril, pH 4 mit Essigsäure, stationäre Phase: Zirchrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,5 mL min⁻¹, Temperatur: 40 °C, Detektion: ELSD.

Um die festen Bestandteile des Hausstaubs abzutrennen, wurde die feste Probe mit 16/84 Wasser/Acetonitril (v/v) extrahiert und der so gewonnene flüssige Extrakt für die weitere Aufreinigung verwendet. Um den Extrakt in polare und unpolare Fraktionen zu trennen, wurde der überwiegend organische Extrakt mit Wasser auf einen Organikanteil von 20% Acetonitril eingestellt und dieser mittels DPX-RP-Tip aufgereinigt. Anschließend konnte der DPX-RP-Tip mit Lösungen aufsteigender Konzentration an Acetonitril sequentiell extrahiert werden.

Diese Vorgehensweise ist zum besseren Verständnis in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt. Es wurde angenommen, dass die unpolaren Komponenten zunächst auf dem Phasenmaterial verbleiben und in den darauf folgenden Extraktionsschritten mit dem erhöhten organischen Anteil eluiert werden. Auf dieser Basis sollte eine sequentielle Extraktion erreicht werden, die es ermöglicht, die unpolaren Matrixbestandteile abzutrennen.

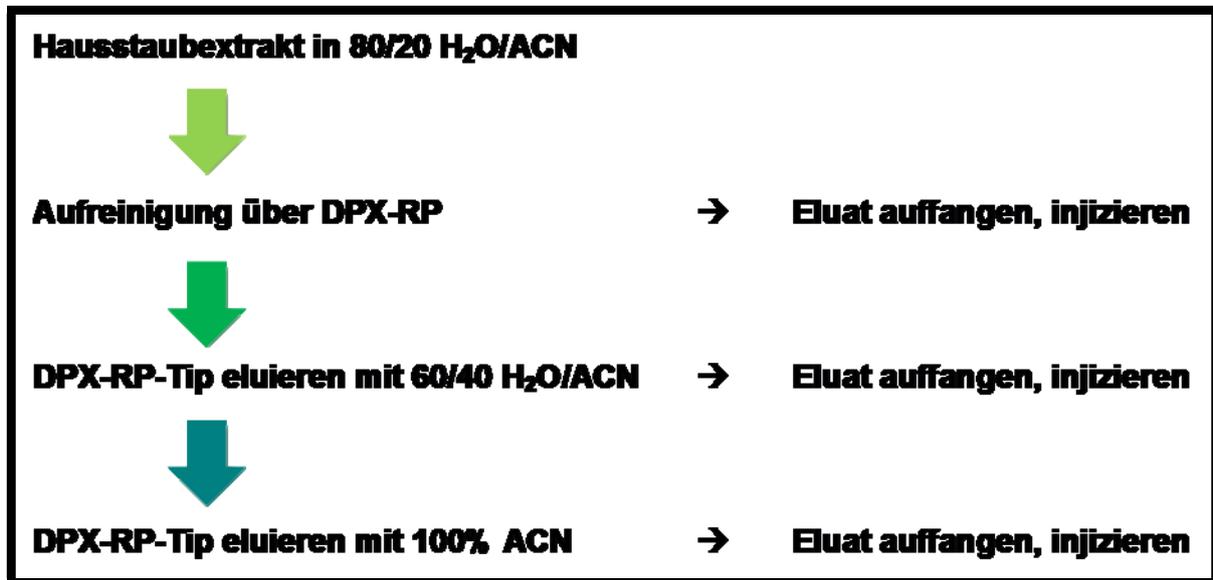


Abbildung 2-7: Schema der Vorgehensweise bei der sequentiellen Elution eines Hausstaubextrakts mittels DPX.

Hierzu wurden Markersubstanzen ausgewählt und den Proben zudotiert. Diese Substanzen wurden teilweise auch für die in Kapitel 2.5 durchgeführten Experimente als Markersubstanzen verwendet (Tabelle 2-2). Für die ersten Versuche mittels UV-ELS-Detektion wurden Diethylphthalat, Bisphenol A, Chrysen und Diethylhexylphthalat ausgewählt, da diese ein breites Polaritätsspektrum repräsentieren (logP) und UV-aktiv sind. Darüber hinaus handelt es sich um Substanzen, die in realen Hausstaubproben vorhanden sein können²². Für die Vorversuche zur sequentiellen Elution wurden jeweils 20%, 40%, 60%, 80% und 100% Acetonitril gewählt mit dem Ziel, das Substanzgemisch in einzelne Fraktionen zu unterteilen. Diese Fraktionen wurden nach Aufarbeitung mit DPX-RP wiederum mittels HPLC-UV-ELSD analysiert. In der folgenden Abbildung 2-8 sind die UV-Chromatogramme der einzelnen Fraktionen gezeigt.

²² Butte, W., and Heinzow, B. (2002). Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 175, Volume 175. (New York: Springer-Verlag), pp. 1-46.

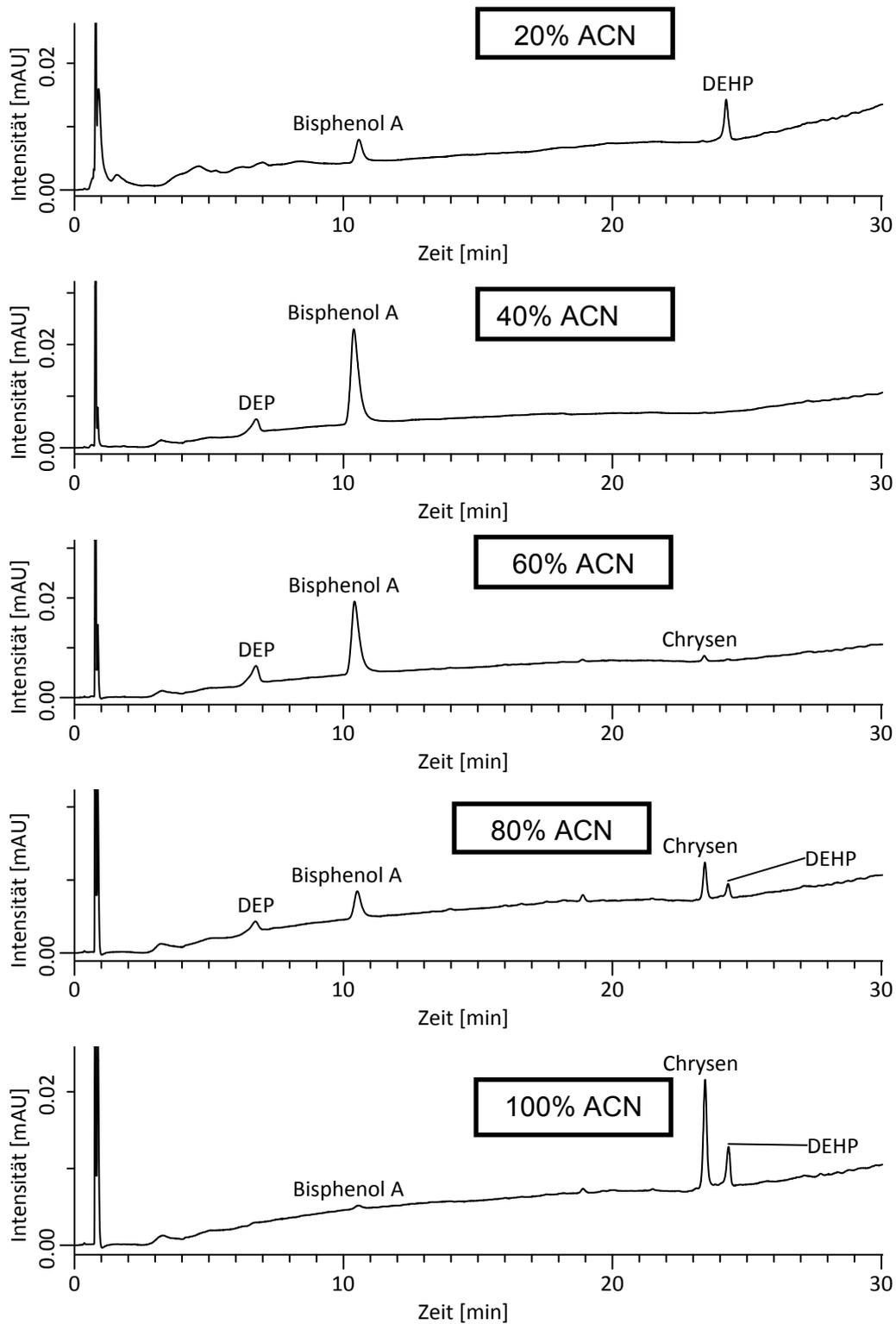


Abbildung 2-8: Chromatogramme der 20%,40%, 60%, 80% und 100%igen Acetonitril-Fraktion (von oben nach unten). Chromatografische Bedingungen: Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, mobile Phase: Wasser/Methanol, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 μm , Flussrate: 0,5 mL min^{-1} , Temperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$, Detektion: UV bei 254 nm.

Anhand der in Abbildung 2-8 dargestellten Chromatogramme geht eindeutig hervor, dass eine Fraktionierung des Rohextrakts erfolgreich durchgeführt werden konnte. So waren die relativ polaren Substanzen DEP und Bisphenol A hauptsächlich in der 40% und 60% Fraktion zu finden. Mit zunehmendem Acetonitrilgehalt der Fraktion nehmen die Peakflächen ab. In der 100% ACN-Fraktion konnte kein DEP und Bisphenol A mehr detektiert werden. Für die relativ unpolaren Substanzen Chrysen und DEHP war der gegenteilige Effekt zu beobachten. Diese beiden Analyten waren vornehmlich in der 80% Fraktion bzw. 100% Fraktion zu finden, da diese am stärksten von dem DPX-RP-Phasenmaterial retardiert wurden.

Eine Ausnahme stellte allerdings die erste Fraktion dar (20% ACN). Während die polarste Substanz (DEP) nicht detektiert wurde, konnten Bisphenol A und das unpolare DEHP nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass eine Überladung des Phasenmaterials aufgrund zu hoher Konzentrationen vorlag.

Da keine quantitative Fraktionierung, sondern vielmehr eine Verteilung der Analyten auf mehrere Fraktionen festgestellt werden konnte, wurde eine Abstufung der Fraktionen in 20%-Schritten als nicht zweckmäßig erachtet. Für die folgenden Versuche wurde die Anzahl der Fraktionen auf drei reduziert (20, 60 und 100%). Das Ziel der weiteren Versuche bestand darin, die polaren Analyten mit 20% Acetonitril und die semi- bis unpolaren Komponenten jeweils durch Elution mit 60% und 100% Acetonitril abzutrennen und zusätzlich die verwendeten Konzentrationen zu verringern, um einer Überladung des Phasenmaterials vorzubeugen.

2.4.1.3 Übertragung der Methoden auf LC-MS

Von den für die HPLC-UV-Versuche verwendeten Analyten wurden für die Extraktionsversuche entsprechend ionisierbare Substanzen ausgewählt bzw. zusätzliche hinzugefügt und im Anschluss mittels LC-ESI-MS analysiert (Tabelle 2-1). Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der Analyten in der Injektionslösung verringert, um einer möglichen Überladung der DPX-Phase vorzubeugen. Auch für die Übertragung der Probenaufarbeitung auf LC-MS wurde wie in Kapitel 2.4.1.2 bzw. Abbildung 2-7 beschrieben vorgegangen. Die einzelnen Fraktionen wurden separat aufgefangen und analysiert.

Abbildung 2-9, Abbildung 2-10 und Abbildung 2-11 zeigen die Chromatogramme der drei Fraktionen, wobei jeweils die einzelnen Massenspuren der Analyten angegeben sind.

Tabelle 2-1: Für die sequentielle Elution verwendete Markersubstanzen; Säule: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Eluent: A: Wasser+20 mmol L⁻¹ Ammoniumformiat-Puffer pH 2, B: Methanol + 20 mmol L⁻¹ Ammoniumformiat-Puffer; Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, Flussrate: 0,3 mL min⁻¹, Detektion: ESI-MS, positiv, MRM.

Analyt	Vorläufer-Ion m/z	Produkt-Ion m/z	Retentionszeit [min]	logP
Nikotin	163	117, 130	1,31	1,17
Aflatoxin B1	313	128, 285	8,95	1,23
Diethylphthalat (DEP)	223	149, 177	9,18	2,42
Sterigmatocystin	325	281, 115	17,9	3,81
Benzylbutylphthalat (BBP)	313	91, 149	20,3	4,73

Die Chromatogramme machen deutlich, dass mit der beschriebenen Vorgehensweise eine Fraktionierung des Extrakts erfolgreich durchgeführt werden kann, womit die Ergebnisse der Vorversuche mittels HPLC-UV bestätigt werden konnten. Eine quantitative Abtrennung konnte, wie auch bei den HPLC-UV Messungen, nicht erreicht werden, was für die Anwendung im Online-System nicht zwingend notwendig ist. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass durch die hier beschriebene Aufarbeitung eine Verdünnung des Extrakts stattfindet.

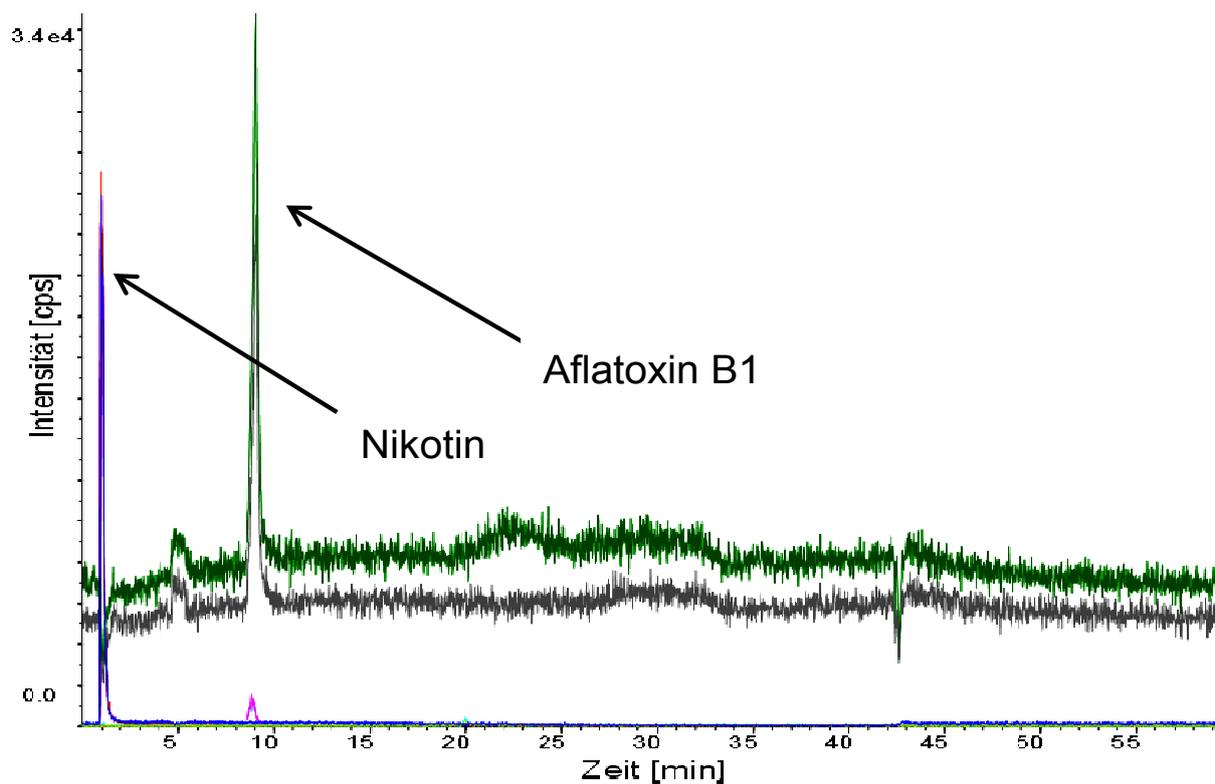


Abbildung 2-9: EIC der 1. Fraktion mit 80/20 Wasser/Acetonitril. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser/Methanol + 0,1% Ameisensäure, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,3 mL min⁻¹, Detektion: ESI positiv.

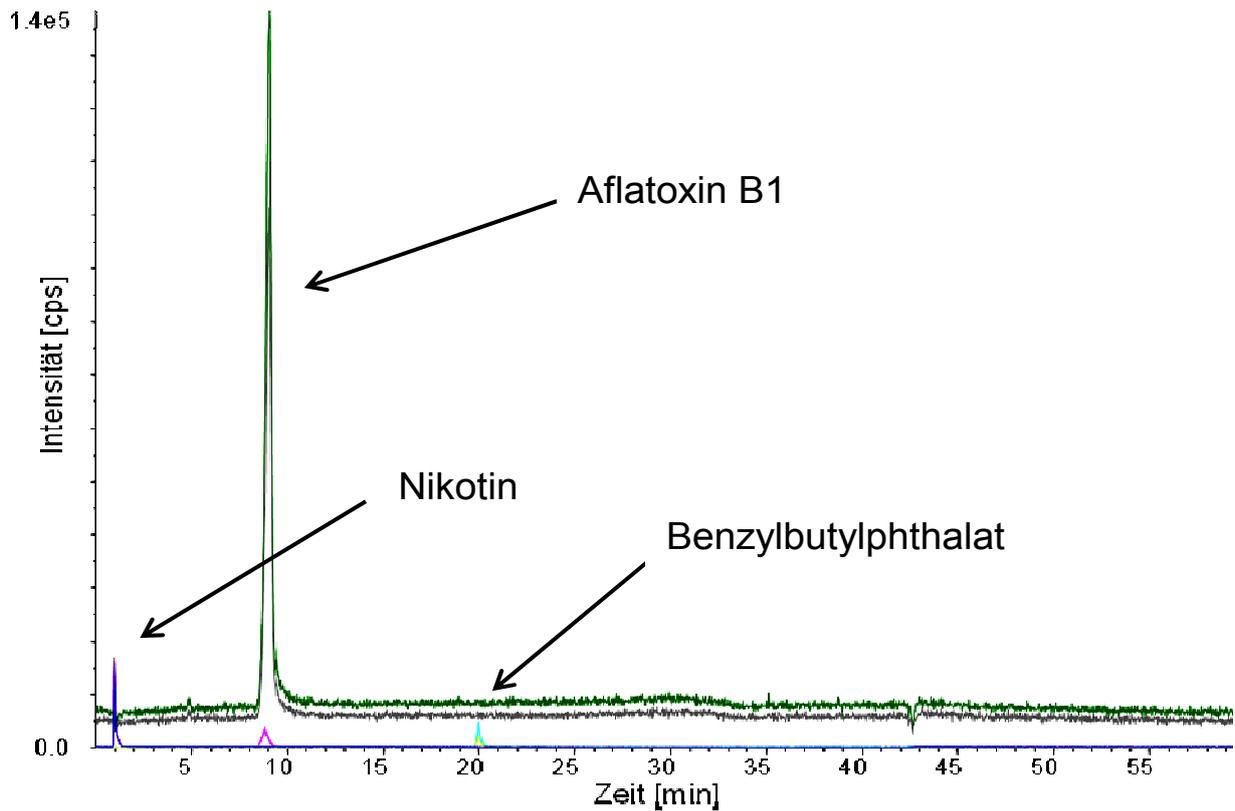


Abbildung 2-10: EIC der 2. Fraktion mit 60/40 Wasser/Acetonitril, Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser/Methanol + 0,1% Ameisensäure, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 μm , Flussrate: 0,3 mL min^{-1} , Detektion: ESI positiv.

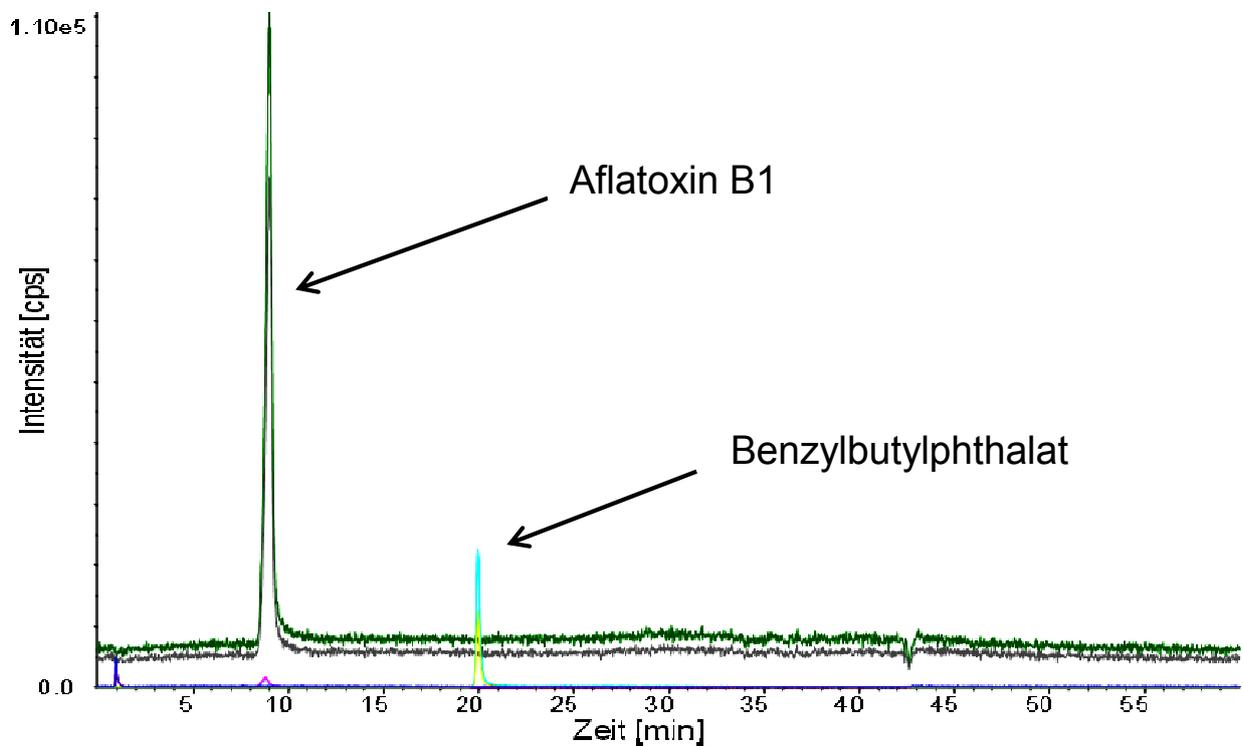


Abbildung 2-11: EIC der 3. Fraktion mit 100% Acetonitril, Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser/Methanol + 0,1% Ameisensäure, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, Stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 μm , Flussrate: 0,3 mL min^{-1} , Detektion: ESI positiv.

2.5 Entwicklung chromatografischer Methoden

2.5.1 Nutzbarer Temperaturbereich

Der nutzbare Temperaturbereich wurde anhand von Säulentests eingegrenzt. Obwohl vor Projektbeginn die Höchstgrenze für metalloxidische Phasen auf 225 °C festgelegt wurde, musste dieser Wert anhand aktueller Untersuchungen auf 150 °C nach unten korrigiert werden. Der Grund hierfür ist, dass der Säulenhersteller die Polymerbeschichtung optimiert hat, so dass mit Polybutadien beschichtete Phasen auf Basis von Zirkoniumdioxid eine geringere Temperaturstabilität aufweisen als zum Zeitpunkt der Antragsstellung. Allerdings kann die Temperaturgrenze für Hybridmaterialien auf Silikagelbasis in einem Bereich zwischen 150 °C und 180 °C angesetzt werden.

2.5.2 Auswahl der Testsubstanzen

Die Auswahl der Testsubstanzen für die Entwicklung der chromatografischen Methoden richtete sich im Wesentlichen nach deren Polarität bzw. Hydrophobizität. Die Toxizität der ausgewählten Modellsubstanzen ist hierbei nicht entscheidend, da zunächst ermittelt werden muss, in welchem Maße eine Elution aller potenziell in einem Hausstaubextrakt vorkommenden Stoffe anhand der definierten Randparameter überhaupt möglich ist.

Es wurden exemplarisch Substanzen anhand von logP Werten und ihrem Vorkommen im Hausstaub aus verschiedenen Stoffgruppen ausgewählt²³. Die Elution polarer Komponenten bereitet in der Regel keine Probleme, da diese auf einer Umkehrphase mit Wasser bei hohen Temperaturen eluiert werden. Problematischer ist jedoch die Elution unpolarer Substanzen. Wird reines Wasser als mobile Phase verwendet, so müssen extreme Temperaturen bis 200 °C eingestellt werden, wie anhand der nachfolgenden Abbildung 2-12 exemplarisch dargestellt ist. Die Elution ausgewählter Steroide erfolgte hierbei auf einer Waters XBridge C8 Phase mit Wasser unter Anwendung eines Temperaturgradienten von 180 auf 200 °C. Obwohl eine Elution möglich ist, kommt es bereits nach wenigen Stunden zu einem dramatischen Abfall der Trennleistung der Säule.

²³AGÖF (2005). AGÖF-Orientierungswerte für Inhaltsstoffe von Raumluft und Hausstaub.

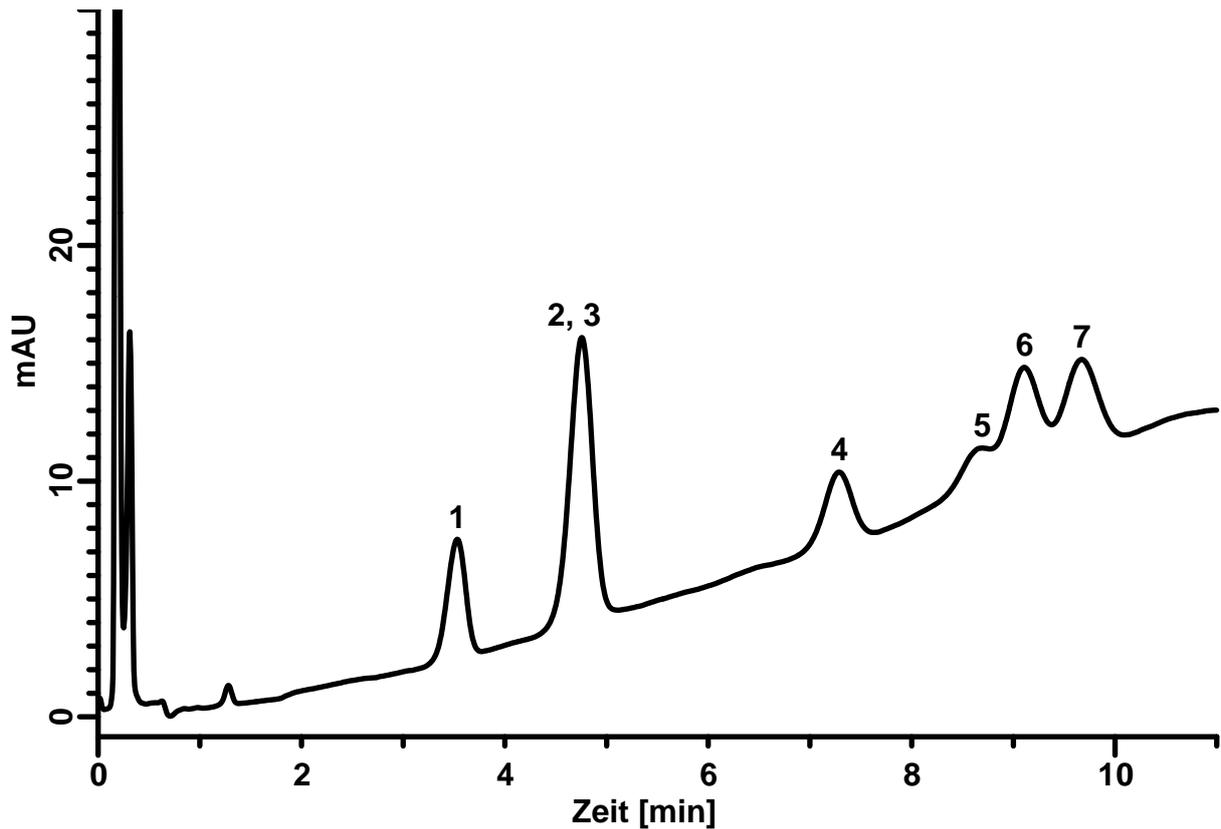


Abbildung 2-12: Trennung ausgewählter Steroide mit reinem Wasser als mobiler Phase auf einer Waters XBridge C8 Säule (3,0 x 50 mm, 3,5 μm). Chromatografische Bedingungen: Temperaturgradient von 180 °C auf 200 °C in 10 Minuten; Flussrate: 1,5 mL min^{-1} ; Elutionsreihenfolge: 1) 19-Nortestosteron, 2) trans-dehydroandrosteron, 3) Testosteron, 4) Epitestosteron, 5) Etiocholan, 6) 5 α -Androstan, 7) cis-Androsteron, Detektion: UV bei 254 nm.

Der Verlauf der Degradation der stationären Phase kann anhand der Trennung eines Testgemisches, meist bestehend aus einem Totzeitmarker und einer oder mehrerer semipolarer Substanzen, beobachtet werden. Hierfür wird nach jedem Messintervall das Testgemisch analysiert. Anhand von Peakform und Retentionszeit kann eine Aussage über den Zustand der Säule getroffen werden. Darüber hinaus ist es möglich, den Abfall der Trennleistung zu dokumentieren, wie Abbildung 2-13 beispielhaft zeigt. Diese Chromatogramme verdeutlichen den Einfluss der Temperatur auf die Trennleistung der Säule nach längeren Heizphasen bei 150 °C.

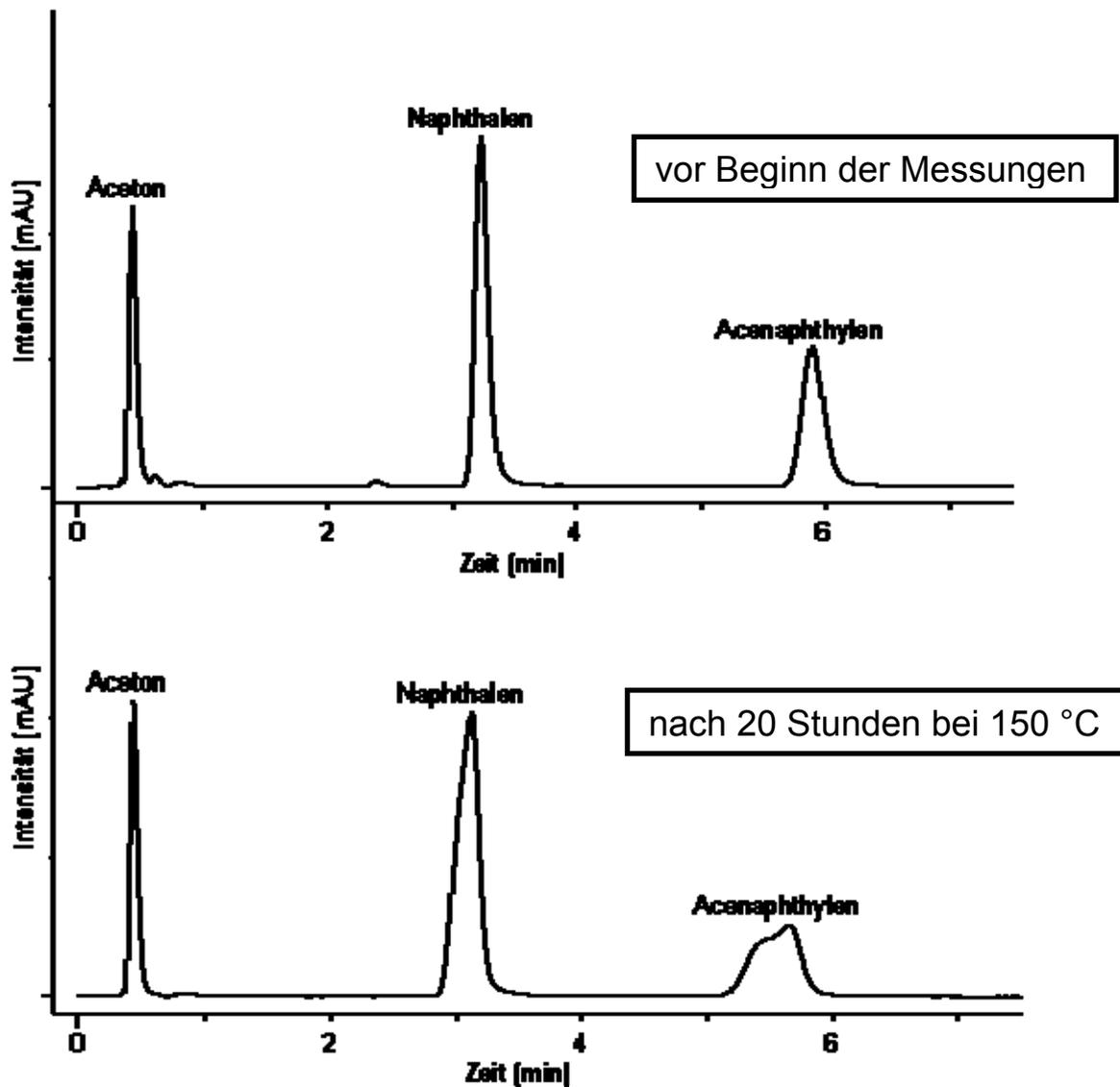


Abbildung 2-13: Vergleich zweier Säulentestchromatogramme. Chromatografische Bedingungen: Temperatur: 30 °C, stationäre Phase: Waters XBridge C8, mobile Phase: Wasser/Acetonitril + 0,1% Ameisensäure 65/35 (v/v), Flussrate: 0,5 mL min⁻¹, isokratisch, Detektion: UV bei 254 nm.

2.5.3 Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung

Die Entwicklung chromatografischer Methoden richtet sich nach den Vorgaben bzw. Erfordernissen des Gesamtverfahrens. Um die Kompatibilität mit dem Enzym-Assay zu gewährleisten, darf der organische Anteil einen bestimmten Schwellenwert nicht überschreiten.

In den bislang durchgeführten Arbeiten durch de Boer und Irth^{24, 25} sind allerdings nur wenige Angaben zu finden, inwieweit die Art des organischen Lösungsmittels Einfluss auf die Enzymaktivität nimmt. In diesen Arbeiten wurde hauptsächlich Methanol als Co-Solvenz verwendet. Für die Hochtemperatur-HPLC gibt es aber prinzipiell keine Einschränkungen hinsichtlich der Verwendung eines bestimmten Lösungsmittels. Vielmehr wird durch den Zusatz eines organischen Lösungsmittels zur mobilen Phase deren Elutionskraft weiter erhöht. Vor diesem Hintergrund kann neben der Temperaturgradientenelution auch die Lösungsmittelgradientenelution zur Anwendung kommen. Die entsprechenden Experimente zur Kompatibilität der Enzymsysteme mit organischen Lösungsmitteln wurden parallel durch den Projektpartner TUM durchgeführt und sind in Kapitel 2.8 beschrieben.

Die Methodenentwicklung erfolgte mit Hilfe der Computer-Simulations-Software DryLab. Hierbei werden Basismessungen bei unterschiedlichen Temperaturen und Steigungen des Lösungsmittelgradienten durchgeführt. Nach Prozessierung der Daten und Erstellung eines Retentionsmodells ist es möglich, alle Kombinationen aus Temperatur und Lösungsmittelgradientensteigung zu simulieren. Dieses Vorgehen erlaubt es, Daten auch nachträglich auszuwerten und ggf. an neue Randparameter anzupassen, ohne weitere Messungen durchführen zu müssen.

Hierzu wurden zunächst die unter Gruppe I in Tabelle 2-2 aufgelisteten Substanzen ausgewählt, die ein breites Polaritätsspektrum repräsentieren. Für diese Substanzen wurde eine systematische Methodenentwicklung nach den in Tabelle 2-3 und Tabelle 2-4 angegebenen Parametern durchgeführt. Parallel dazu wurden massenspektrometrische Methoden für die unter Gruppe II in Tabelle 2-2 aufgeführten Mykotoxine entwickelt. Es wurden generische Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen angewendet, um eine Elution aller Analyten zu erzielen. Im Anschluss daran erfolgte die Prozessierung der Daten und die Erstellung von Retentionsmodellen. Dies bedeutet, dass ein generischer Lösungsmittelgradient von 2% beziehungsweise 5% auf 100 % des organischen Lösungsmittels (im Folgenden als % B bezeichnet) auf einen definierten Maximalwert umgerechnet wird.

²⁴ de Boer, A.R., Alcaide-Hidalgo, J.M., Krabbe, J.G., Kolkman, J., Boas, C.N.V., Niessen, W.M.A., Lingeman, H., and Irth, H. (2005). High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Anal. Chem.* 77, 7894-7900.

²⁵ de Boer, A.R., Letzel, T., Lingeman, H., and Irth, H. (2005). Systematic development of an enzymatic phosphorylation assay compatible with mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* 381, 647-655.

Aus Sicht der HPLC-Trennung ist es vorteilhaft, einen möglichst hohen Anteil des organischen Lösungsmittels zur Erhöhung der Elutionskraft der mobilen Phase zu verwenden. Da die Aktivität der Enzyme jedoch durch Lösungsmiteleinfluss herabgesetzt wird, wurde die maximale Konzentration des organischen Lösungsmittels im Eluenten auf 20% begrenzt (siehe Kapitel 2.8).

Die Basismessungen wurden in einem Temperaturintervall zwischen 30 °C und 120 °C bzw. 30 °C und 150 °C durchgeführt, sodass eine Extrapolation bis zu einer Temperatur von 159 °C möglich ist. Anhand von Validierungsmessungen wurde die Gültigkeit des Retentionsmodells überprüft.

Tabelle 2-2: Ausgewählte Markersubstanzen, die für die Methodenentwicklung verwendet und mittels UV- bzw. massenspektrometrischer Detektion gemessen wurden. Zugeordnet sind die entsprechenden Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P).

Gruppe I (UV-Messung)		Gruppe II (MS-Messung)	
	logP		logP
1. Diethylphthalat (DEP)	2,42	1. Roridin A	-1,56
2. Bisphenol A	3,32	2. Aflatoxin B1	1,02
3. Benz[a]anthracen (BaA)	5,76	3. Nikotin	1,17
4. Chrysen	5,81	4. Diacetoxyscirpenol	1,40
5. Benzo[a]pyren (BaP)	6,13	5. Aflatoxin B2	1,45
6. Diethylhexylphthalat (DEHP)	7,60	6. Gliotoxin	2,90
7. Ergosterin	8,86*	7. Stachybotryslactam	3,28**
		8. Zearalenon	3,58
		9. Sterigmatocystin	3,81
		10. Benzylbutylphthalat	4,73
		11. Diethylhexylphthalat	7,60

* berechnet mit KOWWIN (EPI Suite 4.10, U. S. Environmental Protection Agency)²⁶

** berechnet mit MarvinSketch 5.8.2 Software (ChemAxon, Budapest, Ungarn)²⁷

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Solvenz-Systeme, bestehend aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, auf die Elutionskraft untersucht.

²⁶ <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm> (07.02.2012).

²⁷ <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/> (04.01.2012).

Somit ist es möglich, mit der Wahl des entsprechenden Lösungsmittels die Elutionskraft bei gleich bleibendem Anteil der organischen Komponente in der mobilen Phase zu verändern. Beispielsweise nimmt die Elutionskraft für höherkettige Alkohole im Vergleich zu Methanol deutlich zu. Bei gleich bleibendem Anteil des organischen Co-Solvenz in der mobilen Phase von z. B. 20% wäre es deshalb möglich, eine bestimmte Substanz entweder schneller zu eluieren oder aber bei gleich bleibender Laufzeit des Chromatogramms mehr Komponenten von der Säule zu eluieren, also die Bandbreite des Verfahrens zu erhöhen. Tabelle 2-3 und Tabelle 2-4 fassen alle relevanten Parameter, die innerhalb dieses Arbeitspakets untersucht wurden, zusammen.

Tabelle 2-3: Parameter der Basismessungen für die Methodenentwicklung mittels UV-Detektion.

Stationäre Phase Lösungsmittelsystem	Waters XBridge C18 50 x 3,0 mm, 2,5 µm			ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 3 µm		
	Temperatur	Laufzeit	Lösungs- mittelgra- dient	Temperatur	Laufzeit	Lösungs- mittelgra- dient
1. H ₂ O/Methanol	50 °C	10 min	2-100% B	90 °C	10 min	5-100% B
	150 °C			120 °C		
	50 °C	30 min		90 °C	30 min	
	150 °C			120 °C		
2. H ₂ O/Acetonitril	50 °C	10 min	2-100% B	90 °C	10 min	5-100% B
	150 °C			120 °C		
	50 °C	30 min		90 °C	30 min	
	150 °C			120 °C		
3. H ₂ O/Ethanol	100 °C	10 min	2-100% B	90 °C	10 min	5-100% B
	150 °C			120 °C		
	100 °C	30 min		90 °C	30 min	
	150 °C			120 °C		
4. H ₂ O/Isopropanol	100 °C	10 min	2-100% B	90 °C	10 min	5-100% B
	150 °C			120 °C		
	100 °C	30 min		90 °C	30 min	
	150 °C			120 °C		
5. H ₂ O/ Tetrahydro- furan	100 °C	10 min	2-100% B	-		
	150 °C					
	100 °C	30 min				
	150 °C					

Tabelle 2-4: Parameter der Basismessungen für die Methodenentwicklung mittels HPLC-MS-Detektion.

Lösungsmittelsystem Stationäre Phase	H ₂ O/Methanol (Ammoniumacetat, Essigsäure pH 3)			H ₂ O/Methanol (Ammoniumformiatpuffer pH 3)		
	Temperatur	Laufzeit	Lösungsmittelgradient	Temperatur	Laufzeit	Lösungsmittelgradient
Waters XBridge C18	30 °C	10 min	5-100% B	-		
	150 °C					
	30 °C	30 min				
	150 °C					
ZirChrom PBD	30 °C	10 min	5-100% B	120 °C	20 min	0-100% B
	120 °C					
	30 °C	30 min		120 °C		
	120 °C					

Alle untersuchten Lösungsmittelsysteme sind uneingeschränkt miteinander mischbar, bis auf das System Wasser/Tetrahydrofuran. Dieses besitzt eine Mischungslücke im Bereich zwischen 70 °C und 140 °C²⁸, welche die Auswertung der Daten erschweren kann. Bei Verwendung der Waters XBridge Trennsäule war eine Datenakquisition auch für das System Wasser-Tetrahydrofuran möglich, wohingegen bei Verwendung der ZirChrom-PBD-Säule eine Auswertung für die zuletzt eluierenden Verbindungen aufgrund des starken Anstiegs in der Basislinie nicht möglich war. Dies deutet auf die Ausbildung der Mischungslücke während des Lösungsmittelgradienten hin, wie anhand der in Abbildung 2-14 dargestellten Chromatogramme nachvollzogen werden kann.

²⁸ Teutenberg, T. (2010). High-Temperature Liquid Chromatography - A User's Guide for Method Development, Volume 13, (Cambridge: Royal Society of Chemistry).

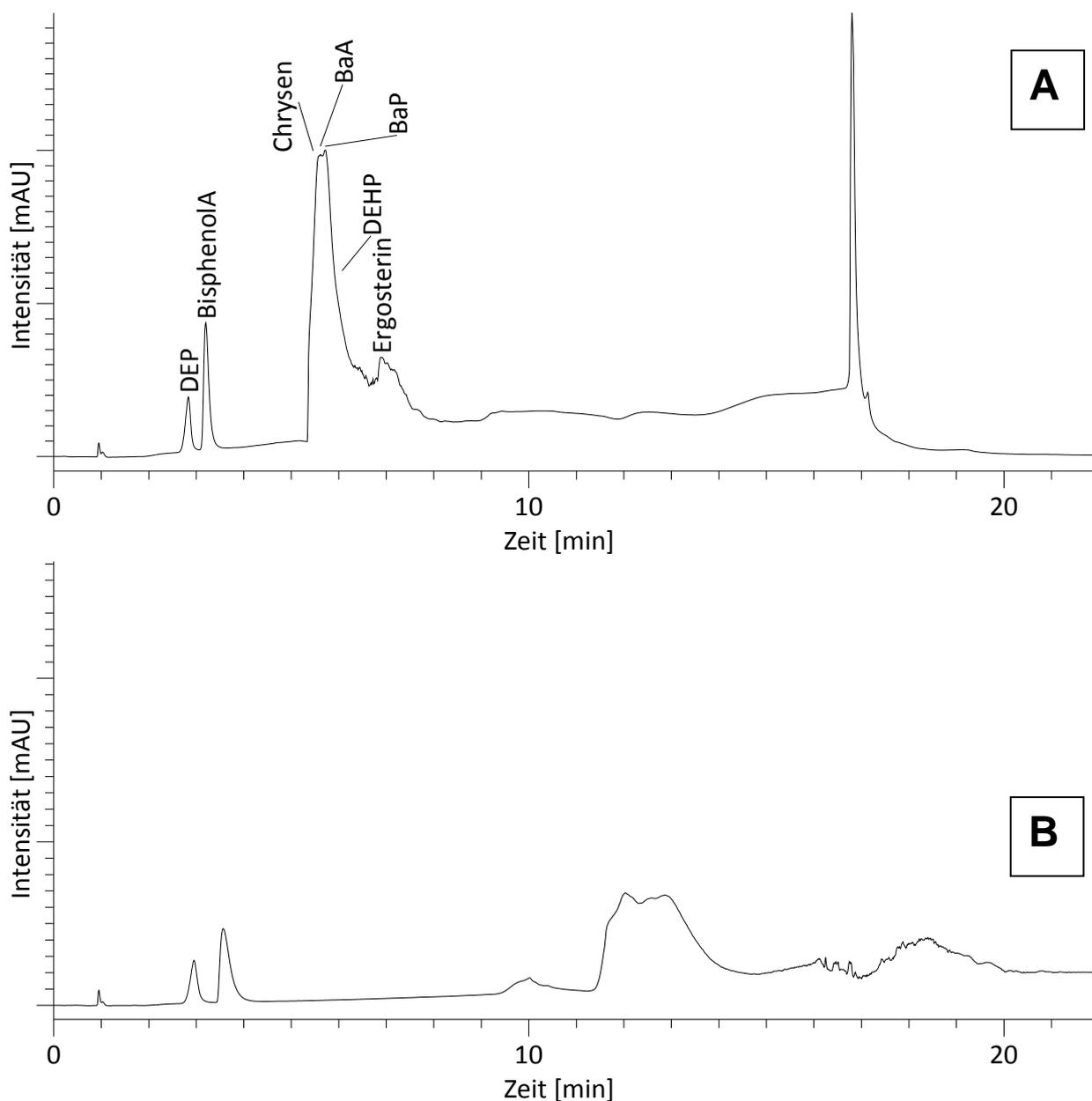


Abbildung 2-14: Basismessung 5. Trennung der Analyten aus Gruppe I mit Wasser und Tetrahydrofuran als mobiler Phase auf einer ZirChrom-PBD-Säule (150 x 2,1 mm, 3 µm). Chromatografische Bedingungen: Temperatur: 120 °C, Flussrate: 0,4 mL min⁻¹, Lösungsmittelgradient von 2 auf 100% B in 10 min (A) und in 30 min (B), Detektion: UV bei 254 nm.

2.5.4 Simulation der Retentionsdaten

In Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6 sind die mittels DryLab berechneten Retentionsdaten der einzelnen Analyten dargestellt. Ziel war es, die Substanzen innerhalb eines Lösungsmittelgradienten von 0-20% B innerhalb von 60 Minuten zu eluieren. Um die Unterschiede zwischen den stationären und mobilen Phasen zu verdeutlichen, wurden für die Simulation vergleichbare Bedingungen gewählt.

Tabelle 2-5: Berechnete Retentionsfaktoren k für die Simulation eines Lösungsmittelgradienten von 0-20% B in 60 min auf Grundlage der Daten der Basismessungen mittels HPLC-UV-Detektion. Stationäre Phase A: Waters XBridge C18 50 x 3,0 mm, 2,5 µm; Stationäre Phase B: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 3 µm, Temperatur: 120 °C.

Analyt		DEP	Bisphenol A	Benz[a]-anthracen	Chrysen	Benzo[a]-pyren	DEHP	Ergosterin
Lösungsmittelsystem	Stationäre Phase							
H ₂ O/Methanol	A	71,8	113	431	453	642	> 4500	>4500
	B	2,84	3,16	123	123	370	278	>1500
H ₂ O/Acetonitril	A	67,5	85,7	277	287	330	>2600	>3000
	B	4,89	6,84	86,7	84,1	89,2	493	669
H ₂ O/Ethanol	A	57,1	72,6	261	272	308	>1700	>3100
	B	6,09	6,54	217	88,4	142	90,8	>1000
H ₂ O/2-Propanol	A	37,7	46,6	200	208	228	477	615
	B	5,93	5,40	159	69,9	108	68,9	76,9
H ₂ O/Tetrahydrofuran	A	33,1	45,2	196	205	213	477	496
	B	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 2-6: Berechnete Retentionsfaktoren k für die Simulation eines Gradienten von 0-20% B in 60 min auf Grundlage der Daten der Basismessungen mittels HPLC-MS-Detektion, Temperatur: 120 °C.

Stationäre und mobile Phase Analyt	Waters XBridge 50 x 3,0 mm, 2,5 µm (mobile Phase: Wasser/Methanol + Ammoniumformiat, Essigsäure pH 3)	ZirChrom-PBD 50 x 2,1 mm, 3 µm (mobile Phase: Wasser/Methanol + Ammoniumformiat, Essigsäure pH 3)	ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm 3 µm (mobile Phase: Wasser/Methanol + Ammoniumformiatpuffer pH 3)
Roridin A	175	5,66	24,2
Aflatoxin B1	52,9	2,55	4,06
Diacetoxyscirpenol	67,5	0,78	1,96
Aflatoxin B2	48,1	2,06	2,86
Gliotoxin	42,8	1,44	2,64
Zearalenon	120	15,2	28,0
Sterigmatocystin	128	19,1	46,2
Stachybotrylactam	207	19,0	51,8

Anhand der berechneten Retentionsfaktoren lässt sich die unterschiedliche Elutionskraft der organischen Lösungsmittel verdeutlichen. Der unpolare Analyt DEHP weist auf der ZirChrom-PBD-Trennsäule und unter Verwendung von Methanol als Co-Solvenz in der mobilen Phase einen Retentionsfaktor von 278 auf, was einer Laufzeit von ca. 180 Minuten entspricht. Unter Verwendung von 2-Propanol als organisches Co-Solvenz kann der Retentionsfaktor auf 68,9 reduziert werden, was einer Laufzeit von ca. 40 Minuten entspräche. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die Auswahl des organischen Co-Solvenz einen entscheidenden Einfluss auf die Laufzeit hat und das zu analysierende Substanzspektrum deutlich erweitert werden kann, wenn ein unpolares Lösungsmittel als Methanol verwendet wird. Allerdings ist anzumerken, dass das für die Chromatografie optimale Lösungsmittelsystem nicht notwendigerweise auch für die Kopplung mit dem Enzymsystem kompatibel ist. Für eine weitergehende Diskussion sei an dieser Stelle auf die in Kapitel 2.8 aufgeführten Ergebnisse zur Kompatibilität verschiedener Enzymsysteme verwiesen.

Des Weiteren wird an den in Tabelle 2-5 aufgeführten Daten auch der Einfluss der verwendeten stationären Phasen auf die Analysenzeit deutlich. Grundsätzlich werden niedrigere Retentionsfaktoren für alle Analyten erhalten, wenn anstelle der Waters XBridge Säule die ZirChrom-PBD-Trennsäule verwendet wird. Dies ist eindeutig auf die geringere Hydrophobizität der mit Polybutadien beschichteten Metalloxid-Phase zurückzuführen. Ergosterin lässt sich auf der Waters XBridge Trennsäule unter den gegebenen Bedingungen nicht mit einer praktikablen Analysenzeit eluieren, selbst wenn Tetrahydrofuran als organisches Co-Solvenz verwendet wird. Im Gegensatz dazu ist eine Elution mit einem Retentionsfaktor von 77 auf der ZirChrom-PBD-Trennsäule und Isopropanol in der mobilen Phase möglich. Somit sollte sich die Auswahl der stationären Phase immer nach dem ausgewählten Enzymsystem und dem zu erwartenden Substanzspektrum richten. Für eine weitergehende Diskussion in Bezug auf die in diesem Projekt untersuchten Enzymsysteme sei an dieser Stelle auf das Kapitel 2.6.3 verwiesen.

2.5.5 Korrelation der simulierten Retentionsdaten mit dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Während die Waters XBridge- und die ZirChrom-PBD-Trennsäule die semi- bis unpolaren Analyten der Gruppe I aus Tabelle 2-2 aufgrund ihrer Polarität (vgl. logP) eluiert, lässt sich dieser Trend nicht für die Messungen der polaren Mykotoxine feststellen. Werden die logP Werte aller verwendeten Analyten in Abhängigkeit der berechneten Retentionsfaktoren dargestellt, so lässt sich dieser Effekt am anschaulichsten anhand des Korrelationskoeffizienten erkennen.

Während die Berechnungen für die semi- und unpolaren Analyten (HPLC-UV-Messungen) für beide stationären Phasen eine Abhängigkeit des Retentionsfaktors von den logP Werten der einzelnen Substanzen in Abbildung 2-15 erkennen lassen ($R^2 > 0,9$), kann für die polaren Analyten (HPLC-MS-Messungen) in Abbildung 2-16 nur ein sehr geringer statistischer Zusammenhang (ZirChrom-PBD $R^2 > 0,6$) bzw. für die Waters XBridge kein statistischer Zusammenhang ($R^2 < 0,6$) hergestellt werden. Hierbei muss aber beachtet werden, dass es sich um simulierte Retentionsdaten handelt und für die Korrelation der MS-Daten die Werte für Roridin A aufgrund zu hoher Abweichungen nicht in das Diagramm einbezogen wurden. Im folgenden Kapitel wird näher auf den Fehler der Simulation eingegangen.

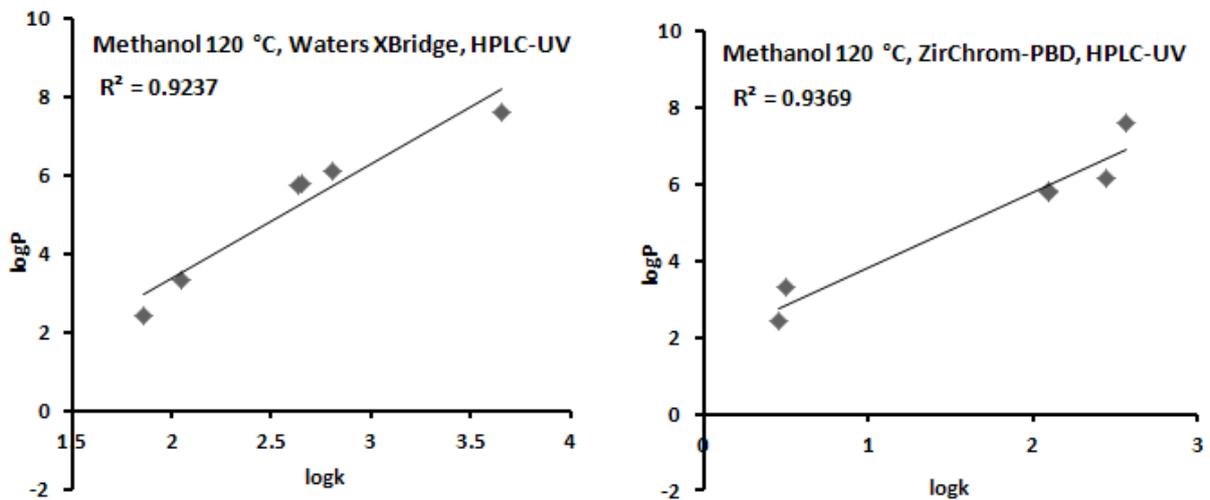


Abbildung 2-15: LogP in Abhängigkeit des Retentionsfaktors für berechnete logk Werte der mittels HPLC-UV-Detektion bestimmten Substanzen bei 0-20% B in 60 min und einer Temperatur von 120 °C.

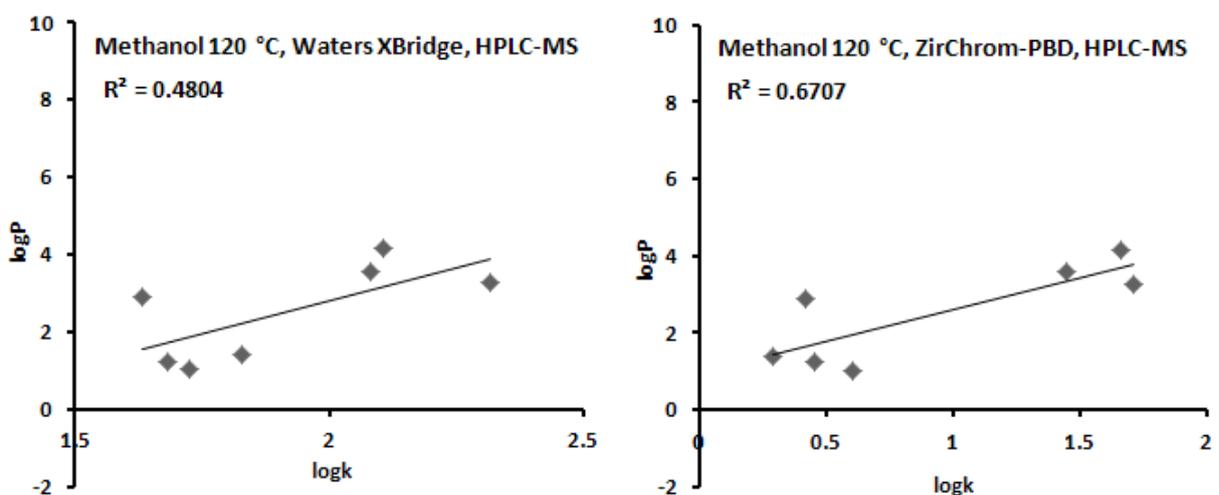


Abbildung 2-16: LogP in Abhängigkeit des Retentionsfaktors für berechnete logk Werte der mittels HPLC-MS-Detektion bestimmten Substanzen bei 0-20% B in 60 min und einer Temperatur von 120 °C.

2.5.6 Evaluierung der simulierten Methoden

2.5.6.1 Semipolare und unpolare Marker

In Tabelle 2-7 sind die experimentellen Daten der Überprüfungsmessungen den simulierten Retentionsdaten gegenübergestellt. Hierzu wurden anhand der Basismessungen Chromatografierläufe simuliert. Ziel war es, wie schon in der Simulation, die ausgewählten Analyten aus Tabelle 2-2 mit einem Lösungsmittelgradienten von 0-20% B innerhalb von 60 Minuten zu eluieren. Um die Grenzen der Methode zu definieren, wurde die höchstmögliche Temperatur gewählt. Der Temperaturbereich der Simulationen ist durch die Basismessungen limitiert, da lediglich eine Extrapolation von 5% über der maximalen Temperatur der Basismessungen möglich war. Die erhaltenen Retentionsdaten wurden in Tabelle 2-7 mit den simulierten Daten verglichen, um die Differenz zwischen der simulierten und experimentell bestimmten Retentionszeit zu errechnen. Die jeweils zuletzt eluierenden Analyten wurden nicht in die Überprüfungsmessungen einbezogen, da anhand der Simulationsdaten deutlich wird, dass eine Elution unter diesen Bedingungen mit extrem langen Laufzeiten von mehr als 1000 min verbunden wäre. Die Evaluierung der Daten ergab einen maximalen Fehler von 27,1% für die Elution von Benzo[a]pyren bei Verwendung der ZirChrom-PBD-Phase. Hierbei ist anzumerken, dass mit steigendem Retentionsfaktor auch der Fehler steigt. Snyder et al. haben gezeigt, dass die Simulationen für Retentionsfaktoren über 25 ungenau werden, für Retentionsfaktoren über 100 wird sogar angenommen, dass nur noch Abschätzungen möglich sind²⁹. Trotz des teilweise großen Fehlers für einzelne Analyten konnte die Elutionsreihenfolge mittels Simulation für diese Analyten vorhergesagt werden. Anhand der Berechnungen kann darüber hinaus entschieden werden, ob die Elution der unpolaren Analyten unter den gegebenen Randbedingungen möglich ist. Eine Elution der stark hydrophoben Substanzen Diethylhexylphthalat und Ergosterin wäre mittels Methanol unter den angestrebten chromatografischen Bedingungen beispielsweise erst nach einer Laufzeit von 400 bzw. 600 Minuten möglich.

²⁹Snyder, L.R., and Quarry, M.A. (1987). Computer-Simulation in Hplc Method Development - Reducing the Error of Predicted Retention Times. *Journal of Liquid Chromatography* 10, 1789-1820.

Tabelle 2-7: Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Retentionsfaktoren für die mittels HPLC-UV-Detektion ausgewählten Substanzen, Lösungsmittelgradient: 0-20% B in 60 Minuten.

Stationäre und mobile Phase Analyt	WatersXBridge 159 °C, mobile Phase: Wasser/Methanol				ZirChrom-PBD 123 °C, mobile Phase: Wasser/Methanol			
	Retentionsfaktor k		Fehler Δk	Fehler [%]	Retentionsfaktor k		Fehler Δk	Fehler [%]
	Sim.	Exp.			Sim.	Exp.		
	DEP	23,2	21,4	1,8	8,4	4,30	3,68	0,6
Bisphenol A	44,4	43,9	0,5	1,1	4,18	3,60	0,6	16,1
Benz[a]anthracen	180	198	9,0	4,5	177	194	17,0	8,8
Chrysen	189	204	15	4,5	179	203	24,0	11,8
Benzo[a]pyren	233	260	27,0	10,4	422	332	90,0	27,1
DEHP	> 1800	-	-	-	> 500	-	-	-
Ergosterin	> 2000	-	-	-	> 2000	-	-	-

Solch lange Laufzeiten sind für die Anwendung des Verfahrens nicht praktikabel, weshalb die experimentelle Überprüfungsmessung der simulierten Retentionsdaten in Tabelle 2-7 nach 140 Minuten abgebrochen wurde. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass es mit zunehmender Retentionszeit zu starken Peakverbreiterungen kommt, die eine Auswertung der Daten unmöglich macht. An dieser Stelle sei auch auf die weiterführende Diskussion in Kapitel 2.11 verwiesen.

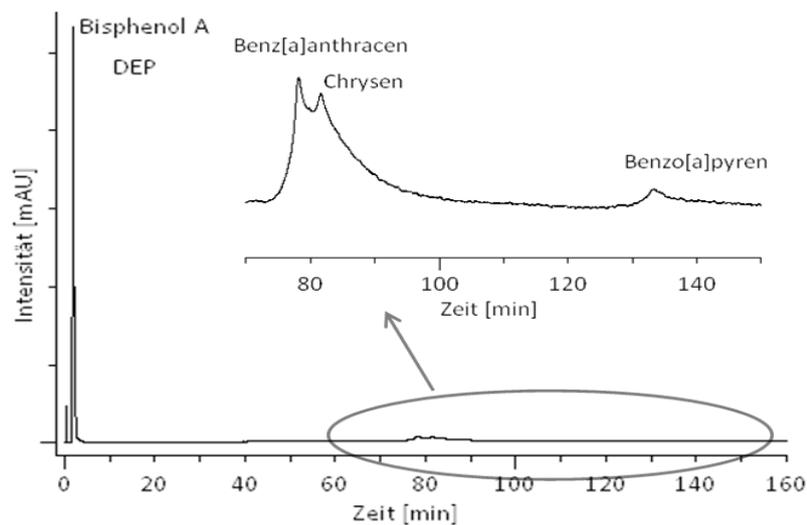


Abbildung 2-17: UV-Chromatogramm der Evaluierungsmessung mit Methanol, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 3 µm; Lösungsmittelgradient: 0-20% B in 60 min, Detektion: UV bei 254 nm.

Die Abbildung 2-17 zeigt exemplarisch, wie die aus langen Laufzeiten resultierende Bandenverbreiterung die Identifizierung der Analytpeaks erschweren kann. Nur durch den Abgleich mit den simulierten Daten konnte die Identifizierung der einzelnen Peaks vorgenommen werden. Analysenzeiten von mehr als 60 Minuten sind deshalb nicht anzustreben. Bei einer Laufzeit von mehreren Stunden ist auch die Stabilität der Substanzen nicht mehr zu vernachlässigen. Vor diesem Hintergrund muss, wenn die Analyse der unpolaren Substanzen im Fokus steht, eine Säule mit einer geringeren Hydrophobizität verwendet werden (siehe hierzu auch die Ausführungen in Kapitel 2.5.4).

2.5.6.2 Mykotoxine

In Tabelle 2-8 sind die experimentellen Daten der Überprüfungsmessungen den simulierten Retentionsdaten vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 2-8: Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Retentionsfaktoren für die Mykotoxine mittels HPLC-MS-Detektion.

Stationäre und mobile Phase Analyt	Retentionsfaktor k (Waters XBridge , Lösungsmittelgradient: 0-5, 6 min 5-20% Methanol, 5,6-17 min isokr. 20% B, Eluent mit 2 mmol L ⁻¹ Amm.formiat+Essigsäure, pH 3, T=153 °C).				Retentionsfaktor k (ZirChrom-PBD, Lösungsmittelgradient: 0-2 min isokr. 5% B, 2-10 min 5-20% B, 10-20 min isokr. 20% B, Eluent mit 2 mmol L ⁻¹ Amm.formiat+Essigsäure, pH 3, T=95 °C).				Retentionsfaktor k (ZirChrom-PBD, Lösungsmittelgra- dient: 0-60 min 0-20% B, Eluent mit 20 mmol L ⁻¹ Amm.formiatpuffer pH 3, T=120 °C).			
	Sim.	Exp.	Fehler Δk	Fehler [%]	Sim.	Exp.	Fehler Δk	Fehler [%]	Sim.	Exp.	Fehler Δk	Fehler [%]
Roridin A	34,3	34,3	0,0	0,0	6,58	9,89	3,3	0,3	16,4	16,2	0,2	1,2
Aflatoxin B1	10,8	10,2	0,6	5,9	5,11	5,64	0,5	9,4	3,10	3,12	0,02	0,6
Diacetoxyscirpenol	16,0	15,5	0,5	3,2	1,00	1,03	0,03	2,9	1,62	1,44	0,2	12,5
Aflatoxin B2	9,44	9,15	0,29	3,2	3,53	3,50	0,03	0,9	2,38	2,27	0,1	4,8
Gliotoxin	8,89	8,44	0,45	5,3	2,08	1,97	0,1	5,6	1,94	1,88	0,1	3,2
Zearalenon	22,7	22,9	0,2	0,9	29,3	28,7	0,6	2,1	22,0	20,6	0,4	6,8
Sterigmatocystin	26,2	26,2	0,0	0,0	33,9	37,9	4,0	10,6	32,3	32,3	0,0	0,0
Stachybotrylactam	42,3	42,0	0,3	0,7	27,1	27,6	0,5	1,8	40,9	34,3	6,6	19,2

Anhand der Basismessungen wurde ersichtlich, dass viele Analyten aus dieser Gruppe mit der Totzeit t_0 eluieren. Demzufolge wurden die ersten beiden Messungen isokratisch begonnen (siehe Tabelle 2-8, Spalte 1 und 2). Zusätzlich zu den trotzdem noch sehr frühen Elutionszeiten zeigte sich, dass der Fehler zwischen Simulation und Experiment stark variiert, besonders für die ZirChrom-PBD-Säule. Eine Erklärung hierfür könnten ionische Wechselwirkungen zwischen Analyt und der stationären Phase sein. Um diese zu kontrollieren, wurde die mobile Phase in einem weiteren Experiment mit Ammoniumformiat versetzt (Tabelle 2-8, Spalte 3), während in den Messungen zuvor der pH-Wert mit Essigsäure eingestellt und somit kein Puffersystem verwendet wurde. Zusätzlich wurde ein einfacher linearer Lösungsmittelgradient angewendet, um einen eventuellen Fehler durch den vorher angewandten komplexeren Lösungsmittelgradienten zu verringern. Durch die gleichzeitige Zugabe von Ammoniumformiatpuffer in diesen Messungen konnte der Fehler zwischen den simulierten und experimentellen Retentionsfaktoren für die Analyten Aflatoxin B1 und Sterigmatocystin deutlich reduziert werden. Allerdings nahm dieser Fehler für die Substanzen Diacetoxyscirpenol und Stachybotryslactam im Vergleich zu den Messungen mit Essigsäure zu. Dieses Beispiel belegt sehr deutlich, welchen Einfluss unterschiedliche Additiva auf die Chromatografie der ZirChrom-PBD-Phase haben. Für die Kopplung der HT-HPLC mit einem Enzym-Assay muss beachtet werden, dass der pH Wert nicht nur einen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme hat, sondern auch auf die Chromatografie.

2.5.7 Zusammenfassung

Es bleibt festzuhalten, dass mit einem maximalen Fehler von ca. 20% gerechnet werden muss, unabhängig von der Art des verwendeten Lösungsmittelgradienten und der pH-Additiva im Eluenten. Dieser Fehler ist jedoch für eine Abschätzung der Retentionszeiten vollkommen akzeptabel, da in diesem Fall nicht die exakte Vorhersage der Retentionszeit und chromatografischen Auflösung im Vordergrund steht, sondern lediglich eine Aussage erwartet wird, ob ein bestimmter Analyt unter den gegebenen chromatografischen Randparametern von der Säule eluiert werden kann. Weiterhin liefert die Abschätzung des Elutionsverhaltens Aussagen über die Polarität möglicher Inhibitoren. Somit kann gleichzeitig ein Zusammenhang zwischen Elution und der Affinität einer Substanz zum aktiven Zentrum bestimmter Enzyme hergestellt werden. Durch die Auswahl von Substanzen verschiedener Polaritäten wie beispielsweise den polaren Mykotoxinen mit logP Werten unter 1 und dem unpolaren Ergosterin, sollte die Matrix Hausstaub für die Methodenentwicklung mittels Simulationssoftware dargestellt werden.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass für die Analyse komplexer Proben sowohl die hydrophobere Waters XBridge-Trennsäule als auch die weniger hydrophobe ZirChrom-PBD-Trennsäule in Frage kommen. Für die HT-HPLC sind diese stationären Phasen essentiell, da sie im Vergleich zu konventionellen HPLC Phasen eine ausreichende Temperaturstabilität bieten^{30, 31}. Für die Kopplung mit dem Online-Enzym-Assay steht die Elution von polaren und semipolaren Substanzen im Vordergrund. Mit der weniger hydrophoben ZirChrom-PBD-Phase war es möglich, diese Substanzklassen auch mit einem Lösungsmittel geringer Elutionskraft wie Methanol unter den für die Kopplung angestrebten Bedingungen zu eluieren. Auch konnte gezeigt werden, dass stark unpolare Substanzen wie beispielsweise DEHP auf der ZirChrom-Phase weniger stark retardiert wurden als von der Waters XBridge Phase. Somit kann davon ausgegangen werden, dass störende unpolare Matrixbestandteile nach der Probenaufgabe leichter von der Säule entfernt werden können. Dies könnte einen erheblichen Einfluss auf die Langlebigkeit der verwendeten Säule haben. Zusätzlich wird so vermieden, dass Substanzen erst in einem späteren Chromatografielauf eluieren und das Ergebnis verfälschen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden alle weiteren Untersuchungen auf der ZirChrom-PBD-Trennsäule durchgeführt (siehe hierzu die Ausführungen in den Kapiteln 2.9 und 2.11).

³⁰Wiese, S., Teutenberg, T., Börgers, A., and Hollebeckers, K. (2008). Stability of various reversed-phase stationary phases in highly aqueous eluents and at high eluent temperatures. In Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA), Department of Chemistry. (Duisburg, Germany: University of Duisburg-Essen).

³¹Teutenberg, T., Hollebeckers, K., Wiese, S., and Boergers, A. (2009). Temperature and pH-stability of commercial stationary phases. *Journal of Separation Science* 32, 1262-1274.

2.6 Modifizierung und Evaluierung der Robotereinheit (Advion) zur massenspektrometrischen Untersuchung von enzymatischen Aktivitäten

2.6.1 Allgemeiner Ablauf enzymatischer Reaktionen

Enzyme sind Proteine und fungieren als sogenannte Biokatalysatoren, indem sie Reaktionen beschleunigen. Substrate S sind Ausgangsstoffe der Reaktion und werden im aktiven Zentrum des Enzyms E gebunden, wobei ein Enzym-Substrat-Komplex entsteht. Das Substrat wird anschließend zu einem oder mehreren Produkten umgesetzt (Abbildung 2-18 (a)). Klassischerweise werden Enzymreaktionen photometrisch, elektrochemisch oder radiometrisch untersucht. Der Nachteil dieser Verfahren ist, dass beispielsweise bei photometrischen Ansätzen markierte Substrate mit chromophoren Gruppen verwendet werden. Bei der Auswertung kann somit nur eine Spur, entweder die Produkt- oder Substratspur, beobachtet werden³². Der Vorteil der massenspektrometrischen Analyse ist die Detektion aller Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z), sodass die gleichzeitige und kontinuierliche Messung von Substrat und Produkt(en) sowie von Zwischenprodukten, wie in Abbildung 2-18(b) dargestellt, möglich ist^{33, 34}.

³² Bisswanger, H. (2007). Practical Enzymology, (Weinheim: WILEY-VCH).

³³ Denhart, N., and Letzel, T. (2006). Mass spectrometric real-time monitoring of enzymatic glycosidic hydrolysis, enzymatic inhibition and enzyme complexes. Anal Bioanal Chem 386, 689-698.

³⁴ Liesener, A., and Karst, U. (2005). Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. Anal Bioanal Chem 382, 1451-1464.

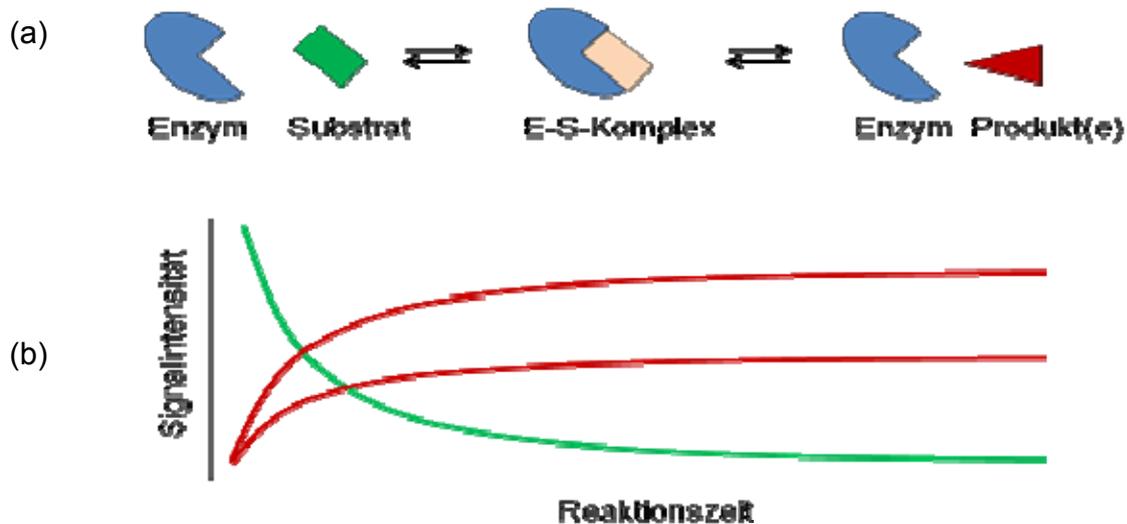


Abbildung 2-18: Schematische Darstellung einer Enzymreaktion (a) und Messung von Substrat- und Produktspeuren in Echtzeit mittels Massenspektrometrie (b). E: Enzym; S: Substrat.

Für die massenspektrometrische Detektion muss eine Anpassung hinsichtlich der Kompatibilität mit dem massenspektrometrischen System erfolgen. Hierzu werden unter anderem Puffer und pH-Werte variiert und die Konzentrationen der Reaktionspartner (Enzym, Substrat, Regulatoren) an die veränderte Sensitivität der massenspektrometrischen Detektion angepasst. Um hier möglichst viele Parameter abzudecken, kam eine über das Projekt angeschaffte Robotereinheit „Nanomate“ (Firma Advion BioSciences) zum Einsatz, die eine Automatisierung und Miniaturisierung des Messansatzes ermöglicht (Abbildung 2-19). Auf diese Art können die verschiedenen Parameter einer enzymatischen Messung sehr schnell modifiziert und somit für die massenspektrometrische Detektion optimiert werden.

Neben der Robotereinheit wurden die Enzymreaktionen auch mittels konventioneller Messmethoden, wie z. B. über direkte Injektion mittels Spritzenpumpe, gemessen³⁵. Dies ermöglicht gleichzeitig die Charakterisierung und Evaluierung der Robotereinheit.

Abbildung 2-19 zeigt schematisch den Messaufbau für die Messung von Enzymreaktionen mittels Spritzenpumpenansatz und der Robotereinheit. Die vielfältigen Vorteile des Robotersystems sind in Tabelle 2-9 zusammengestellt³⁶.

³⁵ Letzel, T. (2008). Real-time mass spectrometry in enzymology. *Anal Bioanal Chem* 390, 257-261.

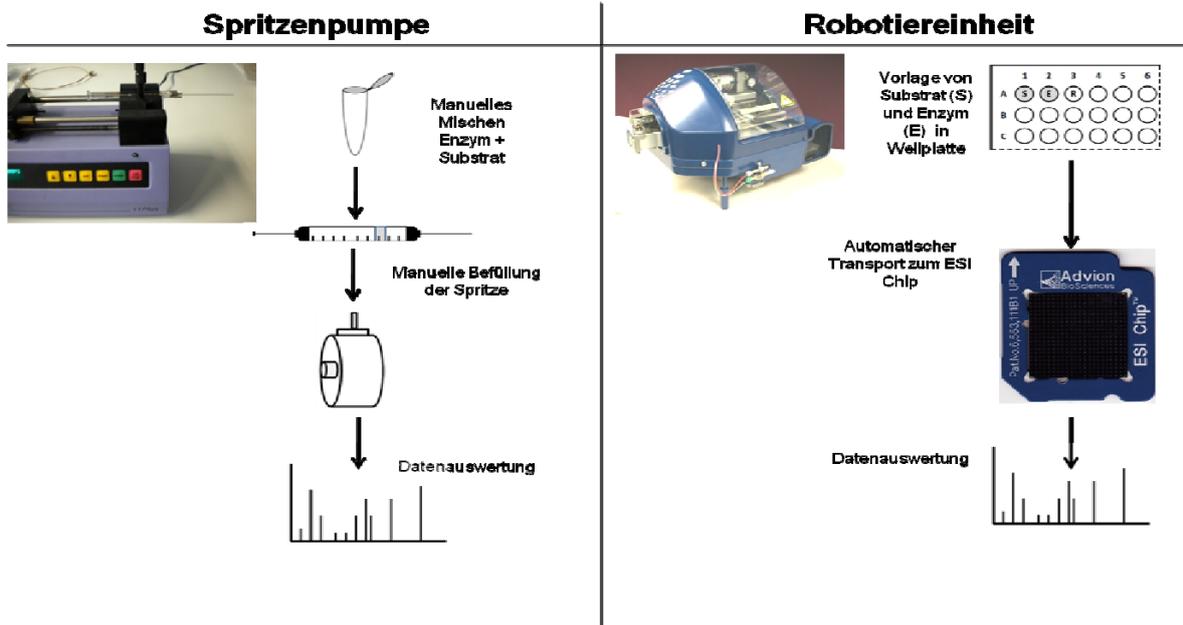


Abbildung 2-19: Schematischer Aufbau und Messung von Enzymreaktionen mittels Spritzenpumpe und Robotereinheit.

Um die Enzyme in ihrer aktiven Form zu behalten, werden Enzym-Assays in wässrigen Pufferlösungen gemessen. Die Messung von wässrigen Lösungen mit der Robotereinheit ist allerdings schwierig im Vergleich zur Messung von Lösungen, die ein organisches Co-Solvenz enthalten. Dies liegt vor allem an dem Aufbau der Robotereinheit, welche als Ionenquelle den sogenannten nanoESI-Chip besitzt. Die Messlösung wird durch diesen Chip gesprüht, welcher aus 20 x 20 Kanälen mit 5 µm Innendurchmesser besteht. Dieser Chip entspricht in einem massenspektrometrischen System der „konventionellen“ Ionenquelle (z. B. ESI-Quelle) und kann mit Flussraten im Nanoliter-Bereich betrieben werden.

³⁶ Scheerle, R.K., and Grassmann, J. (2011). LC-MS for the Determination of the Enzymatic Activity of Proteins. In Protein and Peptide Analysis by LC-MS, T. Letzel, ed. (Cambridge: Royal Society of Chemistry), pp. 133-141.

Tabelle 2-9: Gegenüberstellung der massenpektrometrischen Messung von Enzymreaktionen mit Spritzenpumpe und mit der Robotereinheit „Nanomate“.

Parameter	Spritzenpumpe	Robotereinheit	Vorteil Robotereinheit
Mixvorgang	manuell	automatisch	Automatisierung
Reaktionsgefäß	1-2 mL-Reaktionsgefäß, Volumen: 1-2 mL	Well einer 96-well Platte, Volumen: 200 µL	Miniaturisierung
Gesamtvolumen Enzym-Assay	~ 1 mL	~ 20 µL	Miniaturisierung
Infusionsprozess	manuelles Verbinden von Mikroliterspritze mit Spritzenpumpe, Verbindungen über Tubings	automatisch über Pipettenspitze	Miniaturisierung, Automatisierung
Infusionsvolumen	abhängig von Messzeit und Spritze, hier: 100 µL	maximal 15 µL	Miniaturisierung
Flussrate	5 µL min ⁻¹	100-200 nL min ⁻¹	Miniaturisierung
Zeitverlust zu Beginn der Messung	2 -3 min (manuelles Mischen, Füllen der Spritze, Verbindungstubing)	1 min (automatisches Mischen und Transfer zum Chip)	Automatisierung
Ionisierung	ESI-Quelle	nanoESI-Chip	Miniaturisierung

Aufgrund der hohen Oberflächenspannung wässriger Lösungen ist es schwierig, über einen längeren Zeitraum ein konstantes Elektrospray zu generieren^{37, 38}. Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Messung von Lösungen mit Proteinen erfolgt. Die Größe der Moleküle sowie Denaturierungsprozesse können zur Verstopfung dieser kleinen Kanäle führen. Als Folge blockieren die Kanäle langsam, was zu einem kontinuierlichen Abfall des Elektrosprays führt. Über die Messung des Stroms am nanoESI-Chip und ein damit verbundenes Sensorsystem wird dies am Chip registriert und der Kanal im Chip bei einem gewissen Wert gewechselt. Anschließend wird durch einen neuen Kanal gesprüht, um wiederum ein stabiles Spray zu erhalten (Abbildung 2-20).

³⁷ Van Pelt, C., Zhang, S., and Henion, J. (2002). Characterization of a fully automated nanoelectrospray system with mass spectrometric detection for proteomic analyses. *J Biomol Tech* 13, 72-84.

³⁸ Scheerle, R., Grassmann, J., and Letzel, T. (2011). Enzymatic conversion continuously monitored with a robotic nanoESI-MS tool: Experimental status. *Anal. Methods* 3, 822-830.

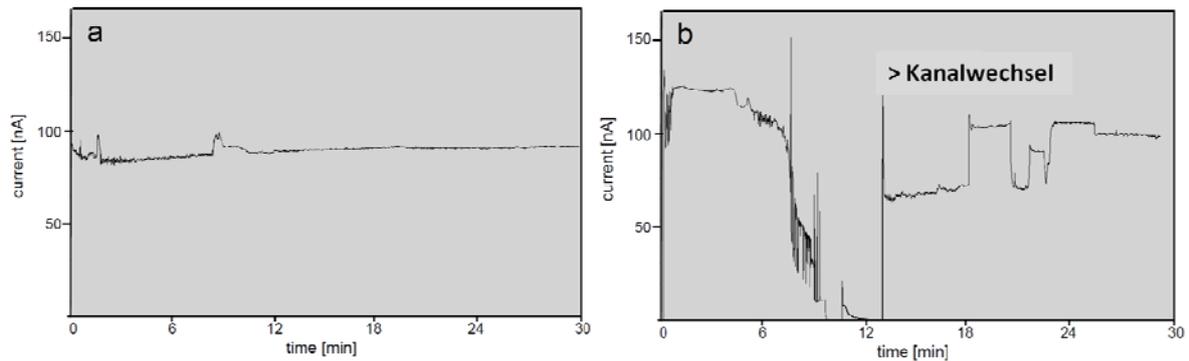


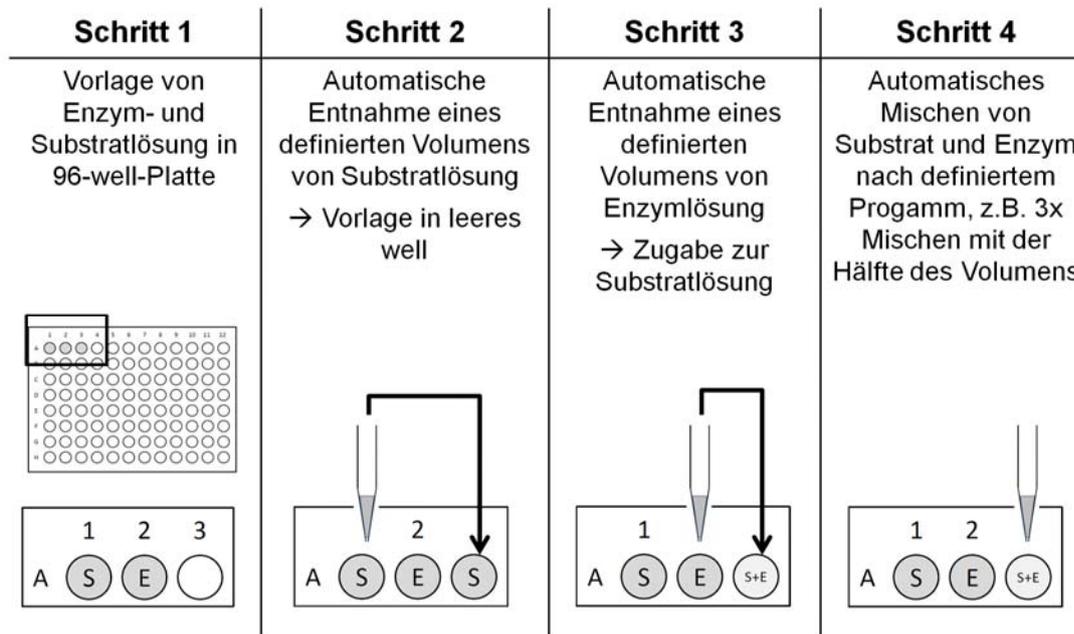
Abbildung 2-20: Verlauf des nanoESI-Elektrosprays einer wässrigen Probelösung über eine Messzeit von 30 Minuten: (a) stabiler und (b) instabiler Sprayverlauf.

2.6.2 Verschiedene Modifikationen der Robotereinheit

Um die Enzym-Assays trotz der geschilderten Schwierigkeiten mit der Robotereinheit zu messen, wurden verschiedene Modifikationen der Robotereinheit getestet. Die einzelnen Setups werden im Folgenden erläutert.

2.6.2.1 Setup 1: Infusion

In diesem Setup wird der „klassische“ unmodifizierte Robotierarm mit Pipettenspitze verwendet. Die Enzym- und Substratlösungen werden mit der Pipettenspitze pipettiert, gemischt und in diese wieder aufgezogen. Die Lösung reagiert in der Pipettenspitze und wird so zum ESI-Chip transportiert und mit ca. $100\text{-}200\text{ nL min}^{-1}$ versprüht. An der Pipettenspitze liegt über die gesamte Messzeit ein geringer Druck und eine Spannung von 1,5 bis 2 kV an (Abbildung 2-21, Schritt 5). Mit diesem Setup wurden verschiedene Enzymreaktionen gemessen. Eine Schwierigkeit in diesem System ist die Bildung eines stabilen Nanoelektrosprays über die gesamte Reaktions- und Messzeit.



Schritt 5

Aufnahme der Enzym-Substrat-Mischung in beschichtete Pipettenspitze und Transport der Probe zu Kanal im ESI-Chip. Anlegen von Druck und Spannung an die Pipettenspitze. Messung der Proben am MS. Kontrolle des Nanoelektrospray über Strom am Chip.

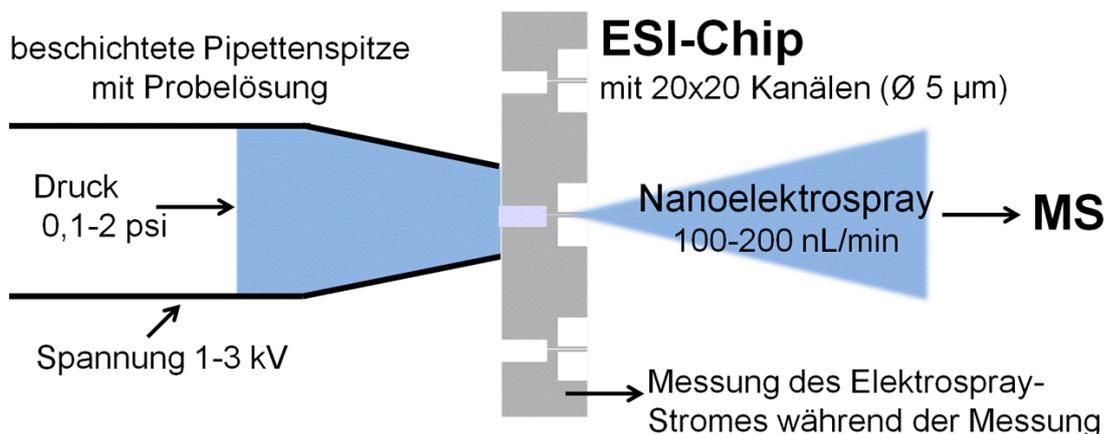


Abbildung 2-21: Messung eines Enzym-Assays mit dem "Infusion"-Setup im Robotiersystem mit den einzelnen Pipettierschritten. Schritt 5 zeigt die Bildung des Nanoelektrosprays mit dem ESI-Chip.

Aufgrund der hohen Oberflächenspannung wässriger Lösungen können die feinen Kanäle im Chip schnell blockiert werden, was zu Spray- und somit Signalabbruch führt (Abbildung 2-22).

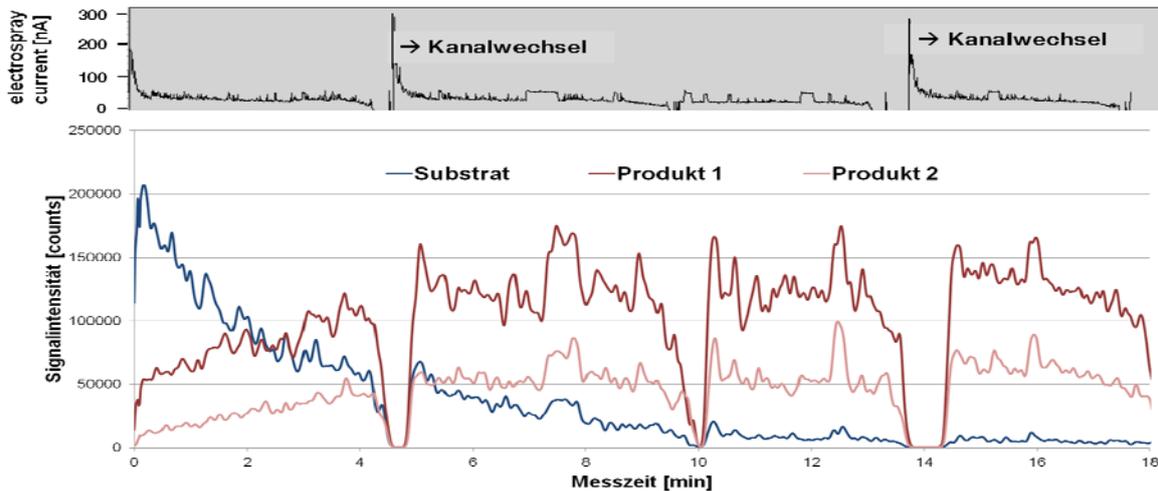


Abbildung 2-22: Messung eines Enzym-Assays im Infusionsmodus im Robotiersystem. Dargestellt sind die abnehmende Substratspur und zwei zunehmende Produktpuren. Signaleinbrüche durch Blockierung der Kanäle werden durch einen Strom am Chip (oben) und die Substrat- und Produktpuren massenspektrometrisch (unten) detektiert. Bei Signalabbruch wechselt die Robotiereinheit automatisch den Kanal.

Weiterhin kann es in diesem Setup zur Inaktivierung der Enzyme kommen. Die Enzym-Substrat-Lösung befindet sich während der Messzeit in der Pipettenspitze, an welche eine Spannung von 1,5 bis 2 kV angelegt wird (siehe Abbildung 2-21, Schritt 5). Empfindliche Enzyme werden dabei inaktiviert, wie aus einem Vergleich zwischen konventionellem Ansatz mit Spritzenpumpe und Robotiereinheit ersichtlich wird (Abbildung 2-23)³⁹. Abbildung 2-23 (a) zeigt einen Enzym-Assay mit Abbau von Substrat und der Bildung von zwei Produkten. Wird der Enzym-Assay mit den gleichen Konzentrationen mit der Robotiereinheit gemessen, so ist keine Substratabnahme und Produktzunahme zu erkennen (Abbildung 2-23 (b)). Erst die Erhöhung der Enzymkonzentration um das 5fache zeigt eine Enzymreaktion (Abbildung 2-23 (c)).

³⁹ Scheerle, R., Grassmann, J., and Letzel, T. (2011). Enzymatic conversion continuously monitored with a robotic nanoESI-MS tool: Experimental status. *Anal. Methods* 3, 822-830.

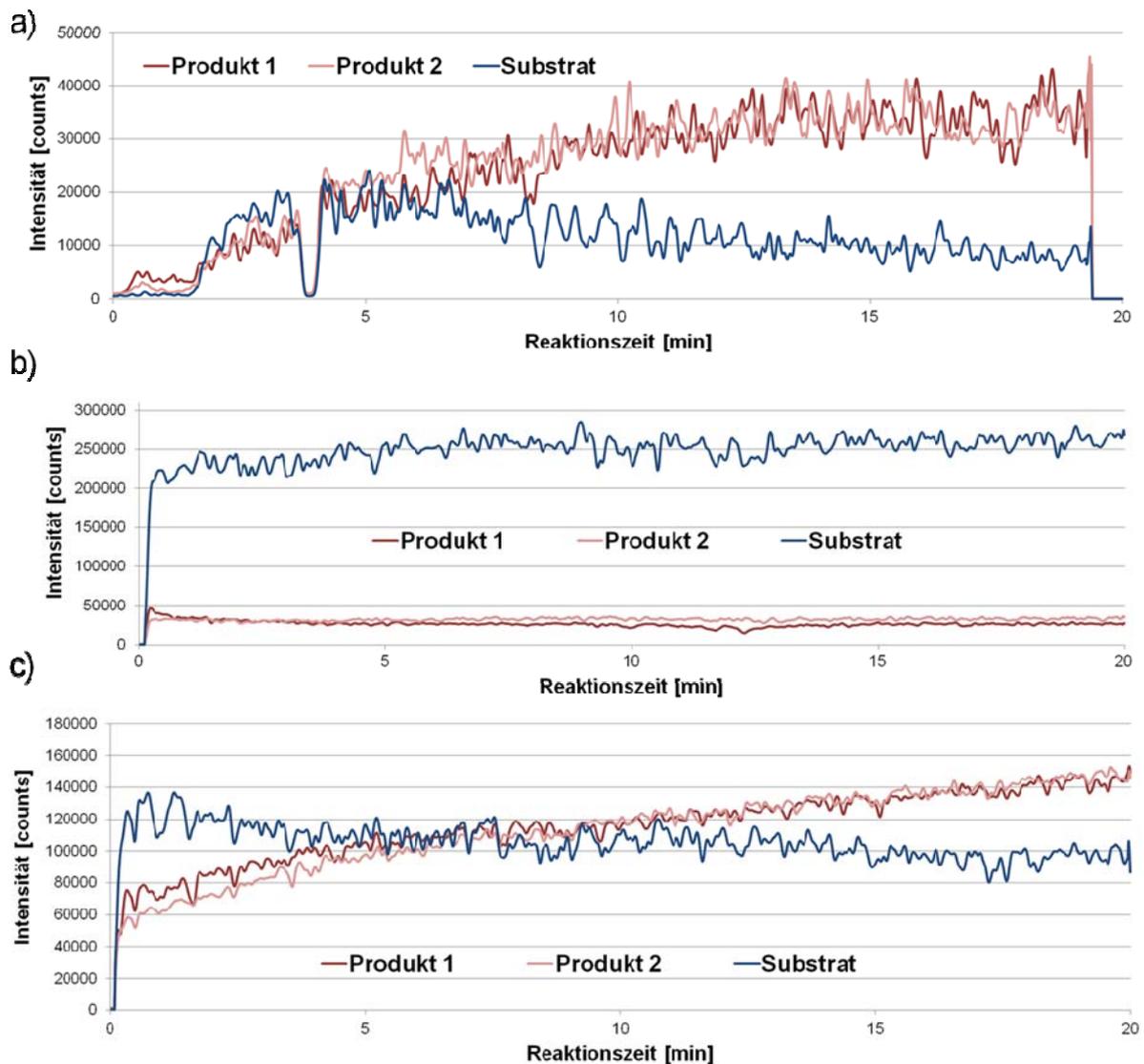


Abbildung 2-23: Vergleich eines Enzym-Assays gemessen mit (a) Spritzenpumpe und (b), (c) mit verschiedenen Konzentrationen im Infusionsmodus mit Robotereinheit.

Aufgrund der hohen Oberflächenspannung wässriger Lösungen kommt es zur Blockierung der Kanäle im Chip, was mit diesem Setup nicht zu beheben ist. Es muss ein Setup gefunden werden, das es erlaubt, dass auf die Lösung in der Pipettenspitze ein Druck angelegt wird, welcher die Lösung beim Durchfließen des Kanals unterstützt. Weiterhin muss die Inaktivierung der Enzyme durch die angelegte Spannung vermieden werden. Hierzu wäre ein modifizierter Roboterarm denkbar, bei dem die Lösung nur kurz mit der angelegten Spannung in Kontakt kommt.

2.6.2.2 Setup 2: Flow control

Bei diesem Setup wird ein modifizierter Robotierarm verwendet. Dieser ist nicht mehr wie in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben mit der integrierten Spritze verbunden, sondern an einen HPLC-Fluss gekoppelt, was einen höheren Druck auf die Lösung beim Sprühvorgang bewirkt. Die Lösungen werden über den modifizierten Roboterarm pipettiert und gemischt. Während des Sprühvorgangs drückt ein LC-Fluss auf die Lösung in der Pipettenspitze, was zu einer Flussrate zwischen 400 und 500 nL min⁻¹ führt.

Mit diesem Setup kann über die gesamte Messzeit ein stabiles Nanoelektrospray generiert werden. Durch den Druck des LC-Flusses auf die Enzym-Substrat-Lösung in der Pipettenspitze wird die Lösung kontinuierlich durch den Kanal im Chip gedrückt. Eine Blockierung bzw. Verstopfung der Kanäle wird hierbei nicht mehr beobachtet (Abbildung 2-24).

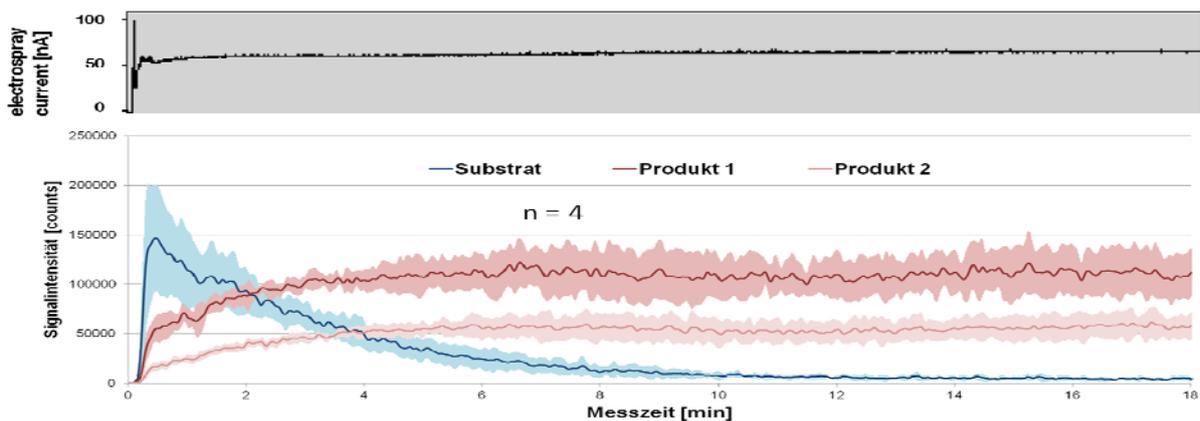


Abbildung 2-24: Messung eines Enzym-Assays mit der Robotiereinheit im Flow-Control-Modus. Der am Chip gemessene Strom (oben) und die massenspektrometrisch detektierten Substrat- und Produktpuren (unten) zeigen einen konstanten Verlauf (dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 Messungen).

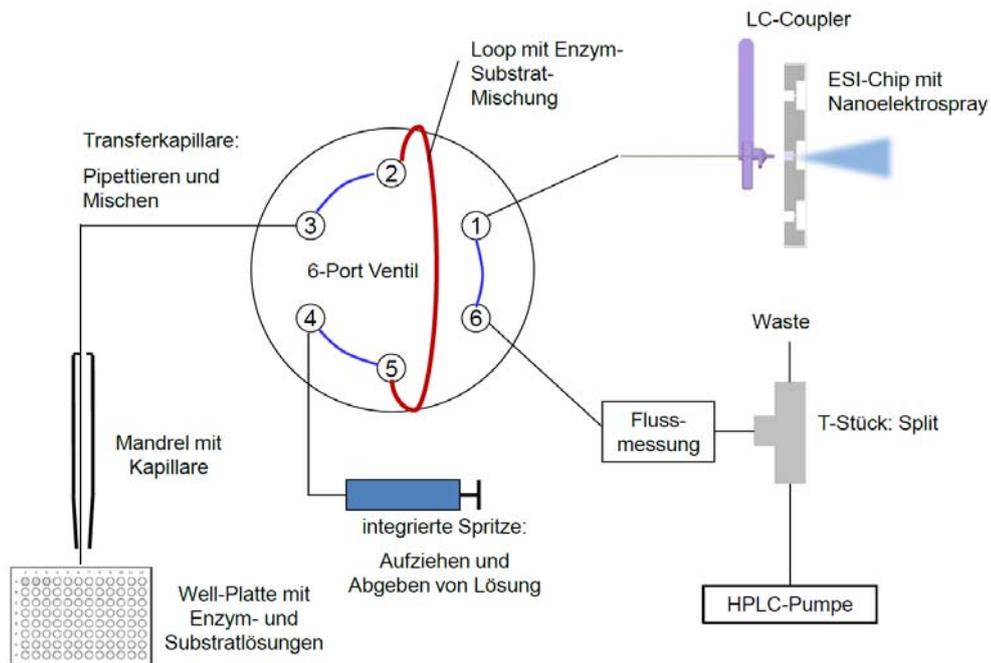
Mit diesem modifizierten Aufbau der Robotiereinheit kommt es nicht mehr zur Blockierung der Kanäle. Die erhöhte Flussrate von 400-500 nL min⁻¹ ist ausreichend, um die wässrige Lösung durch die Kanäle zu drücken. Um die Lösungen in diesem Setup zu pipettieren wird ein modifizierter, verkürzter Roboterarm verwendet. Hierbei handelt es sich um einen speziellen Aufbau, bei dem noch Probleme mit dem Aufstecken der Pipettenspitze auftreten und deshalb teilweise falsche Volumina pipettiert werden.

Der Sprühvorgang erfolgte jedoch wie auch im Infusionsmodus über die Pipettenspitze, an die die Spannung angelegt wird. Dies führt weiterhin zur Inaktivierung der Enzyme. Dies liegt daran, dass die Lösung, genauso wie in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben, die gesamte Messzeit über in Kontakt mit der angelegten Spannung ist. Vor diesem Hintergrund wurde dieser Versuchsaufbau nicht weiter modifiziert. Eine mögliche Lösung, um die Inaktivierung der Enzyme zu verhindern, ist ein Roboterarm mit integrierter Kapillare. Die Enzym-Substrat-Lösung befindet sich dann in der Kapillare, was bedeutet, dass die Spannung nicht direkt bzw. nur über eine kurze Zeit mit der Lösung in Berührung kommt. Diese Änderungen wurden im LC-Coupling Setup umgesetzt.

2.6.2.3 Setup 3: LC-Coupling

Bei diesem Aufbau wird ein 6-Port-Ventil mit zwei Schaltpositionen verwendet (Abbildung 2-25). In Position 1 wird die Enzym-Substratlösung mit einer Kapillare gemischt und in eine Schleife gezogen. Zum Zeitpunkt der Messung wird das Ventil in Position 2 geschaltet und ein LC-Fluss mit 500 nL min^{-1} transportiert die Lösung durch die Schleife zum ESI-Chip. Die Messungen von Enzymreaktionen mit diesem Setup zeigten die besten Ergebnisse. Über den gesamten Zeitraum konnte ein sehr konstantes Spray generiert werden. Die Flussrate von ca. 400 bis 500 nL min^{-1} liefert einen konstanten Fluss durch den Kanal im Chip und vermindert die Blockierung, ähnlich wie im Flow Control Setup (siehe Kapitel 2.6.2.2).

Position 1



Position 2

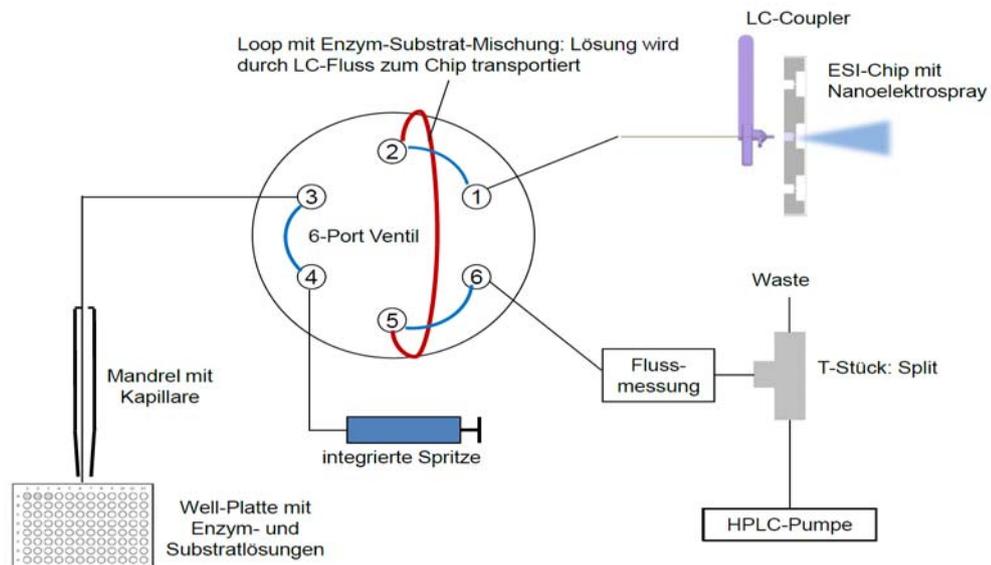


Abbildung 2-25: Schematischer Aufbau des Setups für LC-Kopplung im Robotersystem mit den zwei verschiedenen Schaltpositionen des Ventils. In Position 1 erfolgen die Pipettier- und Mischschritte, in Position 2 erfolgt die Messung der Enzymlyösung.

Als schwierig in diesem Setup erweist sich das automatische Pipettieren der Lösungen mittels integrierter Spritzenpumpe. Die Schnelligkeit des Aufziehens der Lösungen ist über die Software gesteuert und kann bisher nicht geändert werden. Durch zu schnelles Aufziehen der Probe sind die pipettierten Probevolumina ungenau. In diesem Setup müssen deshalb die Lösungen manuell gemischt werden. Abbildung 2-26 zeigt die Messung einer Enzymreaktion in diesem Setup. Es kann über die gesamte Messzeit ein sehr konstantes Signal erhalten werden. Die Messzeit kann über die Einstellung des LC-Flusses zwischen 10 und 30 min variiert werden.

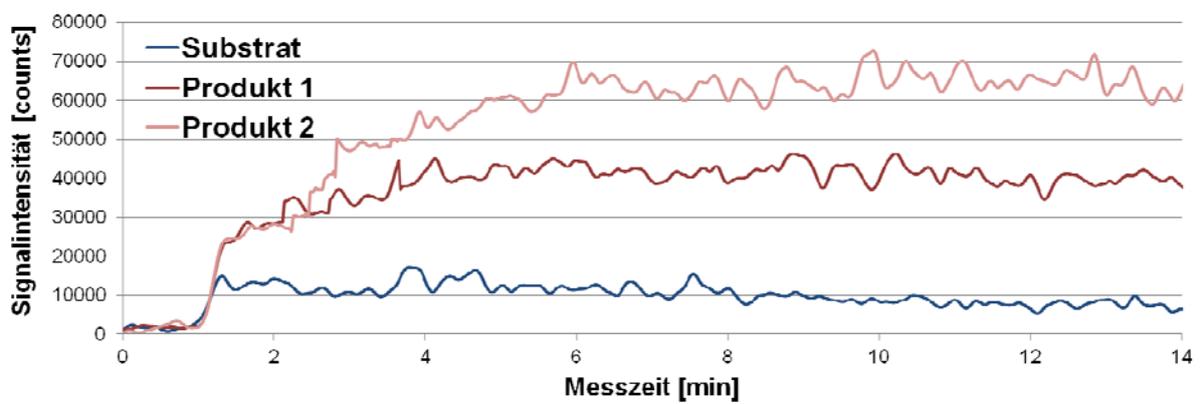


Abbildung 2-26: Verlauf eines Enzym-Assays mit dem LC-Coupling Setup im Robotiersystem.

Mit dieser Modifikation wurde die Robotereinheit für die Messung von wässrigen Enzymlösungen erfolgreich weiterentwickelt. Die Messung eines konstanten Signals über die gesamte Messzeit kann über die Einstellung der Flussrate durch den LC-Fluss optimiert werden. Durch Auswahl geeigneter Innendurchmesser der Kapillaren können Totzeiten minimiert, Verstopfungseffekte reduziert und die Menge an zu messender Lösung variiert werden. Durch geeignete Waschschrte nach der Messung können Kreuz-Kontaminationen über die Kapillare weitestgehend ausgeschlossen werden.

Tabelle 2-10 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieses Projekts entwickelten bzw. modifizierten Setups für die Messung von Enzymreaktionen mit dem Robotiersystem.

Tabelle 2-10: Übersicht und Vergleich aller vier Setups für die Messung von Enzymreaktionen mit dem Robotersystem.

Setup	Kreuz-Kontamination	korrektes Pipettieren	Blockierung der Nozzles	Inaktivierung der Enzyme
Infusion	☺	☺	☹	☹
Flow Control	☺	☹	☺	☹
LC-Kopplung	☺	☹	☺	☺

2.6.3 Optimierung und Etablierung von Enzym-Assays

Für dieses Projekt wurden verschiedene Enzym-Assays für die massenspektrometrische Messung entwickelt. Die Messung von Enzym-Assays mittels Massenspektrometrie ist im Vergleich zu photometrischen Messungen noch eine junge Technik, deren Entwicklung in der Literatur bereits beschrieben wurde^{40, 41, 42}. Wie in Kapitel 2.6 bereits erwähnt, werden Enzym-Assays klassischerweise photometrisch gemessen. Die Bedingungen und Parameter photometrischer Assays wurden als Grundlage für die Etablierung der Assays am Massenspektrometer herangezogen, sie können jedoch nicht direkt auf die massenspektrometrische Detektion übertragen werden. Ausgehend von bereits in der Literatur beschriebener Assays wurden die Assays auf das MS angepasst, wobei einige Parameter beachtet werden müssen. Diese sind in Tabelle 2-11 zusammengefasst.

⁴⁰ Letzel, T. (2008). Real-time mass spectrometry in enzymology. *Anal Bioanal Chem* 390, 257-261.

⁴¹ Liesener, A., and Karst, U. (2005). Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 382, 1451-1464.

⁴² Greis, K.D. (2007). Mass spectrometry for enzyme assays and inhibitor screening: An emerging application in pharmaceutical research. *Mass Spectrometry Reviews* 26, 324-339.

Tabelle 2-11: Gegenüberstellung der erforderlichen Parameter bei der Messung von Enzymreaktionen mittels Photometrie und Massenspektrometrie.

Parameter	Photometrie	Massenspektrometrie
Puffer	meist Verwendung von biologischen Puffern, z. B. Phosphatpuffer	es müssen leicht flüchtige Salze verwendet werden, wie z. B. ≈ 10 mM Ammoniumacetat, -hydrogencarbonat, -formiat
Substrat	markierte Substrate mit chromophorer Gruppe nötig oder gekoppelte Reaktionen mit Farbbildung	natürliche Substrate können verwendet werden
pH	pH-Optimum des Enzyms kann gewählt werden	sollte möglichst dem pH-Optimum des Enzyms entsprechen, aber auch wichtig für ausreichende Ionisierung der Substrat- und Produktmoleküle [27]
Salze	Konzentration und Zusammensetzung haben keinen Einfluss auf die photometrische Detektion	hohe Konzentrationen können zur Signalunterdrückung führen, Art der Salze hat Einfluss auf die Adduktbildung, z. B. in Anwesenheit von Na vermehrt $[M + Na]^+$ -Bildung
Zusätze, z. B. zur Stabilisierung von Proteinen, Verhinderung der unspezifischen Bindung der Proteine an Oberflächen	keinen Einfluss auf die photometrische Detektion	können zur Signalunterdrückung führen
Konzentrationen	Konzentration im Bereich der Absorption beliebig wählbar	zu hohe Konzentrationen können zu Signalunterdrückung im MS führen (Ablagerung)

Als Vorarbeit für die massenspektrometrische Messung wurden die Assays am Photometer vorbereitet. Hier wurde bereits getestet, ob die Enzymaktivität abweichend von den Literaturangaben für einen photometrischen Ansatz auch mit den massenspektrometrischen Bedingungen aufrechterhalten werden kann. Beispielsweise wurde der biologische Puffer durch einen 10 mM Ammoniumacetatpuffer ersetzt und die Enzym- und Substratkonzentrationen wurden an die massenspektrometrische Detektion angepasst.

Für die Etablierung des Chymotrypsin-Assays wurde ein photometrischer Assay herangezogen, wobei als Substrat ein Peptid mit chromophorer Gruppe verwendet wird. Die Abspaltung der chromophoren Gruppe durch das Enzym Chymotrypsin führt zur Farbbildung, was am Photometer beobachtet werden kann. Für die massenspektrometrische Messung sollte die Enzymkonzentration möglichst gering gewählt werden, um Signalunterdrückung und Ablagerungen in der Ionenquelle des Massenspektrometers zu vermeiden.

Für den Chymotrypsin-Assay wurden deshalb die Enzymkonzentrationen für die entsprechende Substratkonzentration angepasst und dienten so als Ausgangswert für die massenspektrometrische Messung (Abbildung 2-27).

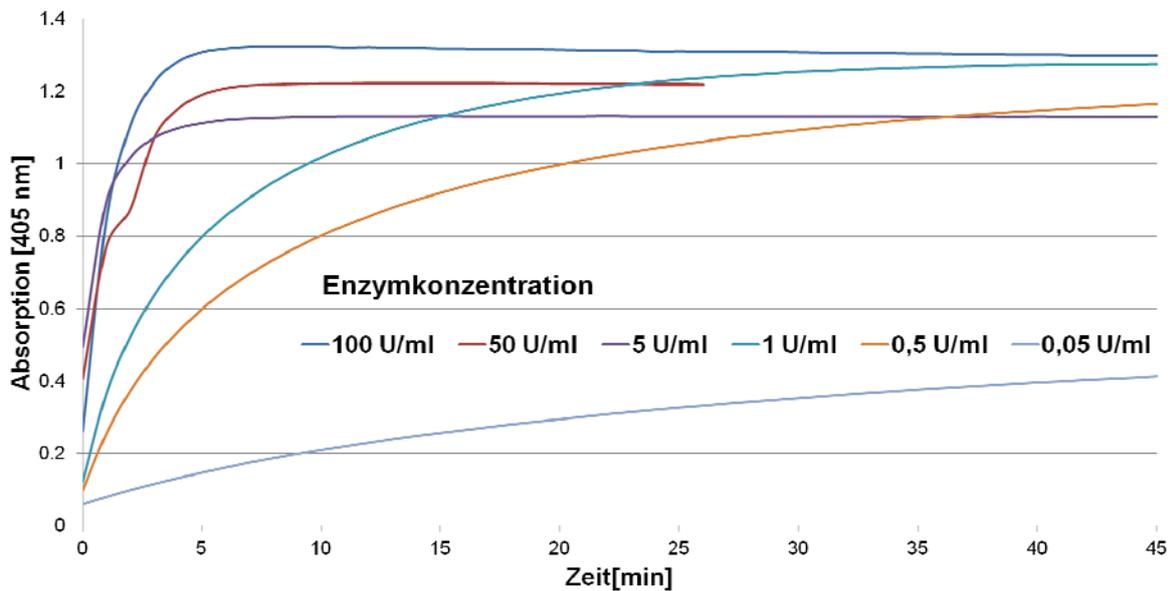


Abbildung 2-27: Messung des Assays mit Chymotrypsin und einem Substrat mit chromophorer Gruppe am Photometer. Die Abbildung zeigt die zunehmende Produktpur bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen in der Enzymeinheit Unit mL⁻¹.

Da die Messung von Enzymreaktionen mit der Robotereinheit nicht von Beginn an möglich war und die Modifikationen erst im Laufe des Projekts entwickelt wurden, erfolgte die Etablierung und Optimierung der Enzym-Assays zunächst mit dem Messansatz über die Spritzenpumpe. Die Assays mit den Enzymen Lysozym, Chitinase, α -Chymotrypsin, Neutrophilen-Elastase, Pankreas-Elastase und Acetylcholinesterase wurden für die massenspektrometrische Messung optimiert und können für die weiteren im Projekt bearbeiteten Arbeitspakete angewendet werden.

Jeweils eine massenspektrometrische Messung mit sichtbarem Substratabbau und der Zunahme von einem oder mehreren Produkten ist für jeden Assay über die Messzeit von 20 min in Abbildung 2-28 dargestellt.

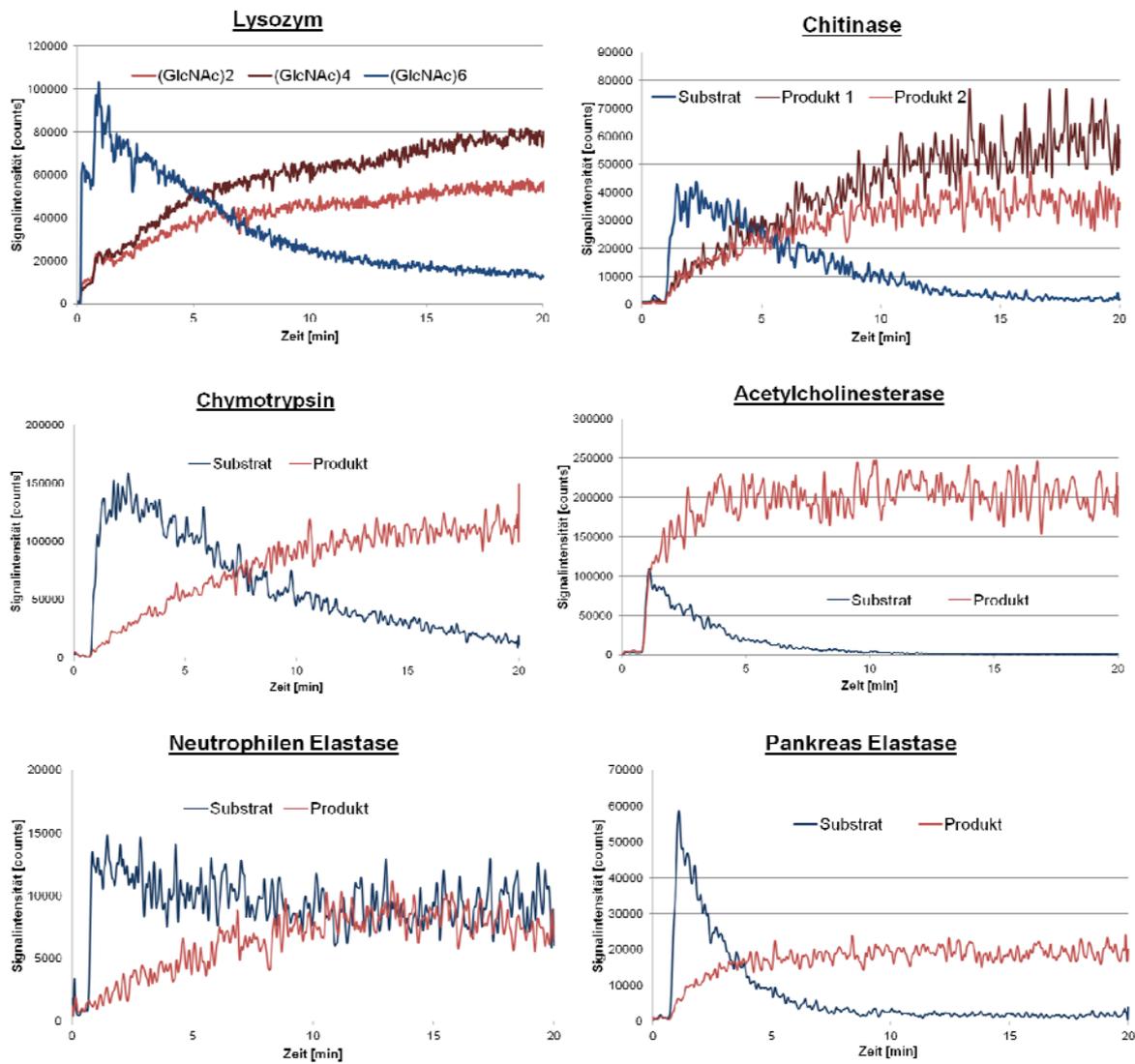


Abbildung 2-28: Optimierte Enzym-Assays mit den Enzymen Lysozym, Chitinase, Chymotrypsin, Acetylcholinesterase, Neutrophilen-Elastase und Pankreas-Elastase für die Messung mittels Massenspektrometrie.

2.7 Validierung der Robotereinheit (Advion) zur simultanen Erfassung parallel ablaufender enzymatischer Reaktionen

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, wurden mehrere Enzym-Assays einzeln für die massenspektrometrische Messung optimiert und etabliert. In diesem Arbeitspaket wurden die Massenspektrometrie-kompatiblen Enzym-Assays auf mehrere parallel zu untersuchende Enzymreaktionen ausgedehnt. Dieses so genannte „Multiplexing“ erlaubt die parallele Detektion verschiedener enzymatischer Regulatoren in einer Probe. Somit können in einem Experiment gleichzeitig verschiedene Funktionen oder Einflüsse ermittelt werden. Wie die Einzelmessungen der Assays wurden auch diese Multiplexing-Messungen mit dem Ansatz über Spritzenpumpe und nicht mit der Robotereinheit gemessen.

Für das Multiplexing ist es notwendig, alle Enzymreaktionen möglichst in einem Ansatz gemeinsam durchzuführen. Hierzu muss ein gemeinsames Reaktionssystem gefunden werden, in dem alle Enzyme eine ausreichende Aktivität zeigen. Des Weiteren muss für alle Enzymreaktionen ein geeignetes Puffersystem und ein identischer pH-Wert gewählt werden. Darüber hinaus sollten die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten angepasst werden, um alle auszuwertenden Massensignale möglichst in einem ähnlichen Intensitätsbereich zu detektieren. Als Puffersystem sind für die Massenspektrometrie leicht flüchtige Salze notwendig, wie beispielsweise Acetate. In Versuchen zeigte sich, dass 10 mM NH₄Ac-Lösungen für Enzymreaktionen geeignet sind⁴³. Da alle Enzyme ihr spezifisches pH-Optimum besitzen, wurde untersucht, bei welchem pH-Wert alle Enzyme noch eine hohe Aktivität aufweisen. Im Anschluss wurde systematisch geprüft, wie sich die einzelnen Reaktionskomponenten gegenseitig beeinflussen. Hierbei ist zu untersuchen, ob die einzelnen Enzyme von anderen Enzymen oder Substraten reguliert, d. h. inhibiert oder aktiviert, werden. Weiterhin muss überprüft werden, ob ein Enzym auch Substrate von anderen in der Mischung enthaltenen Enzymen umsetzt. Die einzelnen Parameter sind in Tabelle 2-12 exemplarisch für eine Mischung aus zwei Enzym-Assays zusammengefasst.

⁴³ Dennhart, N., and Letzel, T. (2006). Mass spectrometric real-time monitoring of enzymatic glycosidic hydrolysis, enzymatic inhibition and enzyme complexes. *Anal Bioanal Chem* 386, 689-698.

Tabelle 2-12: Mögliche beeinflussende Faktoren beim Multiplexing von zwei Enzym-Assays.

	Enzym 1	Enzym 2	Substrat 1	Substrat 2
Enzym 1	x	Regulierung?	Assay 1	Regulierung? Reaktion?
Enzym 2	Regulierung?	x	Regulierung? Reaktion?	Assay 2

Um die Kombination zweier Enzym-Assays zu überprüfen, wurden beide Assays, d. h. beide Enzyme und beide Substrate, in einem Ansatz massenspektrometrisch gemessen. Der Abbau des Substrats wurde am Massenspektrometer über die Substratspur verfolgt. Parallel wurde der Abbau der Substratspur im einzelnen Enzym-Assay (Kontroll-Assay) gemessen und zum Vergleich herangezogen. Der Einfluss eines zweiten Assays auf den Verlauf des Substratabbaus im Assay 1 kann in vielen Fällen schon optisch erkannt werden, wie in Abbildung 2-29 anhand des Beispiels des Neutrophilen-Elastase-Assays unter Zusatz des Chitinase-Assays und des Pankreas-Elastase-Assays gezeigt ist. Zusätzlich zur grafischen Darstellung wurde anhand der Substratspur die Abbaurrate des Substrats pro Minute bestimmt und diese mit der Abbaurrate des Kontroll-Assays verglichen. Für den Kontroll-Assay mit der Neutrophilen-Elastase kann eine Abbaurrate von $0,08 \text{ min}^{-1}$ berechnet werden. Die Umsatzrate des Assays mit Zusatz des Chitinase-Assays beträgt ebenfalls $0,08 \text{ min}^{-1}$ und somit 100% des Kontroll-Assays. Für den Assay unter Zusatz des Pankreas-Elastase-Assays kann schon optisch ein langsamerer Abbau des Substrats beobachtet werden.

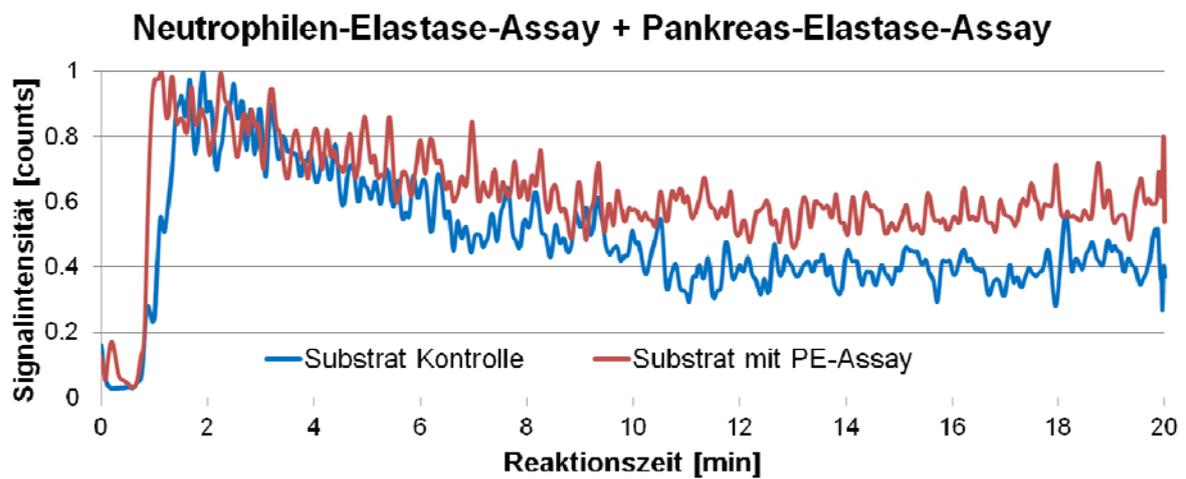
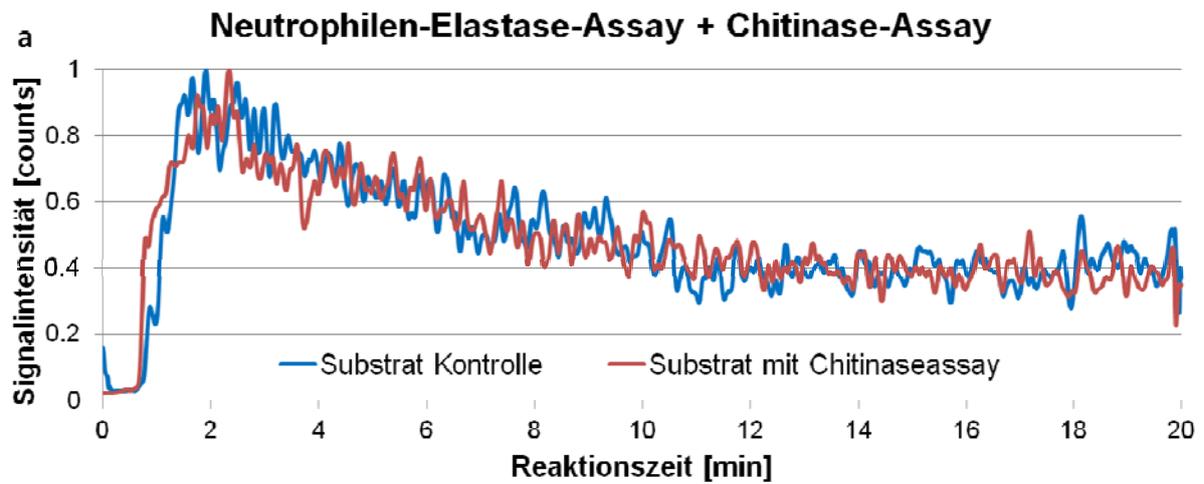


Abbildung 2-29: Multiplexing von zwei Enzym-Assays. Verlauf der Substratspur des Neutrophilen-Elastase-Assays im Kontroll-Assay und unter Zusatz des (a) Chitinase-Assays und (b) Pankreas-Elastase-Assays.

Dies wird durch die Umsatzrate bestätigt, die mit etwa $0,04 \text{ min}^{-1}$ nur 47% im Vergleich zum Kontroll-Assay beträgt. Die Ergebnisse der systematischen Überprüfung möglicher Kombinationen der etablierten Enzym-Assays sind in Tabelle 2-13 zusammengefasst. Bis auf wenige Ausnahmen ergeben alle Kombinationen aus jeweils zwei Enzym-Assays Umsatzraten von $\geq 50\%$ im Vergleich zum Kontroll-Assay und können somit als kompatibel miteinander angesehen werden.

Tabelle 2-13: Mögliche Kombinationen von zwei Enzym-Assays und deren Kompatibilität. Kombinationen mit einer Umsatzrate $\geq 50\%$ im Vergleich zum Kontroll-Assay sind grün und Kombinationen mit einer Umsatzrate $< 50\%$ im Vergleich zum Kontroll-Assay sind rot unterlegt.

	Zusatz von				
	Neutrophilen-Elastase	Pankreas-Elastase	α-Chymotrypsin	Chitinase	Acetylcholin-esterase
Neutrophilen-Elastase	x	☹	☹	☺	☺
Pankreas-Elastase	☺	x	☺	☺	☺
α-Chymotrypsin	☺	☺	x	☺	☺
Chitinase	☺	☺	☺	x	☺
Acetylcholin-esterase	☹	☺	☺	☺	x

Es kann keine allgemeine Regel abgeleitet werden, welche Enzym-Assays miteinander kombinierbar sind. Generell muss die Kompatibilität von mehreren Enzym-Assays in einem Ansatz für jede Kombination im Einzelnen überprüft werden.

2.8 Evaluierung des kontinuierlichen Mischsystems

Im Projekt sollten verschiedene Hausstaubextrakte auf eventuelle enthaltene enzymatische Regulatoren untersucht werden. Dabei wurden die etablierten Enzymreaktionen auf kontinuierlich arbeitende Mischsysteme übertragen und anschließend automatisiert in der Kopplung mit massenspektrometrischer Detektion genutzt. Die mittels HT-HPLC aufgetrennten Hausstaubextrakte wurden mit der Enzymmischung in einer Reaktionskapillare vorgemischt und anschließend mit der Substratlösung vermischt. Nach einer definierten Mischzeit erfolgte die Detektion mittels Massenspektrometrie. Auf diese Weise können regulatorische Substanzen identifiziert werden. Ist beispielsweise eine inhibitorische Substanz für ein Enzym im Hausstaubextrakt enthalten, so wird im entsprechenden extrahierten Ionenchromatogramm eine Zunahme des Substrats und eine Abnahme des Produkts erfolgen (Abbildung 2-1).

Eine Schwierigkeit dieser Kopplung besteht darin, dass für eine Elution polarer und unpolarer Verbindungen der Zusatz eines organischen Co-Solvenz in der mobilen Phase notwendig ist. Die Mischung von organischem Lösungsmittel mit Enzym kann jedoch zur Denaturierung der Enzyme und damit zur Minderung der enzymatischen Aktivität führen. Um zu hohe Anteile von organischem Lösungsmittel mit dem Enzym zu vermeiden, wurde - wie in Abschnitt 2.5 beschrieben - die Hochtemperatur-HPLC angewendet.

Als Vorversuche für das kontinuierliche Mischsystem wurden daher die Enzyme hinsichtlich ihrer Lösungsmittelverträglichkeit untersucht. Hierfür wurden die unter Kapitel 2.6.3 beschriebenen Enzym-Assays mit unterschiedlichen Anteilen an Lösungsmittel versetzt und somit der Einfluss auf die Enzymaktivität überprüft. Untersucht wurden die in der HPLC gebräuchlichen Lösungsmittel Methanol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril und Aceton. Die Tests erfolgten auf gleiche Weise wie die in Kapitel 2.6.3 beschriebenen Tests auf Kompatibilität von mehreren Assays in einem Multiplexing-Ansatz. Die Abbildung 2-30 b-f zeigt den Einfluss der Zugabe von 10% verschiedener organischer Lösungsmittel auf die enzymatische Aktivität der Neutrophilen-Elastase im Vergleich zum Enzym-Assay ohne Zusatz von Lösungsmittel (Abbildung 2-30a). Bei allen Lösungsmitteln ist eine verminderte Substratabnahme sowie verminderte Produktzunahme im Vergleich zum Assay ohne Lösungsmittel zu beobachten. Insgesamt wird die Enzymaktivität der Neutrophilen-Elastase bereits durch den Zusatz von 10% eines organischen Lösungsmittels signifikant beeinträchtigt. Auch die Lösungsmitteltests mit den anderen bisher untersuchten Enzymen zeigten vergleichbare Resultate.

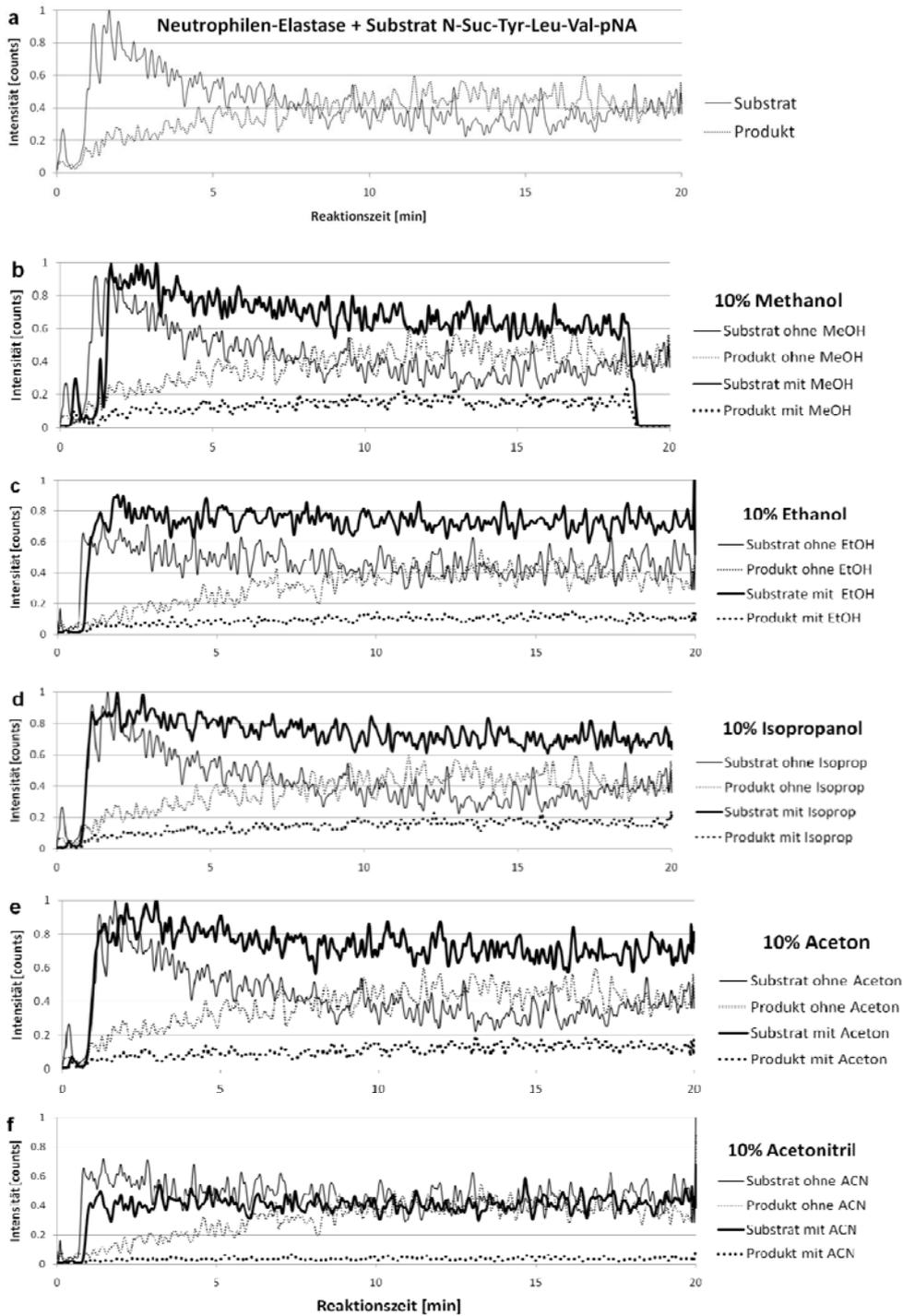


Abbildung 2-30: (a) Reaktionsverlauf eines Enzym-Assays mit dem Enzym Neutrophilen-Elastase und einem Substrat ohne Zusatz von Lösungsmittel. (b-f) Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Neutrophilen-Elastase bei Zusatz von verschiedenen Lösungsmitteln im Vergleich zum Ansatz ohne Lösungsmittel.

Wie unter Kapitel 2.7 beschrieben, wurde auch hier die Umsatzrate des Substrats pro Minute berechnet und mit der Umsatzrate des Kontroll-Assays verglichen. In Tabelle 2-14 sind die Ergebnisse aller untersuchten Enzym-Assays mit den jeweiligen Lösungsmitteln dargestellt. Alle Enzym-Assays werden durch den Zusatz von organischem Lösungsmittel in ihrer Umsatzrate beeinträchtigt. Einige Enzyme wie die Glykosidasen Lysozym und Chitinase zeigten bei fast allen Lösungsmitteln noch eine Umsatzrate von $\geq 50\%$. Andere Enzyme wie die Elastasen und Acetylcholinesterase sind empfindlicher und wiesen nur bei Zusatz von Methanol noch eine Umsatzrate von $\geq 50\%$ auf. Bei den anderen Lösungsmitteln lag die Umsatzrate unter 50% und die Enzymaktivität ist somit stark beeinträchtigt. Für die Entwicklung chromatografischer Methoden resultiert hieraus, den Anteil an organischem Co-Solvenz im Elutionsmittel so gering wie möglich zu halten. Um aber trotzdem eine Elution möglichst vieler Komponenten zu gewährleisten, wird ein Zusatz von maximal 20% Methanol zur mobilen Phase angestrebt (siehe hierzu Ausführungen in Abschnitt 2.5).

Tabelle 2-14: Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf den Substratabbau der Enzym-Assays. Assays mit einer Substrat-Umsatzrate $\geq 50\%$ im Vergleich zum Kontroll-Assay sind grün und Kombinationen mit einer Umsatzrate $< 50\%$ im Vergleich zum Kontroll-Assay sind rot unterlegt.

	Zusatz von 10%				
	Methanol	Ethanol	Isopropanol	Aceton	Acetonitril
Neutrophilen-Elastase	☺	☹	☹	☹	☹
Pankreas-Elastase	☺	☹	☹	☹	☹
α-Chymotrypsin	☺	☹	☺	☹	☹
Chitinase	☺	☺	☹	☹	☺
Acetylcholin-esterase	☺	☹	☹	☹	☹
Lysozym	☺	☺	☺	☺	☺

Die Umsatzrate des Lysozym-Assays ist allerdings für alle Lösungsmittel größer als 50%. Dies bedeutet, dass ein Lösungsmittel ausgewählt werden kann, welches günstige Elutionseigenschaften für die chromatografische Analyse besitzt. Da das Hauptproblem bei der vorgestellten Kopplungstechnik darin besteht, auch unpolare Substanzen mit niedrigem organischen Anteil von der Säule zu eluieren, kann beim Lysozym-Assay auch auf Lösungsmittel mit einer höheren Elutionskraft als Methanol zurückgegriffen werden.

Ebenso ist der Chymotrypsin-Assay mit Isopropanol kompatibel, was eine deutlich höhere Elutionskraft als Methanol besitzt. Weiterhin wurden die Assays im Multiplexing-Ansatz, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben - in Anwesenheit von organischem Lösungsmittel untersucht. Hierzu wurde ein Multiplexing-Ansatz mit vier parallel ablaufenden Enzym-Assays unter Zusatz von 10% organischem Lösungsmittel gemessen. In allen Fällen resultierte eine stark verminderte Enzymaktivität. Die Abbildung 2-31 zeigt eine Übersicht über alle untersuchten Enzym-Assays im Multiplexing-Ansatz, bestehend aus den vier Enzym-Assays mit den Enzymen Chitinase, Neutrophilen-Elastase, Chymotrypsin und Acetylcholinesterase.

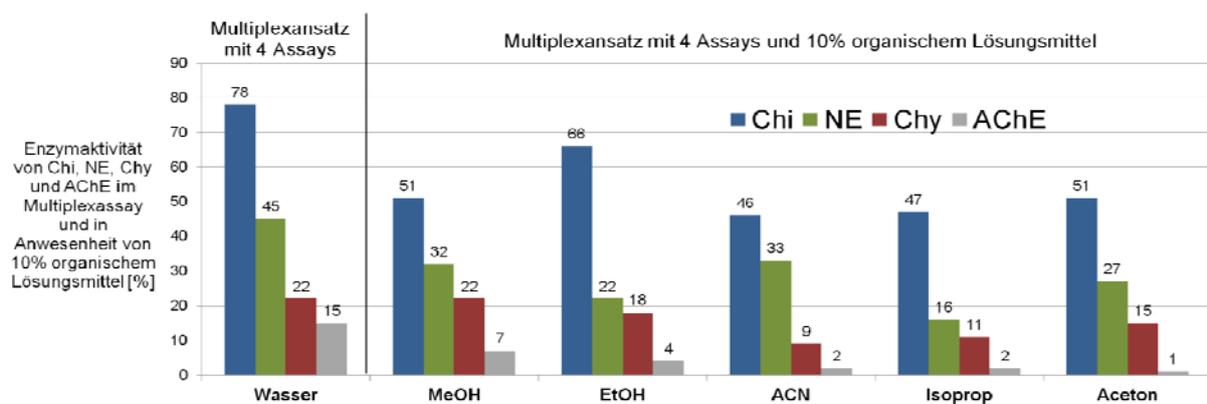


Abbildung 2-31: Verbleibende Enzymaktivität der Enzyme Chitinase (Chi), Neutrophilen-Elastase (NE), Chymotrypsin (Chy) und Acetylcholinesterase (AChE) im Multiplexing-Ansatz mit allen vier Assays und unter Zusatz von 10% eines organischen Lösungsmittels.

2.9 Optimierung des kontinuierlichen Mischsystems

Das kontinuierliche Mischsystem zur massenspektrometrischen Bestimmung enzymatischer Regulatoren wurde im Projekt hinsichtlich Aufbau, Flussraten und Material optimiert. Das System wurde in verschiedenen Modifikationen mit unterschiedlichen Massenspektrometern getestet. Bei den Messungen mit dem Online-System zeigten sich einige Schwierigkeiten, die beim Aufbau und Betrieb beachtet werden müssen.

2.9.1 Vorlage der Enzym- und Substratmischung in den Superloops

Die Substrat- und Enzymmischungen werden in sogenannten Superloops (Abbildung 2-32) vorgelegt und in das System integriert. Hierbei handelt es sich um Behältnisse mit einem Volumen von 10 mL, welche in das kontinuierliche System über Tubings und Verbindungsstücke als Vorlagegefäße integriert werden. Die meisten Enzyme müssen kühl gelagert werden, um ihre Aktivität zu behalten. Die Kühlung der Superloops ist vom Hersteller nicht vorgesehen und muss nachträglich realisiert werden. Das große Volumen der Loops von 10 mL ist als nachteilig anzusehen, weil viel Probevolumen benötigt wird und die Lösungen über eine lange Zeit im Loop verbleiben. Dies ist vor allem problematisch, wenn Proteasen (Chymotrypsin, Trypsin, Elastase) in der Mischung enthalten sind, da diese andere Proteine verdauen können. Eine Möglichkeit hierfür ist die Integration einer weiteren Pumpe, die die Proteasen separat in das System einführt und somit die Interaktionszeit mit den anderen Substanzen so kurz wie möglich hält.



Abbildung 2-32: Vorlagegefäß „Superloop“ zur Bereitstellung von Enzym- oder Substratlösung im kontinuierlichen Mischsystem. Die Lösungen werden mittels HPLC-Pumpen gefördert.

2.9.2 Reaktionskapillaren zur Durchmischung von Lösungen

Zunächst wurde die Enzymmischung mit dem Eluat der chromatografischen Trennung der Hausstaubextrakte im kontinuierlichen Fluss „vorinkubiert“. Dies erfolgte in einer sogenannten Reaktionskapillare, welche aus einem verknoteten Teflontubing mit definierter Länge besteht (Abbildung 2-33). Nach der Vorinkubation von Enzym mit Eluat wird dieser Spur die Substratspur über ein weiteres Mischstück zugeführt. Auch diese Mischung durchläuft eine Reaktionskapillare zur Umsetzung des Substrats zu den Produkten.

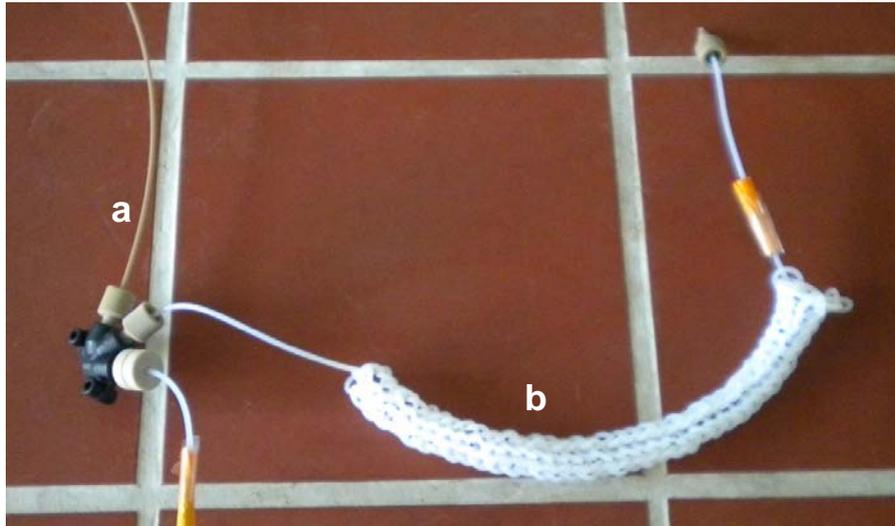


Abbildung 2-33: (a) Tubings und Mischstück im kontinuierlichen Mischsystem zur Durchmischung der Enzymlösung mit dem Substrat und Eluat und (b) Reaktionskapillare, stark verknotet, um eine turbulente Strömung zu erzeugen und eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten.

Durch lange Wegstrecken in den Tubings und Mischstücken können zuvor chromatografisch getrennte Substanzen wieder zusammenfließen und es kann zur Peakverbreiterung kommen. Dies kann durch möglichst kurze Tubings vermindert werden. Gleichzeitig muss aber beachtet werden, dass Enzyme eine bestimmte Reaktionszeit benötigen, um Substrat umzusetzen. Dies bedingt eine Mindestlänge der Tubings in Abhängigkeit des jeweiligen Innendurchmessers und der Flussrate, um diese Reaktionszeit einzuhalten. Tubings mit möglichst kleinen Innendurchmessern verringern zwar die Bandenverbreiterung, wirken sich jedoch negativ auf Adsorptionseffekte aus und vermindern wiederum die Reaktionszeit der Enzyme.

In den Tubings kann es zu Adsorptionseffekten kommen, was vor allem bei Proteinen und Peptiden beobachtet wird. Für den Enzym-Assay mit dem Enzym Chymotrypsin und dem dazugehörigen Substrat, einem Peptid, änderte sich die Signalintensität von Substrat- und Produktpur innerhalb einer Messreihe. Die Abnahme der Substratintensität und die Zunahme der Produktintensität mit gleich bleibender Intensität des internen Standards weist auf eine mögliche Adsorption bzw. Anreicherung des Enzyms im System hin.

Eine Möglichkeit, um die Interaktion von Proteinen mit der Oberfläche zu minimieren besteht darin, die verwendeten Materialien beispielsweise durch Zusatz von bovinem Serumalbumin, Polyethylenglycol oder hohen Salzkonzentrationen zu behandeln⁴⁴. Eine bessere Alternative als die verwendeten PEEK (Polyetheretherketon) und Teflon-Tubings wäre der Übergang auf Materialien aus Glas.

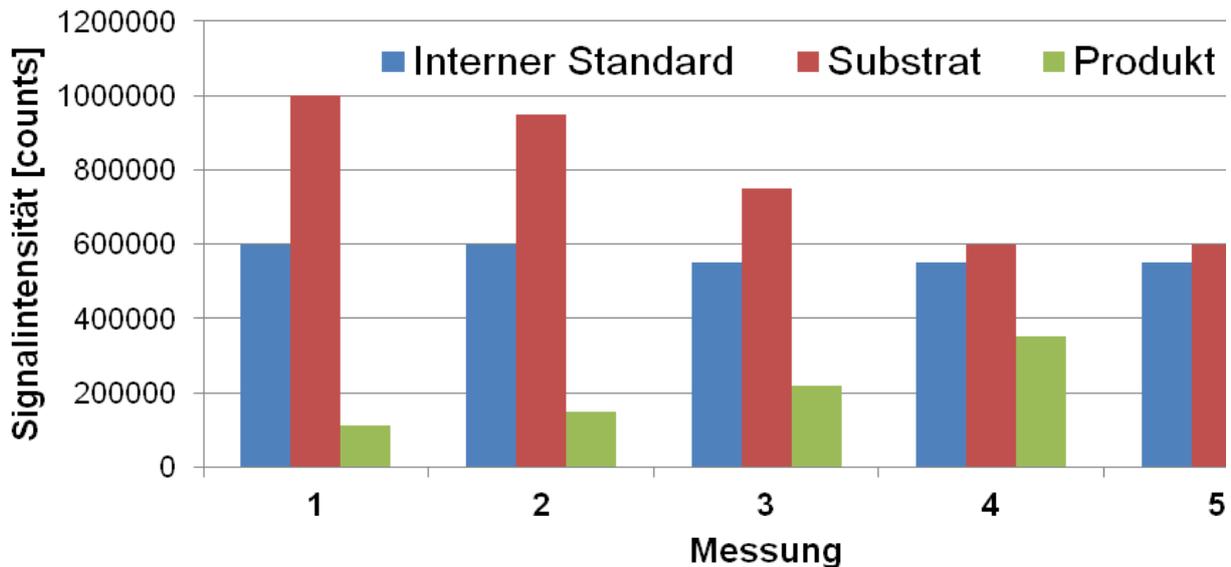


Abbildung 2-34: Verlauf der Signalintensitäten von internem Standard (Histidin), Substrat (Peptid) und Produkt (Peptid) innerhalb eines Tages im kontinuierlichen Mischsystem.

2.9.3 Zwischenfazit

Die einzelnen Komponenten des Systems, d. h. Superloops, Reaktionskapillaren und MS-Detektor, müssen über T-Stücke und Kapillaren miteinander verbunden werden. Trotz möglichst geringer Wegstrecken durch kompakten Aufbau des Systems resultieren lange Analysenzeiten. Ein miniaturisiertes System auf einem Reaktionschip könnte lange Verbindungsstrecken und Totvolumina reduzieren. Die weiteren Ausführungen hierzu können dem Kapitel 3.1.1 entnommen werden.

⁴⁴ Goebel-Stengel, M., Stengel, A., Tache, Y., and Reeve, J.R., Jr. (2011). The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414, 38-46.

2.10 Untersuchung von Hausstaub

Bevor mit dem Screening ausgewählter Hausstaubextrakte begonnen wurde, erfolgte die Etablierung von Enzymreaktionen mit kommerziell erhältlichen Enzymen wie beispielsweise Proteasen, Glykosidasen und Esterasen (siehe Kapitel 2.6.3). Die Auswahl der Enzyme erfolgte entsprechend zu dem zu untersuchenden Modellsystem Hausstaub. Für die Enzymauswahl ist das Modellsystem Hausstaub unter zwei Gesichtspunkten zu betrachten, die nachfolgend erläutert werden.

2.10.1 Enzymatische Aktivität

Im Hausstaub selbst ist häufig enzymatische Funktion nachzuweisen, welche auf enthaltene Proteine zurückzuführen ist. So konnte beispielsweise in Milbenextrakten aus Hausstaub die Aktivität von Proteasen, Peptidasen, Phosphatasen, Esterasen, und Glykosidasen bestimmt werden^{45, 46}.

2.10.2 Enzymatische Regulatoren

Hausstaub ist eine komplexe Matrix. In den Orientierungswerten für Inhaltsstoffe von Raumluft und Hausstaub der Arbeitsgemeinschaft ökologischer Forschungsinstitute e. V. werden über 100 problematische Substanzen bzw. Substanzgruppen genannt, die im Rahmen von Hausstaubuntersuchungen betrachtet werden können. Substanzgruppen mit Einfluss auf Enzyme sind beispielsweise Mykotoxine, Pestizide, PCB und PAK⁴⁷.

⁴⁵ Thomas, W.R., Smith, W.A., Hales, B.J., Mills, K.L., and O'Brien, R.M. (2002). Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* 129, 1-18.

⁴⁶ Morgan, M.S., and Arlian, L.G. (2006). Enzymatic activity in extracts of allergy-causing astigmatid mites. *Journal of Medical Entomology* 43, 1200-1207.

⁴⁷ Sergent, T., Ribonnet, L., Kolosova, A., Garsou, S., Schaut, A., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Larondelle, Y., Pussemier, L., and Schneider, Y.J. (2008). Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. *Food and Chemical Toxicology* 46, 813-841.

Anhand dieser beiden Aspekte wurde eine Auswahl und Priorisierung getroffen, welche Enzyme zunächst für die Untersuchungen herangezogen wurden. Tabelle 2-15 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Auswahl der Enzyme.

Tabelle 2-15: Übersicht über die relevanten Enzymklassen mit Beispielen für das System Hausstaub.

	<i>Vorkommen in Hausstaub</i>	<i>Beeinflussung durch Komponenten in Hausstaub</i>	<i>Beispiele</i>
<i>Proteasen</i>	+++	?	Chymotrypsin, Elastasen
<i>Glycosidasen</i>	+++	+	Lysozym, Chitinase
<i>Cholinesterasen</i>	?	+++	Acetylcholinesterase

Die Enzymreaktionen mit den in Tabelle 2-15 genannten Enzymen wurden wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben für die Massenspektrometrie etabliert und optimiert.

Für die Untersuchungen des Hausstaubs wurden verschiedene charakteristische Hausstaubextrakte ausgewählt, wie z. B.:

- Poolstaubproben: Mischproben aus ca. 170 bis 200 Hausstaubproben ohne sichtbaren Schimmelpilzbefall im Wohnraum.
- Proben aus Wohnräumen mit sichtbarem Schimmelpilzbefall: z. B. bekannte Mengen an Mykotoxinen wie Sterigmatocystin, Ochratoxin A, Deoxynivalenol.
- Proben aus mehrmals beprobten Wohnräumen mit sichtbarem Schimmelpilzbefall.
- Proben mit bekannter Menge an bestimmten Chemikalien: z. B. polychlorierte Biphenyle, Pestizide.

Eine Untersuchung des Hausstaubs auf die in Kapitel 2.10.1 beschriebene enzymatische Aktivität war nicht Ziel dieser Untersuchungen. Aufgrund der Kopplung des Online-Systems mit der Hochtemperatur-HPLC werden infolge der hohen Temperaturen während der Trennung sämtliche enzymatisch aktiven Proteine, wie z. B. Proteasen oder Esterasen, inaktiviert. Somit wurde im folgenden Abschnitt nicht die Bestimmung der enzymatischen Aktivität angestrebt, sondern die Bestimmung von enzymatischen Regulatoren, wie in Kapitel 2.10.2 definiert.

2.11 Untersuchung von Hausstaub auf enthaltene enzymatische Regulatoren mit dem HT-KM-MS-System

2.11.1 Auswahl der Säule

In diesem Arbeitspaket erfolgte zunächst der Aufbau des gekoppelten Analysensystems bestehend aus Hochtemperatur-HPLC, kontinuierlichem Mischsystem und Massenspektrometer. Im Vordergrund der Arbeiten stand zunächst die Optimierung des Online-Systems. Dieses System wurde, wie in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt, aufgebaut.

Für die chromatografische Trennung der Hausstaubextrakte wurde eine ZirChrom-PBD-Säule (100 x 1,0 mm, 3 µm) ausgewählt. Die ZirChrom-PBD-Phase stellte sich für die Elution von komplexen Hausstaubproben als besonders geeignet heraus (siehe insbesondere die Ausführungen in Kapitel 2.5), da sie eine geringere Hydrophobizität im Vergleich zur Waters XBridge Phase besitzt. Aufgrund der geringen Flussrate wurde eine Säule mit einem Innendurchmesser von 1 mm ausgewählt. Abbildung 2-35 und Abbildung 2-36 vergleichen beispielhaft die Messungen eines Roridin A Standards mit zwei unterschiedlich dimensionierten ZirChrom-PBD-Säulen. Es wird deutlich, dass die Säule mit dem Innendurchmesser von 1 mm erheblich schmalere Peaks liefert als die Säule mit dem Innendurchmesser von 0,3 mm. Da im Online-System durch die Vermischung der einzelnen Assay Komponenten die Gefahr von starker Bandenverbreiterung gegeben ist, wurde für die Messungen mittels HT-KM-MS-System eine ZirChrom-PBD-Säule mit den Dimensionen 100 x 1 mm, 3 µm verwendet.

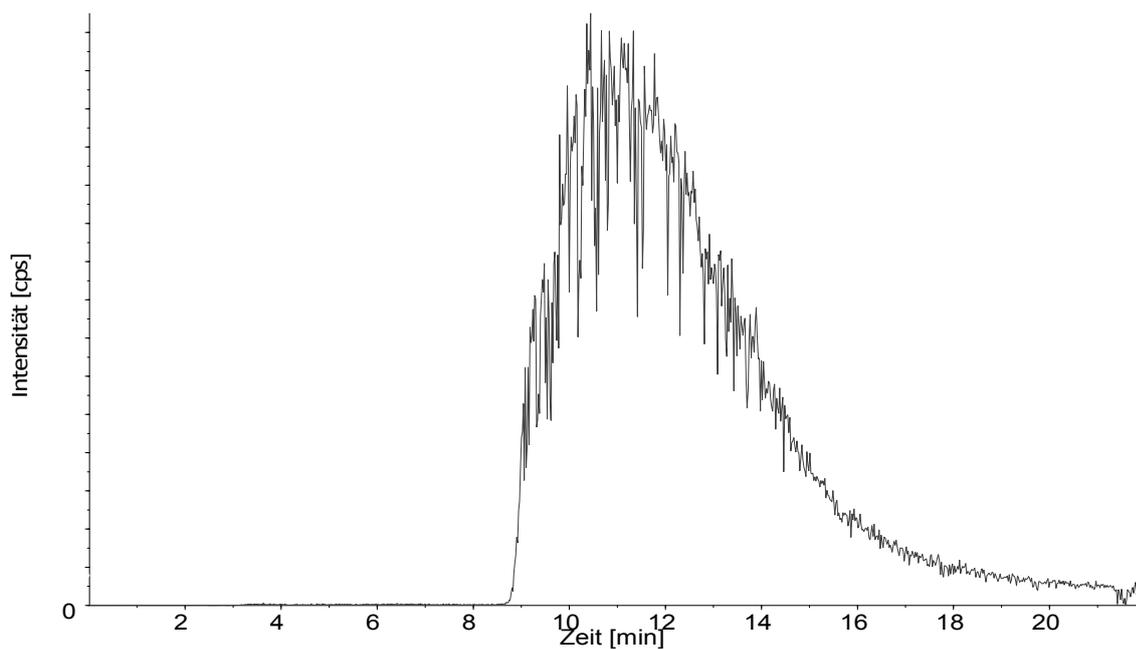


Abbildung 2-35: Extrahiertes Ionenchromatogramm von Roridin A mit vorherigem Fluss über stationäre Phase: ZirChrom-PBD 100 x 0,3 mm, 3 µm, mobile Phase: Ammoniumacetatpuffer 10 mM, pH 7,4; Flussrate: 10 µL min⁻¹.

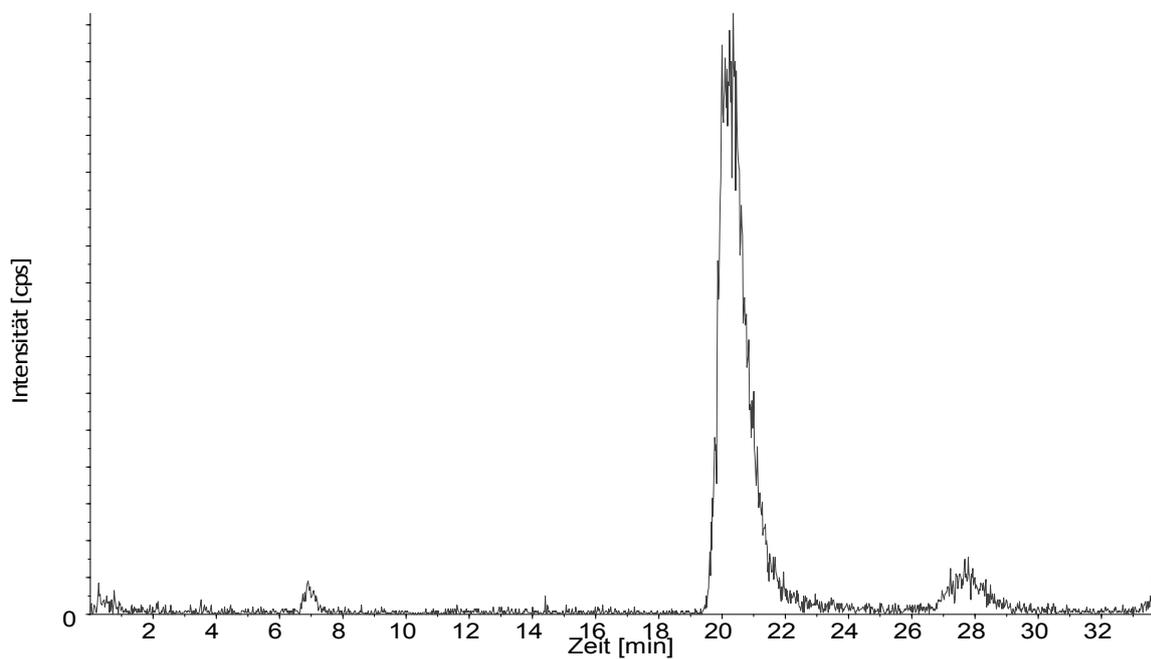


Abbildung 2-36: Extrahiertes Ionenchromatogramm von Roridin A mit vorherigem Fluss über stationäre Phase: ZirChrom-PBD 100 x 1 mm, 3 µm, mobile Phase: Ammoniumacetatpuffer 10 mM, pH 7,4; Flussrate: 10 µL min⁻¹.

2.11.2 Chromatografische Trennung

Wie in Kapitel 2.8 beschrieben, muss der Anteil an organischem Lösungsmittel für die chromatografische Trennung möglichst $\leq 20\%$ gehalten werden, um die Enzymaktivität zu erhalten. Für die Trennung der Hausstaubextrakte wurde eine Methode mit isokratischer Lösungsmittelzusammensetzung und einem Temperaturgradienten gewählt. Eine isokratische Trennung ist für die Messung von Enzymreaktionen besser geeignet als ein Lösungsmittelgradient, da eine Änderung des organischen Anteils gleichermaßen die Enzymaktivität beeinflusst. Die Lösungsmittelzusammensetzung wurde auf 90% 10 mM NH_4Ac und 10% Methanol festgelegt.

2.11.3 Anpassung von Enzym- und Substratkonzentrationen

Wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, wurden die Assays mit den Enzymen Lysozym, Chitinase, α -Chymotrypsin, Neutrophilen-Elastase, Pankreas-Elastase und Acetylcholinesterase für die massenspektrometrische Messung optimiert. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass das Substrat innerhalb der Messzeit von 20 min abgebaut wird und eine Produktbildung zu beobachten ist (Abbildung 2-28). Dabei wurde die Substratkonzentration immer konstant gehalten und die Enzymkonzentration variiert. Für die Messung der Assays im kontinuierlichen Mischsystem muss beachtet werden, dass die Enzymlösung am ersten Mischstück zunächst mit dem Eluat der HT-HPLC vermischt und somit verdünnt und erst am zweiten Mischstück mit der Substratlösung zusammengeführt wird (Abbildung 2-1). Weiterhin wird im kontinuierlichen System nicht die Kinetik der Reaktion detektiert, sondern nur ein Zeitpunkt im Assay, welcher der Reaktionszeit in der zweiten Reaktionskapillare entspricht. Es sollte darauf geachtet werden, dass sich die Signalintensitäten am Massenspektrometer in etwa in der gleichen Größenordnung bewegen. Die Konzentrationen von der Enzym-Assay-Optimierung mittels Spritzenpumpe dienen also als Anhaltspunkt, können aber nicht direkt übernommen werden.

2.11.4 Einfluss des pH-Werts auf die Chromatografie

Einen Einfluss auf die chromatografische Trennung der Probe kann auch der pH-Wert der mobilen Phase haben. Dieser Einfluss zeigte sich besonders bei der Trennung mit der für diese Aufgabenstellung verwendeten ZirChrom-PBD-Phase.

In der Literatur wurde bereits der Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf die Ladungsverteilung des Phasenmaterials beschrieben. Üblicherweise wird den Eluenten ein organisches oder anorganisches Puffersystem mit einer Konzentration von 10 bis 20 mmol L⁻¹ zugegeben, um einen definierten pH-Wert einzustellen. Vor diesem Hintergrund kann eine stabile und reproduzierbare Messung gewährleistet werden. Eine zweite Möglichkeit, den pH-Wert der mobilen Phase einzustellen, ist die Zugabe einer geringen Menge Säure. Hierbei wird ein robuster, jedoch kein konstanter pH-Wert erreicht. Mit steigender Temperatur würde somit die Acidität der mobilen Phase ansteigen. Dies würde zu einem kontinuierlich Abfall des pH-Werts bei Verwendung eines Temperaturgradienten führen. Darüber hinaus dient die Zugabe von flüchtigen Säuren zum Eluenten der Unterstützung der Ionisierung bei der Kopplung von HPLC mit der Elektrospray-Massenspektrometrie.

Die Aktivität der für den vorliegenden Assay verwendeten Enzyme ist stark vom pH-Wert der mobilen Phase abhängig. In einem neutralen Medium liegt die größte Enzymaktivität vor. Um den größtmöglichen Enzym-Substrat Umsatz zu erreichen und so die Nachweisgrenze zu senken, sollte die mobile Phase bei einem pH-Wert von ca. 7 gepuffert werden. Bei einem pH-Wert von 7 ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Zirkoniumdioxid-Oberfläche im neutralen bis basischen Milieu teilweise negativ geladen vorliegt⁴⁸. Dies kann, abhängig von den polaren Eigenschaften der jeweiligen Analyten, zu sehr breiten und verzerrten Peaks führen. Der Nachteil eines Eluenten mit geringem pH-Wert liegt jedoch in der abnehmenden Aktivität des Enzyms während der Messung im Online-Enzym-Assay. Somit ergibt sich ein Zielkonflikt in bezug auf die Einstellung eines optimalen pH-Werts. Für die Chromatografie und auch MS-Detektion sollte ein saurer pH-Wert eingestellt, für die Aufrechterhaltung einer hohen Enzymaktivität sollte ein möglichst neutraler pH-Wert gewählt werden.

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Retentionszeiten zu untersuchen, wurde eine mit 0,1% Ameisensäure bzw. 20 mmol L⁻¹ Formiat-Puffer versetzte mobile Phase für die Trennung eines Standards verwendet. Der Tabelle 2-16 kann entnommen werden, dass sich eine Änderung des pH-Werts nicht auf die Elutionsreihenfolge auswirkt. Auch kam es, mit Ausnahme von Sterigmatocystin, zu keiner nennenswerten Verschiebung der Retentionszeit.

⁴⁸ZirChrom (2004). ZirChrom - EZ & ZirChrom MS Method Development Guide.

Tabelle 2-16: Retentionszeiten ausgewählter Analyten in Abhängigkeit des pH-Werts. Mobile Phase: Wasser/Methanol, Lösungsmittelgradient: 0-100% B in 30 min, stationäre Phase: ZirChrom-PBD 150 x 2,1 mm, 5 µm, Flussrate: 0,3 mL min⁻¹, Temperatur: 40 °C, Detektion: ESI positiv

Analyt	Retentionszeiten [min]		
	Eluent versetzt mit:		
	0,1% Ameisensäure pH 2,7	Formiat-Puffer pH 4	reines Wasser pH 6,8
Nikotin	0,96	1,31	1,31
Aflatoxin B1	8,9	8,96	8,57
DEP	9,1	9,19	8,65
Sterigmatocystin	14,4	17,9	17,7
BBP	20	20,33	19,8

Bei Zugabe von 0,1% Ameisensäure verkürzte sich die Retentionszeit von Sterigmatocystin um ca. 3 min auf 14,4 min im Vergleich zu den Messungen mit neutralem Eluenten und Formiat-Puffer. Ein Nachteil beim neutralen Eluenten äußerte sich in der Peakform von Nicotin. Die sehr polare Substanz neigte zur Bildung eines Doppelpeaks.

Letzendlich hängt die Wahl des Puffersystems stark von der Aktivität des verwendeten Enzym-Assays ab und kann somit für die Chromatografie nur bedingt optimiert werden.

2.11.5 Anpassung der Flüsse

Im kontinuierlichen Mischsystem gibt es zwei Stellen, an denen zwei Lösungen aufeinander treffen und vermischt werden. Hierbei ist es sinnvoll, die Flussraten anzupassen, so dass beide Lösungen mit der gleichen Geschwindigkeit aufeinander treffen, was eine optimale Durchmischung bewirkt⁴⁹. Die Flussrate sollte möglichst klein gewählt werden (z. B. 20 bis 50 µL min⁻¹), um einen zu hohen Verbrauch an Substanzen, vor allem an Enzym, zu vermeiden.

⁴⁹ Yang, Z., Letzel, T. (2007). Mass Spectrometric Study of Lysozyme Complexes using Continuous-Flow Enzymatic Assays. Diploma Thesis.

2.12 Ergebnisse des Screenings von Hausstaubextrakten auf regulatorische Aktivität

Die unter Abschnitt 2.11 beschriebenen Hausstaubextrakte wurden hinsichtlich ihrer enzymregulatorischen Aktivität im HT-KM-MS-System untersucht. Im System wurden dazu die zuvor etablierten Enzymsysteme mit den Enzymen Acetylcholinesterase, Chitinase und Chymotrypsin optimiert. Um die Systeme zu überprüfen, wurden Kontrollmessungen durchgeführt. Da die Hausstaubextrakte in 20%iger methanolischer Lösung vorlagen, wurden entsprechend 20% Methanol in Puffer injiziert. Weiterhin erfolgte die Injektion bekannter Inhibitoren zur Verifizierung des komplexen Systems. Anschließend wurden die unter Kapitel 2.11 beschriebenen Hausstaubextrakte in das kontinuierliche Mischsystem injiziert. Im Folgenden sind jeweils die Kontrollmessungen und eine exemplarische Messung mit der Hausstaubextraktprobe „B10“ dargestellt.

2.12.1 Acetylcholinesterase-Assay

Die Messung des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System erfolgte mit dem Substrat Acetylcholin. Die Abbildung 2-37 zeigt die Kontrollmessung dieses Assays über 30 min mit deutlich sichtbarer Substrat- und Produktpur. Je nach Einstellung der Ausgangskonzentrationen von Enzym und Substrat in den Superloops (siehe Abbildung 2-32) und der Länge des Reaktionscoils für die Enzym-Substrat-Reaktion (siehe Abbildung 2-33) variiert die Intensität an Substrat- und Produktpur im Massenspektrometer. Bei der in Abbildung 2-37 gezeigten Kontrollmessung liegt die Intensität der Produktpur deutlich über der Substratspur, was auf eine deutliche Reaktion zwischen Enzym und Substrat hinweist. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde die Kontrolllösung mit 20% Methanol injiziert, da die Hausstaubextrakte in einer 20%igen methanolischen Lösung vorlagen. Die Substrat- und Produktpuren in Abbildung 2-37 zeigten keine Schwankungen, daher sind ein negativer Effekt des Methanols auf das Enzym sowie ein falsch positiver Effekt durch Methanol in der Probe auszuschließen.

Im Folgenden wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 50 μM und 500 μM des bekannten Acetylcholinesterase-Inhibitors Galanthamin injiziert⁵⁰. Die Abbildung 2-38 a und b zeigen die Injektion von 50 μM Galanthamin in das HT-KM-MS-System mit dem Acetylcholinesterase-Assay.

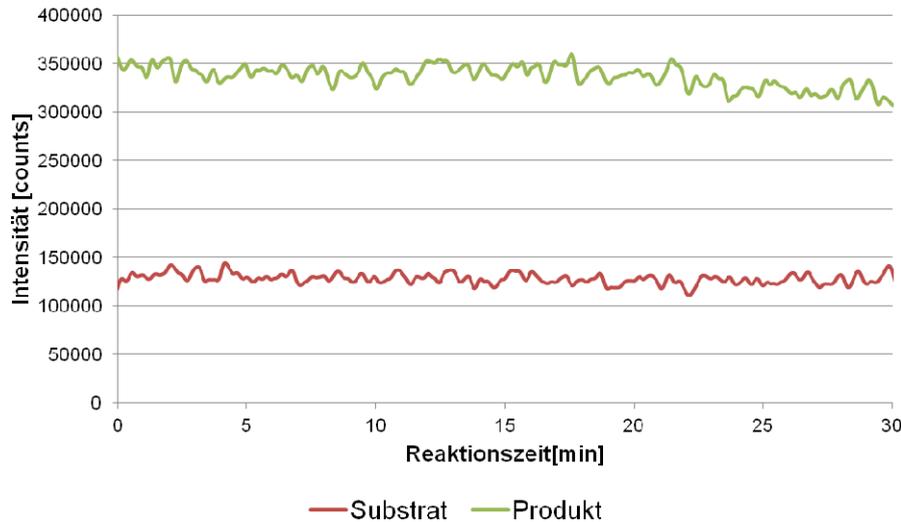


Abbildung 2-37: Massenspektrometrische Detektion des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System. Bei $t=0$ erfolgte die Injektion einer 20%igen methanolischen Lösung über die ZirChrom-PBD-Säule (100 x 1,0 mm, 3 μm). Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektierten Signale für das Substrat Acetylcholin und das Produkt Cholin über die gesamte Messzeit von 30 Minuten.

Die injizierte Lösung wurde wie unter Kapitel 2.11.2 beschrieben chromatografisch getrennt und wird ca. 13 min nach der Injektion am Massenspektrometer detektiert. Die Zeit, welche die injizierte Substanz bis zur Detektion benötigt, ist abhängig von der Flussrate, der chromatografischen Trennmethode und vor allem vom Innendurchmesser und von der Länge aller Verbindungsstücke und Reaktionscoils. Die Peakbreite von ca. zwei bis drei Minuten ist für diese Verweilzeit im System ein gutes Ergebnis. Im Bereich des Inhibitors ist eine Abnahme der Produktpur zu erkennen, was die Inhibition des Enzyms Acetylcholinesterase durch Galanthamin bestätigt. Eine Zunahme der Substratspur kann nicht beobachtet werden, was an Signalunterdrückung oder Konzentrationseffekten liegen kann.

⁵⁰ de Jong, C.F., Derks, R.J., Bruyneel, B., Niessen, W., and Irth, H. (2006). High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *J. Chromatogr. A* 1112, 303-310.

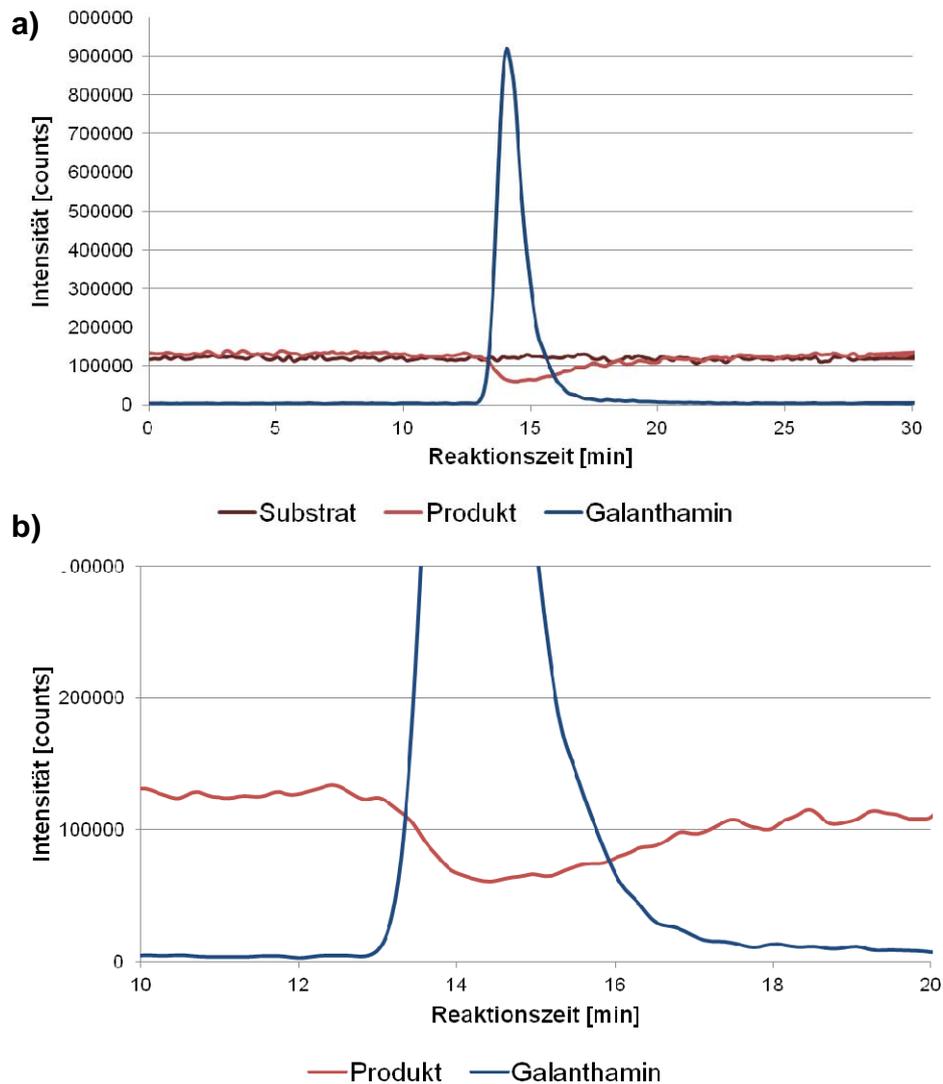


Abbildung 2-38: Massenspektrometrische Detektion des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System. Bei $t=0$ erfolgte die Injektion von $50 \mu\text{M}$ des Inhibitors Galanthamin über die ZirChrom-PBD-Säule ($100 \times 1,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$). Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektierten Signale für das Substrat Acetylcholin, das Produkt Cholin und den Inhibitor Galanthamin. (a) zeigt alle Signale über die gesamte Messzeit von 30 Minuten, (b) zeigt einen Ausschnitt mit Fokus auf die abnehmende Produktpur im Bereich des Inhibitors.

Nach Verifizierung des HT-KM-MS-Systems mit dem bekannten Inhibitor Galanthamin erfolgte die Injektion von Hausstaubextrakten. Zur weiteren Überprüfung des Systems wurden die Hausstaubextrakte mit Galanthamin dotiert, um eventuelle Matrixeffekte zu erkennen bzw. auszuschließen. Die Abbildung 2-39 zeigt die Injektion des Hausstaubextrakts „B10“ mit (a) und ohne (b) Zusatz von Galanthamin.

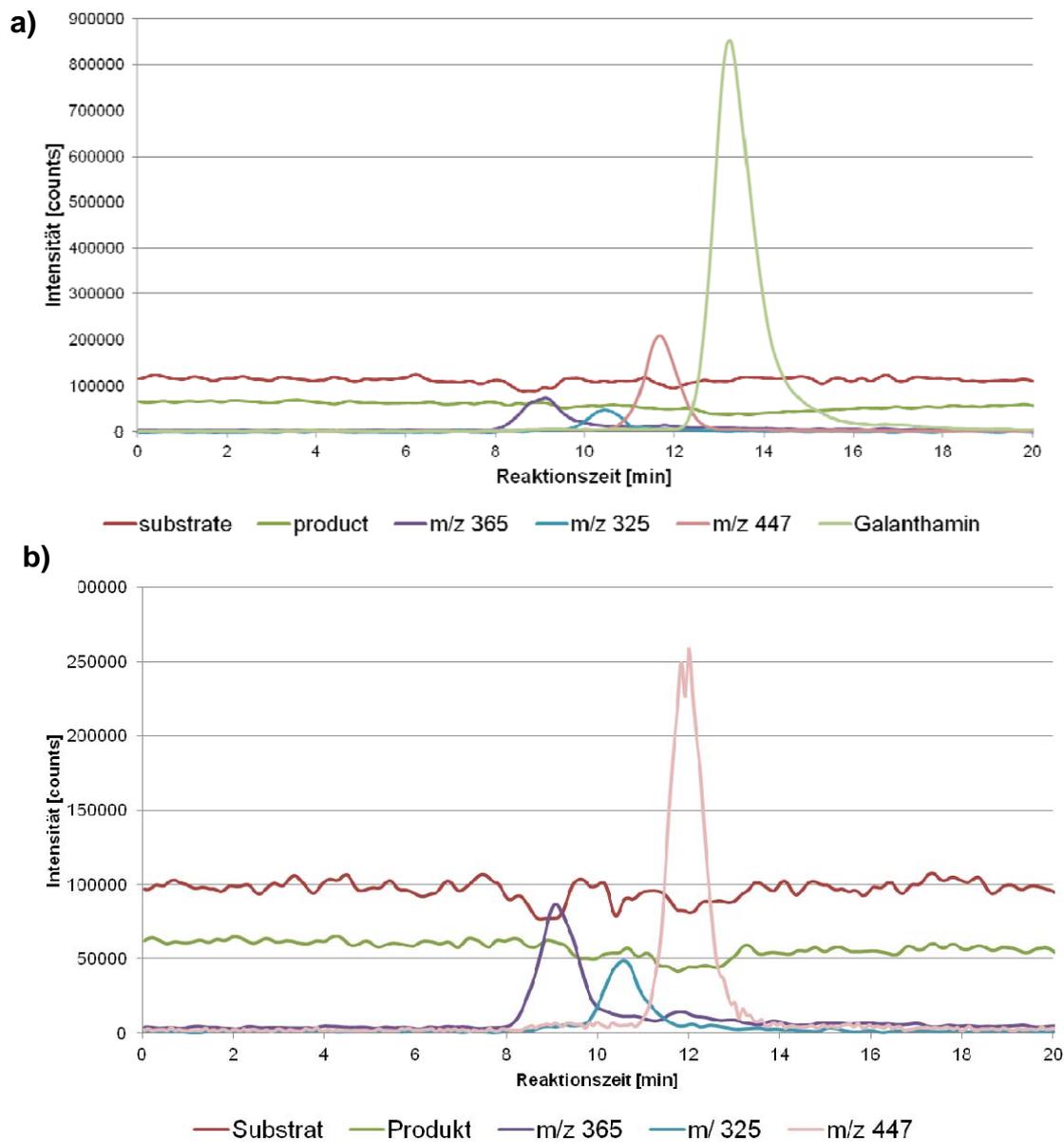


Abbildung 2-39: Massenspektrometrische Detektion des Acetylcholinesterase-Assays im HT-KM-MS-System. Bei $t=0$ erfolgte die Injektion des Hausstaubextrakts „B10“ mit (a) Zusatz von $50 \mu\text{M}$ Inhibitor Galanthamin und (b) ohne Zusatz von Galanthamin. Die Injektion erfolgte über die ZirChrom-PBD-Säule ($100 \times 1,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$). Die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse von deutlich erkennbaren Signalen sind exemplarisch dargestellt.

Bei der Injektion des Hausstaubextrakts können einige Signale der Injektion der Extraktprobe zugeordnet werden. Diese wurden in den Kontrollmessungen nicht detektiert. In Abbildung 2-39 sind exemplarisch deutlich erkennbare Signale mit den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen $m/z = 365$, $m/z = 325$ und $m/z = 447$ dargestellt.

Durch MS/MS-Messungen konnten die unbekanntenen Signale teilweise identifiziert werden, was im vorliegenden Fall für $m/z = 365$ erfolgte das dem Na-Addukt des Saccharosemoleküls zugeordnet werden konnte. Trotz des komplexen Aufbaus des Systems und der langen Weglängen konnten die einzelnen Substanzen am Massenspektrometer getrennt detektiert werden. Im Falle einer inhibitorischen Substanz im Extrakt würde an der entsprechenden Stelle im Enzym-Assay eine abnehmende Produktpur und eine zunehmende Substratspur zu erwarten sein. Um dies weiter zu untersuchen, könnten noch höhere Konzentrationen oder Extrakte unterschiedlicher Polaritäten getestet werden. Der Zusatz von Inhibitor zum Extrakt zeigt, wie in Abbildung 2-39 a dargestellt, jedoch eine Abnahme der Produktpur. Ein falsch negatives Ergebnis kann somit durch Matrixeffekte ausgeschlossen werden.

Um eine bessere Darstellung der Messdaten zu erhalten und mögliche Beeinflussungen der Enzymreaktionen abschätzen zu können, wurden die Originaldaten (Abbildung 2-39) durch eine Glättungsmethode des Programms Origin (Vers. 8.5.1, OriginLab Corporation) angepasst. Hierbei erfolgte nach einer Fast-Fourier-Transformation die Anwendung eines parabolischen Tiefpassfilters, so dass alle hohen Frequenzen verworfen werden und das wahre Signal dadurch besser sichtbar wird. Die Bearbeitung der Daten aus Abbildung 2-39 mit dieser Glättungsmethode für die Messung mit dem Acetylcholinesterase-Assay mit Injektion von Inhibitor Galanthamin und Injektion von Hausstaubextrakt „B10“ ist in Abbildung 2-40 dargestellt. Bei der vorliegenden Probe „B10“ ist keine Regulation des Acetylcholinesterase-Assays zu beobachten.

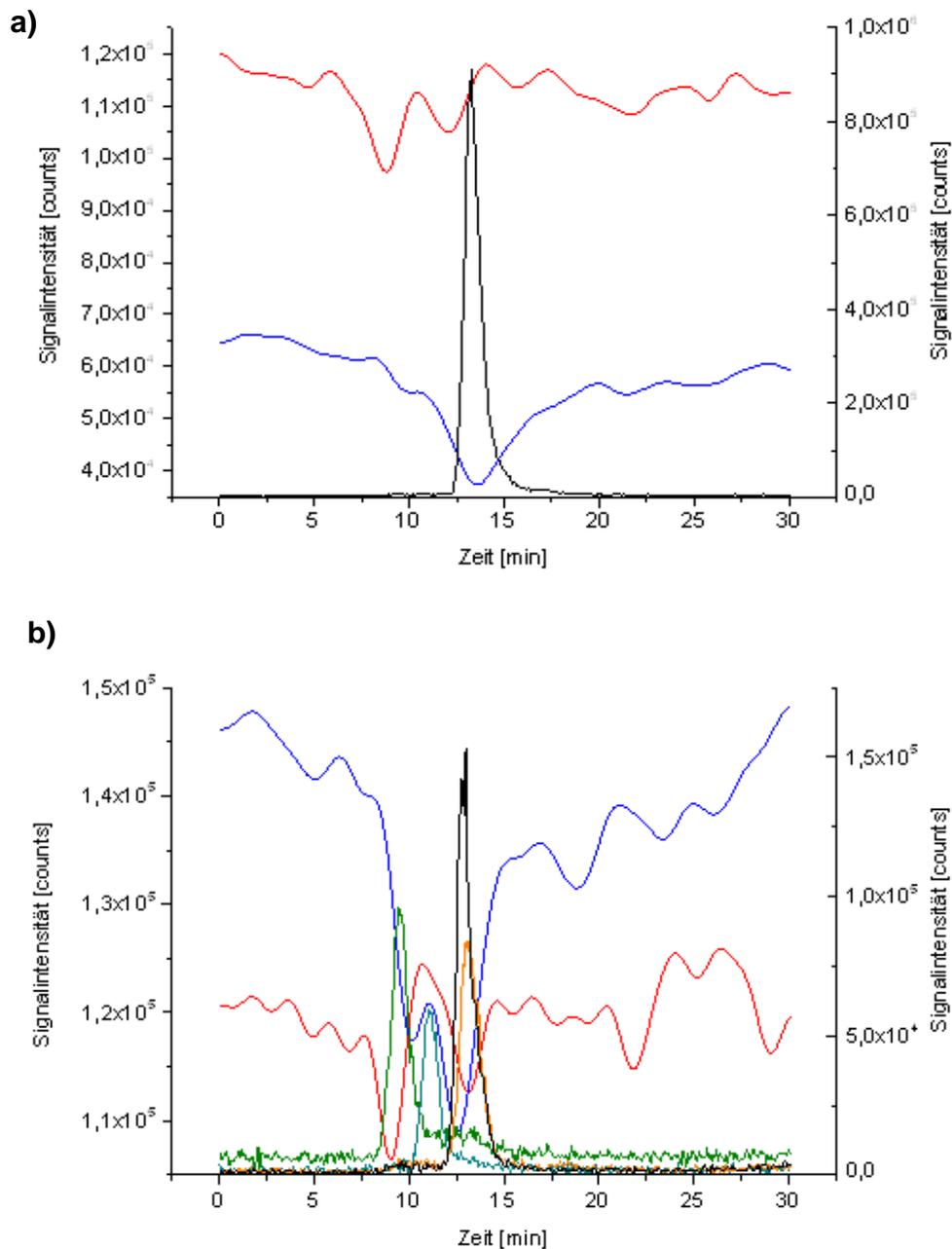


Abbildung 2-40: (a) Messung wie in Abbildung 2-39 oben und (b) Messung wie in Abbildung 2-39 unten dargestellt. Hier wurden die Daten nach FFT-Glättung mit der Grenzfrequenz 0,59 Hz geglättet. Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektierten Signale für das Substrat Acetylcholin (rot), das Produkt Cholin (blau) und den Inhibitor Galanthamin (schwarz). Zusätzlich in (b) exemplarisch aufgeführt sind aus dem Hausstaubextrakt stammende unbekannte Signale mit $m/z = 365$ (grün), $m/z = 324$ (hellblau), $m/z = 425$ (gelb) und $m/z = 447$ (violett). Die linke Achse zeigt die Signalintensität für die Substrat- und Produktpur, die rechte Achse zeigt die Intensität für die Galanthaminspur und die unbekannt Signale.

2.12.2 Chitinase-Assay

Als weitere Untersuchung im HT-KM-MS-System erfolgte die Anwendung des Enzym-Assays mit dem Enzym Chitinase. Als Substrat dient hier ein Hexasaccharid, wobei durch Enzymreaktion drei Produkte, d. h. Di-, Tri- und Tetrasaccharid entstehen.

In Abbildung 2-41 sind die Messungen mit dem Chitinase-Assay exemplarisch dargestellt. Die Abbildung 2-41 a zeigt die Kontrollmessung mit Injektion einer 20%igen methanolischen Lösung. Über die gesamte Messzeit von 30 Minuten sind die Substrat- und Produktpuren konstant und zeigen keine Schwankungen. Das Enzym Chitinase wurde durch die Injektion der Kontrolllösung nicht beeinflusst.

Als möglicher Inhibitor für das Enzym Chitinase gilt das Trisaccharid (GlcNAc)₃, welches in Abbildung 2-41 a bis c als Produkt 2 zu erkennen ist. (GlcNAc)₃ ist ein bekannter Feedback-Inhibitor für Lysozym und Chitinase und wurde daher in das System injiziert^{51, 52}. In diesem Assay konnte jedoch bei Konzentration bis zu 1 mM (GlcNAc)₃ keine Inhibition beobachtet werden. Aus eigenen Studien ist bekannt, dass der Inhibitor erst ab Konzentrationen über 750 µM inhibierend auf Lysozym wirkt. Eine weitere Erhöhung der Konzentration des Inhibitors im vorliegenden System über 1 mM wurde nicht durchgeführt, um die Säule nicht zu überladen. Daher kann in Abbildung 2-41 b keine Inhibition der Chitinase durch (GlcNAc)₃ beobachtet werden. Weiterhin wurde der Hausstaubextrakt „B10“ in das System injiziert. Wie oben beschrieben können einige unbekannte Signale detektiert werden. In der vorliegenden Messung waren deutliche Signale für $m/z = 365$, $m/z = 347$, $m/z = 447$ und $m/z = 387$ zu erkennen. Durch MS/MS-Messungen konnte Saccharose identifiziert werden ($m/z = 365$, Na-Addukt). Die Zunahme der Spur für Produkt 1, d. h. Disaccharid (GlcNAc)₂, kann dadurch erklärt werden, dass dieses Molekül im Extrakt vorhanden ist. Dies wurde durch Injektion des Hausstaubextrakts in das System ohne Anwesenheit von Enzym bestätigt. Ansonsten konnte durch die Injektion des Hausstaubextrakts „B10“ keine Beeinflussung des Enzyms Chitinase beobachtet werden.

⁵¹ Denhart, N., and Letzel, T. (2006). Mass spectrometric real-time monitoring of enzymatic glycosidic hydrolysis, enzymatic inhibition and enzyme complexes. *Anal Bioanal Chem* 386, 689-698.

⁵² Denhart, N., Weigang, L.M.M., Fujiwara, M., Fukamizo, T., Skriver, K., and Letzel, T. (2009). 26 kDa endochitinase from barley seeds: real-time monitoring of the enzymatic reaction and substrate binding experiments using electrospray ionization mass spectrometry. *FEBS J* 143, 274-283.

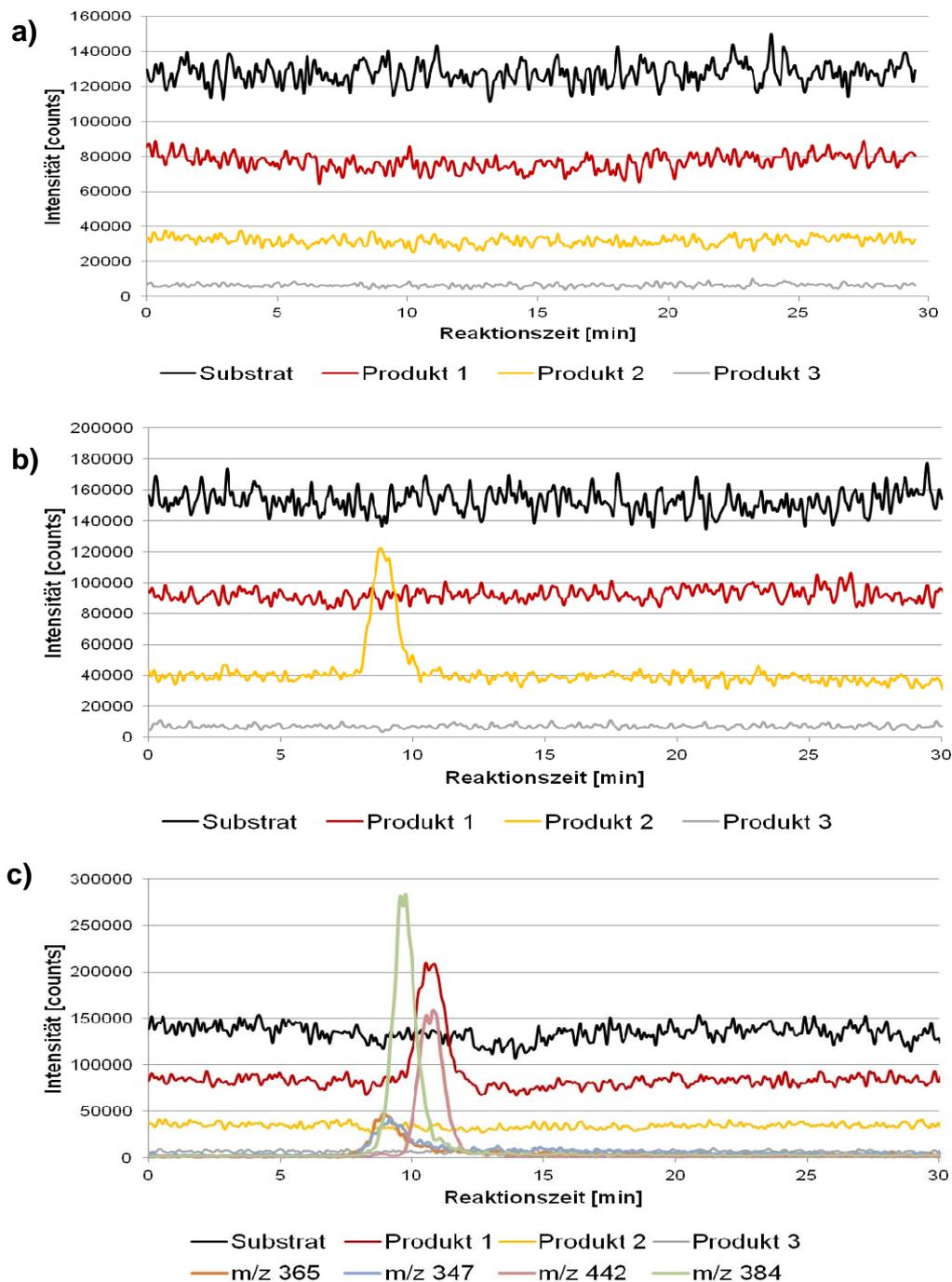


Abbildung 2-41: Massenspektrometrische Detektion des Chitinase-Assays im HT-KM-MS-System. (a) Bei $t=0$ erfolgte die Injektion einer 20%igen methanolischen Lösung, bei (b) die Injektion des potenziellen Inhibitors $(\text{GlcNAc})_3$ mit $750 \mu\text{M}$ und bei (c) die Injektion des Staubextrakts „B10“ über die ZirChromPBD-Säule ($100 \times 1,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$). Dargestellt sind die kontinuierlich am Massenspektrometer detektierten Signale für das Substrat $(\text{GlcNAc})_6$, das Produkt 1 $(\text{GlcNAc})_2$, Produkt 2 $(\text{GlcNAc})_3$ und Produkt 3 $(\text{GlcNAc})_4$. Exemplarisch in (c) aufgeführt sind aus dem Hausstaubextrakt stammende unbekannte Signale mit $m/z = 365$, $m/z = 347$, $m/z = 442$ und $m/z = 384$.

2.13 Projektbegleitende Programmierung von Software zur automatischen Erkennung und Auswertung enzymatischer Funktionen

Das Screening von komplexen Proben, wie in diesem Projekt mittels chromatografischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion am Beispiel von Hausstaubextrakten gezeigt, liefert eine große Menge an Daten in kurzer Zeit. Ein einziges Experiment kann tausende Massenspektren und extrahierte Ionenchromatogramme (EIC) ergeben. Die Datenmenge ist u. a. abhängig von der Komplexität der analysierten Probe, der Anzahl an Substraten und Produkten im enzymatischen Assay sowie von der Messzeit. Auch die schnelle Weiterentwicklung der Messgeräte führt zur Akquisition immer größerer Datenmengen.

Aufgrund der besonderen Ansprüche dieses Projekts an die Auswertesoftware wurden neue Programmmodule einer in mehreren vorhergegangenen Projekten gestarteten Softwareentwicklung weitergeführt. Dies erfolgte in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Diese Software, die unter der Bezeichnung „Achroma“ firmiert, läuft im Betriebssystem Windows und wird Interessenten kostenlos bereitgestellt (Kontakt Projektleiter PD DR. Thomas Letzel). Für die Bearbeitung der Daten in der Achroma Software müssen die Massenspektrometrie Messdaten als .txt Daten vorliegen. Dazu wird der komplette Datensatz über ein Modul in der Analysesoftware als .txt Datei extrahiert. Diese Daten können dann in die Achroma Software geladen und dort bearbeitet werden.

Die Funktion und die einzelnen Module der Software werden im Folgenden an einer Beispielmessung erläutert. Die Messung erfolgte im kontinuierlichen Mischsystem mit der Acetylcholinesterase als Enzym und Acetylcholin als Substrat, wobei Galanthamin als bekannter Inhibitor der Acetylcholinesterase injiziert und mittels Hochtemperatur-Chromatografie getrennt wurde. Für die Datenauswertung wurde zunächst die entsprechende auszuwertende Datei in die Software geladen (Abbildung 2-42 (a)). Die Daten wurden mit einem gleitenden Durchschnitt mit einer zehnfachen Glättung als Funktion, ähnlich der Savitzky–Golay Glättung, geglättet (Abbildung 2-42 (c)). Nun können bestimmte Masse-zu-Ladungsbereiche (m/z), beispielsweise der Substrate, der Produkte oder des Inhibitors ausgewählt werden, um das entsprechende extrahierte Ionenchromatogramm (EIC) anzuzeigen (Abbildung 2-42 (b)). Die Abbildung 2-42 zeigt das EIC vom Inhibitor Galanthamin im Bereich von $m/z = 288$ bis $m/z = 289$. Galanthamin wurde in das laufende Enzymsystem injiziert und wird am Massenspektrometer nach 33,9 min detektiert.

Eine Besonderheit dieser Software ist die Erkennung von positiven und negativen Signalen und die Berechnung der Signalfächen. Abbildung 2-42 (e) zeigt das Signal von Galanthamin mit einer Peakfläche von 1377502. Im Bereich des Inhibitors sind eine Zunahme der Substratspur und eine Abnahme der Produktpur zu erwarten. Die Abbildung 2-43 zeigt das EIC des Produkts Cholin im Bereich von $m/z = 104$ bis $m/z = 105$. Im Elutionsbereich des Galanthamins bei 33,3 min erkennt die Software ein negatives Produktsignal mit einer Peakfläche von 370 206. Die Erkennung der positiven und negativen Signale erfolgte mit der Achroma Software automatisch. Einzelne Peaks können jedoch auch manuell eingegeben werden und die Start- und Endzeit der Integration können manuell verändert werden.

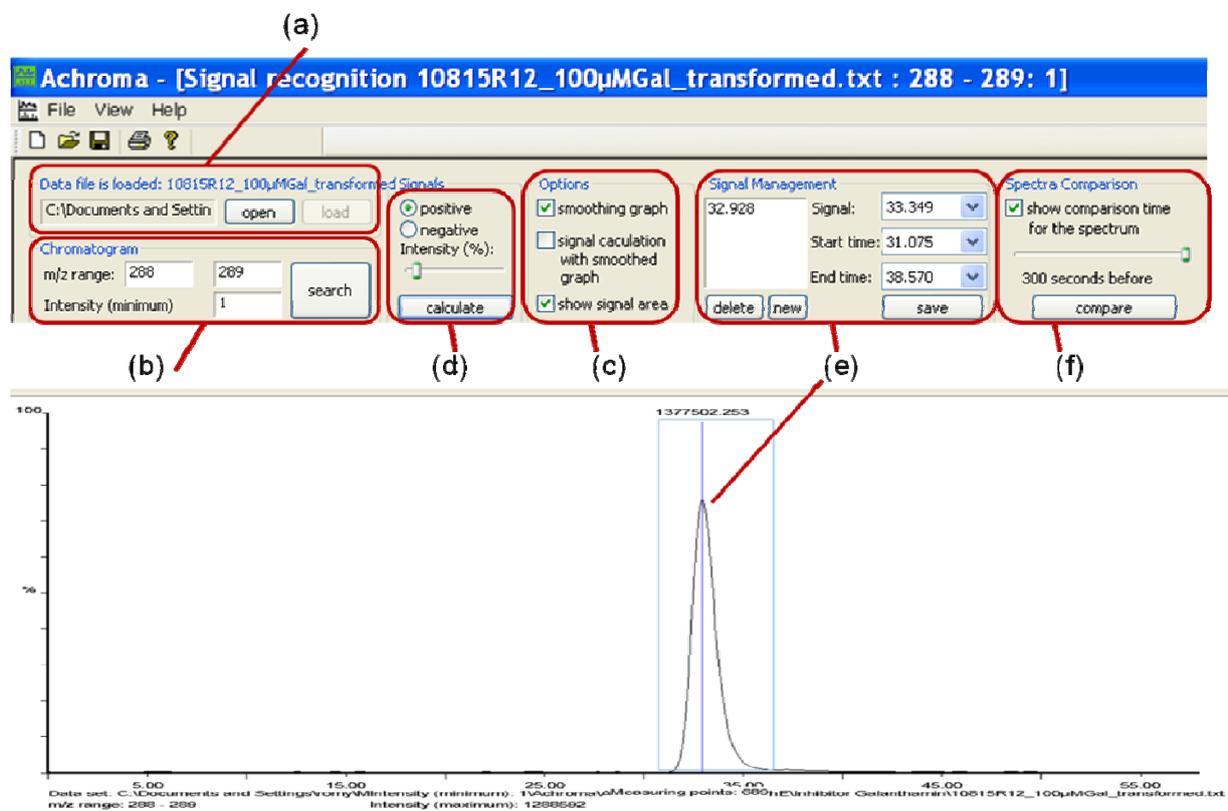


Abbildung 2-42: Benutzeroberfläche der Software Achroma. (a) Laden der Daten, (b) Darstellung von extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC), (c) Glättung der Daten, (c, d, e) Erkennung und Berechnung der Fläche von positiven und negativen Signalen und (f) Vergleich von zwei Spektren.

Eine weitere Besonderheit der Software ist die Bildung eines Differenzspektrums zwischen zwei Spektrenbereichen, beispielsweise zwischen der EIC Basislinie und einem Bereich des Spektrums von besonderem Interesse, z. B. im Bereich eines positiven oder negativen Signals (Abbildung 2-42(f)).

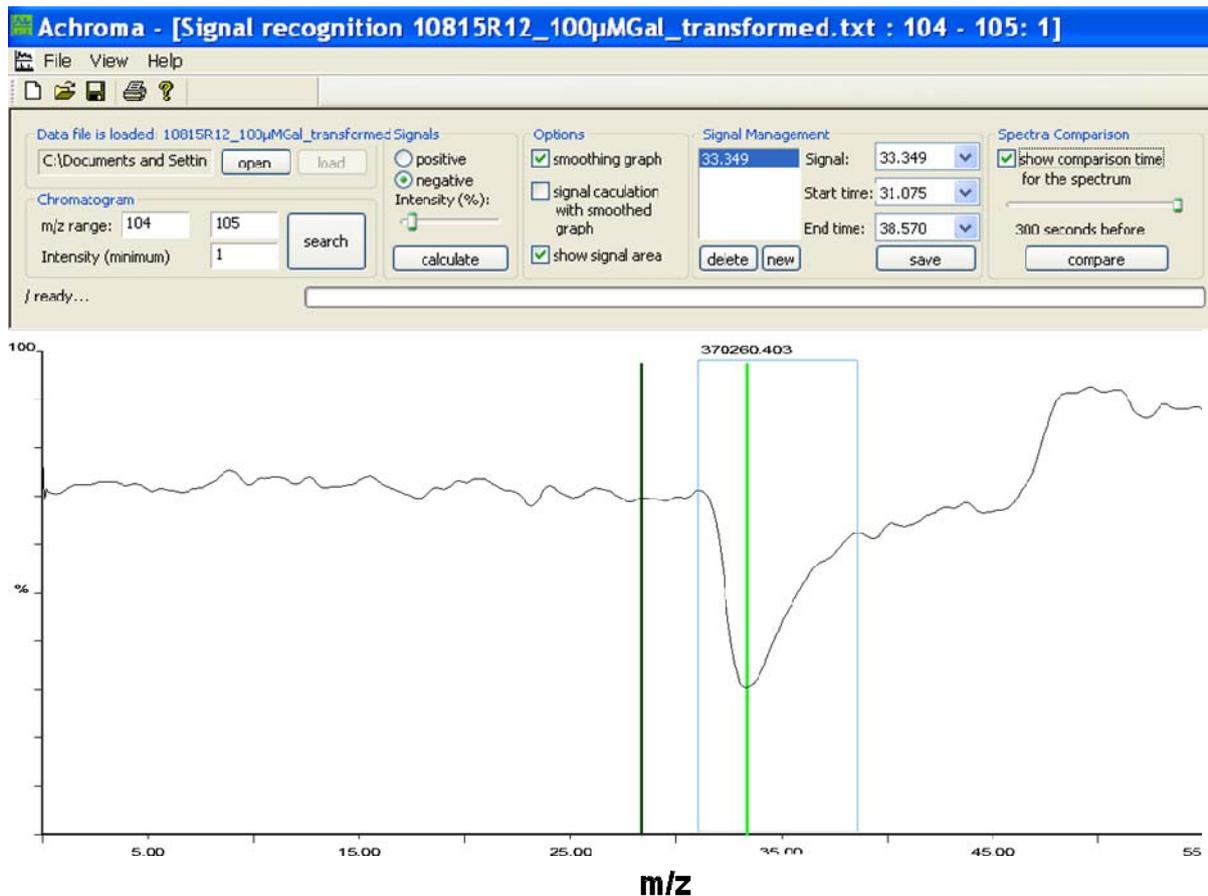


Abbildung 2-43: Darstellung von extrahierten Ionenchromatogrammen mit der Achroma Software. Abgebildet ist die Produktpur im Masse-zu-Ladungsbereich von $m/z = 104$ bis $m/z = 105$ des Acetylcholinesterase-Assays im kontinuierlichen Mischsystem.

Abbildung 2-43 zeigt ein negatives Signal in der Produktpur des Enzym-Assays. Wird das Spektrum in diesem Bereich zum Zeitpunkt bei 33,3 min mit einem früheren Zeitpunkt in der Basislinie, z. B. bei 28,3 min, verglichen, so kann mit der Software das Differenzspektrum beider Spektren angezeigt werden (Abbildung 2-44). In diesem Vergleich ist ein Peak bei $m/z = 288$ deutlich zu erkennen, jedoch nur im Spektrum des negativen EIC Bereichs und nicht im Bereich der Basislinie. Die Abnahme der Produktpur erfolgte somit durch eine Inhibition des Enzyms durch den Inhibitor Galanthamin und der damit verbundenen verminderten Produktbildung. Auf diese Art können Substanzen identifiziert werden, welche im kontinuierlichen Mischsystem Änderungen in der Produkt- oder der Substratpur des Enzym-Assays hervorrufen und somit potenzielle Regulatoren für das Enzym sein können.

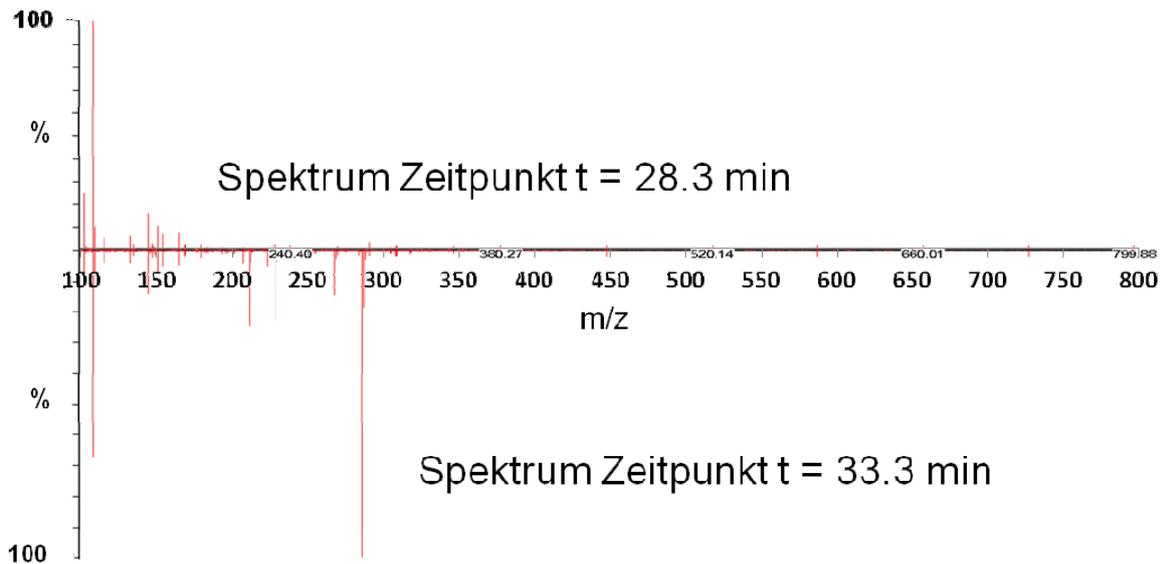


Abbildung 2-44: Bildung eines Differenzspektrums aus dem extrahierten Ionenchromatogramm zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Software Achroma.

Weiterhin bietet die Achroma Software die Möglichkeit zur Berechnung der Beziehung zwischen zwei extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC). Dies ist vor allem bei der Verwendung von internen Standards von Bedeutung. In Abbildung 2-43 ist nach ca. 47 min ein Anstieg der EIC Basislinie der Produktpur zu beobachten. Durch Verwendung eines „internen Standards“ kann überprüft werden, ob Schwankungen in der Substrat- und/oder Produktpur möglicherweise nicht durch regulatorische Substanzen hervorgerufen werden, sondern durch Druck- oder Flussschwankungen bzw. durch Diffusions- oder Adsorptionseffekte im System (Kapitel 2.9). Im Beispiel wurde deshalb zur Kontrolle des Systems eine Substanz (Histidin) zur Enzymlyösung hinzugefügt. Das Histidin durchläuft somit das komplette System, wobei Änderungen im EIC des Histidins, begleitet von Änderungen in der Substrat- und Produktpur, auf Schwankungen im System hinweisen. In Abbildung 2-45 (b) ist die Zunahme der Produktpur ab ca. 47 min zu erkennen, gleichzeitig auch die Zunahme der Spur des Histidins (c). Die Bildung des Quotienten aus Produkt und internem Standard gleicht diese Schwankung aus (a).

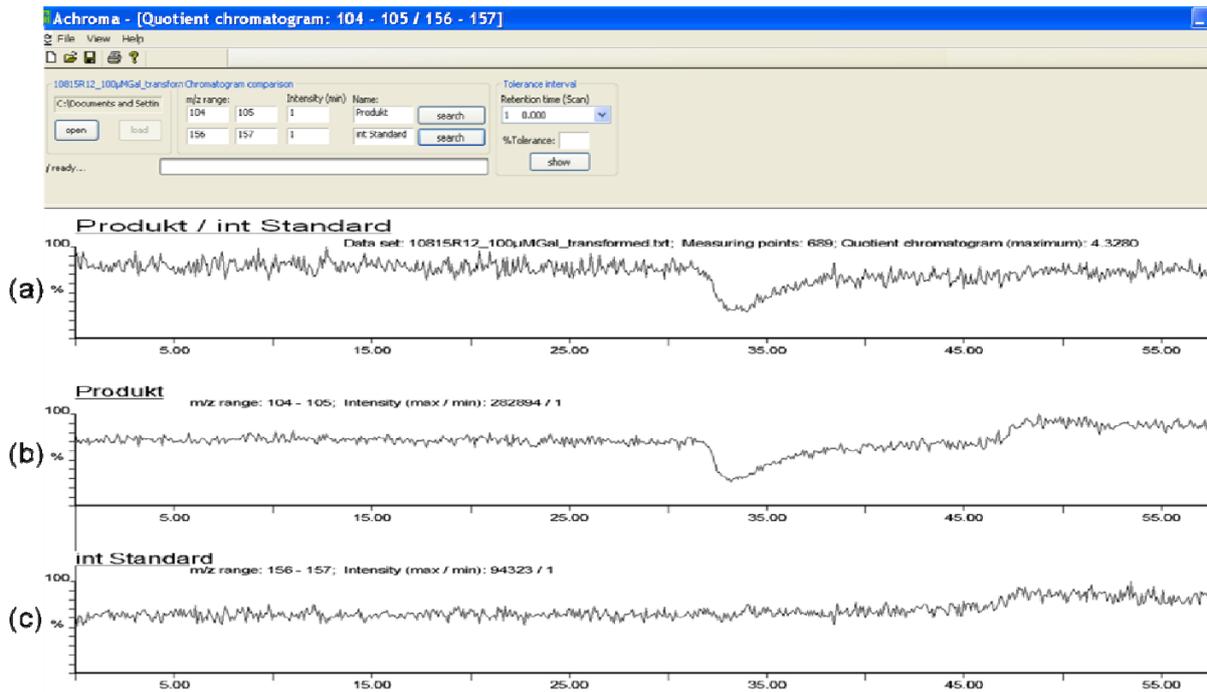


Abbildung 2-45: Vergleich von zwei extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC) mit der Achroma Software. (a) Quotient aus dem EIC der Produktpur (b) und des internen Standards (c).

Fazit: Die Software wurde speziell auf die Anforderungen der Messungen im kontinuierlichen Mischsystem angepasst. Wichtig ist hierbei die Auswertung negativer Signale bei regulatorischen Effekten. Zur Identifizierung regulatorischer Substanzen kann der Spektrenvergleich herangezogen werden.

3 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Abgrenzung zum Anschlussantrag

3.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrags

Die Zielsetzung des ursprünglichen Forschungsantrags bestand in der Entwicklung eines miniaturisierten und voll automatisierten analytischen Verfahrens auf Grundlage der direkt gekoppelten Hochtemperatur-HPLC mit einem enzymatischen Assay zur Analyse von Hausstaubproben. Mit Hilfe dieses Verfahrens sollten in Hausstaub enthaltene Umwelttoxine identifiziert werden.

Auf Grundlage der in Kapitel 2 beschriebenen wissenschaftlich-technischen Ergebnisse wurde belegt, dass mit Abschluss des Vorhabens eine analytische Plattform zur Verfügung steht, die die direkte Kopplung der Hochtemperatur-HPLC mit einem enzymatischen Assay zur Analyse von Hausstaubproben ermöglicht.

Obwohl somit das übergeordnete Ziel voll erreicht wurde, ist eine Reihe weiterer technischer Maßnahmen notwendig, um das Verfahren als Routineverfahren nutzen zu können. Diese Maßnahmen, die nicht Bestandteil des Forschungsantrags waren bzw. die sich aus den Ergebnissen des Forschungsvorhabens ableiten, werden in den nachfolgenden Kapiteln kurz zusammengefasst.

3.1.1 Entwicklung eines Reaktions-Chips

Die in diesem Bericht aufgeführten Ausführungen zeigen deutlich, dass signifikante Verbesserungen des kompletten analytischen Systems nötig sind, um die Gesamteffizienz des Verfahrens zu erhöhen. Insofern grenzt sich das hier bearbeitete Forschungsvorhaben von den im Anschlussvorhaben durchzuführenden Arbeiten eindeutig ab, da in diesem Antrag der Fokus auf die Optimierung des analytischen Systems gelegt wird. Dies wird erreicht durch die Übertragung des in diesem Projekt aufgebauten Verfahrens auf einen so genannten „Reaktions-Chip“. Die Auslegung dieses Reaktions-Chips erlaubt es, die Mischvorgänge von mobiler Phase mit dem Substrat bzw. Enzym so zu optimieren, dass Totvolumina, die zu exzessiver Bandenverbreiterung führen, auf ein Minimum reduziert werden können.

Mit Hilfe der Strömungssimulation soll eine gezielte Auslegung der Reaktionskanäle sowie des optimalen Aufbaus des Reaktions-Chips ermittelt werden (siehe hierzu Ausführungen im Projektantrag). In dem hier durchgeführten Projekt wurden Trennsäulen mit einem Innendurchmesser von 1 mm verwendet, da sich gezeigt hatte, dass eine weitere Reduzierung des Innendurchmessers zu einer Überladung der Trennsäule führt. Hierdurch ist keine Peakfokussierung insbesondere der polaren Analyten möglich.

Des Weiteren stellte sich die Kopplung zwischen der Trenn- und Mischeinheit mit dem Detektionssystem als Problem heraus. Typische Einlassquellen für Massenspektrometer sind zwar auch für einen niedrigen Flussbereich bis $5 \mu\text{L min}^{-1}$ spezifiziert, allerdings sind die Totvolumina zu groß, was zu signifikanter Bandenverbreiterung und somit zu deutlich höheren Nachweisgrenzen führt. Vor diesem Hintergrund soll der zu entwickelnde Reaktions-Chip eine Kopplung mit einem Massenspektrometer über ein direkt integriertes Emitter-Tip ermöglichen.

3.1.2 Übertragung des Verfahrens auf Lebensmitteltechnik

Innerhalb dieses Projekts wurde der Fokus auf die Matrix Hausstaub gelegt. Die Begründung für die Relevanz solcher Untersuchungen anhand aktueller Studien kann dem Kapitel 2.1 entnommen werden. Nach Abschluss des Projekts bleibt festzuhalten, dass insbesondere zur endgültigen Klärung der im Antrag definierten Ziele weiterer Forschungsbedarf besteht. Zum Teil sind toxische Substanzen nur in einer extrem niedrigen Konzentration vorhanden. Die hier entwickelte Kopplungstechnik zieht das Problem nach sich, dass aufgrund der Bandenverbreiterung eine Detektion im Spurenbereich nicht möglich ist. Durch die Übertragung des Verfahrens auf weitere relevante Applikationsfelder, wie z. B. der Lebensmitteltechnik und der pharmazeutischen Wirkstoffforschung, kann dieser Nachteil behoben werden, da die Konzentration der Targetanalyten in der Matrix deutlich größer ist.

Des Weiteren können die im Anschlussvorhaben geplanten Versuche, die sich auf das Multiplexing und die Etablierung neuer Enzymsysteme beziehen, an dem modifizierten Massenspektrometrieaufsatz (Robotereinheit) durchgeführt werden. Innerhalb des hier bearbeiteten Projekts wurden zentrale Probleme, die mit der Modifizierung der Robotereinheit zusammenhängen, erfolgreich gelöst. Da diese Technik erstmalig für eine solche Fragestellung zum Einsatz kam, konnten die Probleme im Vorfeld der Antragsstellung nicht in vollem Umfang abgeschätzt werden.

3.1.3 Chromatografische Methodenentwicklung und Mikrofluidik

Die chromatografische Methodenentwicklung sowie die Aufarbeitung der Extrakte durch Mikroextraktionsverfahren können nach Abschluss des laufenden Forschungsvorhabens weitgehend als abgeschlossen betrachtet werden, weshalb eine Adaption an neue Methoden schnell erfolgen kann. Obwohl die DPX-Extraktion innerhalb des Projekts nicht als vollautomatisiertes Verfahren angewendet wurde, lassen sich die manuellen Arbeitsschritte ohne weiteren Aufwand auf ein vollautomatisiertes System übertragen.

Die durch IUTA im Anschlussantrag auszuführenden Arbeiten konzentrieren sich deshalb im Wesentlichen auf die mikrofluidische Auslegung des Reaktions-Chips. Die Abbildung der Mischungsvorgänge bildet die Grundlage einer weiteren Miniaturisierung des Gesamtsystems. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Reaktionskinetik durch Variation des Mischungsverhältnisses von HPLC-Eluat, Enzym und Substrat zu optimieren, so dass einerseits eine schnelle Umsetzung zwischen Enzym und Substrat erfolgt und andererseits der Verbrauch an Enzym und Substratlösung durch die Herabsetzung des Flusses vom Mikroliter- in den Nanoliterbereich gesenkt wird.

3.1.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ziel des Forschungsvorhabens erreicht wurde und dass sich die im Anschlussvorhaben geplanten Arbeiten eindeutig von den im aktuellen Vorhaben durchgeführten Arbeiten abgrenzen.

3.2 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihren innovativen Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Die in diesem Vorhaben entwickelte technische Plattform der direkten Kopplung zwischen Hochtemperatur-HPLC und Enzym-Assay mit massenspektrometrischer Detektion bildet die Grundlage für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in allen Bereichen der Life Sciences. Wie bereits in Kapitel 3.1 dargelegt, sind weitere technische Maßnahmen notwendig, um eine vollständige Umsetzung der hier erzielten Ergebnisse in die industrielle Praxis zu erreichen. Für viele Unternehmen aus dem Bereich der Analysen- und Mikrosystemtechnik bietet sich die Möglichkeit, neue Produkte auf Grundlage der hier aufgeführten Ergebnisse zu entwickeln.

3.2.1 Mikrosystemtechnik

Laut aktueller Angaben des BMBF beschäftigt die Branche in Deutschland rund 766.000 Mitarbeiter, bei einem Umsatzvolumen von mehr als 82 Milliarden Euro in 2009⁵³. Es werden Wachstumsraten von bis zu 10% jährlich prognostiziert. Die Schlüsseltechnologie Mikrosystemtechnik gehört damit zu den wichtigsten Innovationsmotoren überhaupt. Gleichzeitig ist festzustellen, dass sich der Mikrosystemtechnik-Markt durch einen besonders großen Anteil hoch spezialisierter Mittelständler auszeichnet, die kundenspezifische Lösungen anbieten. Die in diesem Projekt entwickelte analytische Plattform schafft die Grundlagen für weitergehende Produktentwicklungen, die von allen interessierten kmU aufgegriffen und umgesetzt werden können.

⁵³ <http://www.bmbf.de/de/5701.php>

3.2.2 Analysen-, Bio- und Labortechnik

Laut aktueller Angaben des Fachverbands Spectaris für Analysen-, Bio- und Labortechnik sieht sich die Branche einem steigenden internationalen Wettbewerb und zunehmender Marktkonzentration ausgesetzt.

In diesem Umfeld sichern sich die deutschen Hersteller ihre Marktposition durch innovative Technologien, maßgeschneiderte Problemlösungen, spezialisierte Nischenprodukte, ein hohes Maß an Flexibilität und Kundenorientierung. Der Umsatz der rund 330 deutschen Unternehmen stieg 2010 um knapp 8% auf 6,13 Milliarden Euro. Mit dem Wachstum stieg auch die Zahl der Mitarbeiter in der Branche um 3,7% auf 35.700.

Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse können somit von einer Vielzahl von Unternehmen aus der Branche der Analysen-, Bio- und Labortechnik genutzt werden, um kundenspezifische Lösungen rund um die Aufarbeitung und Analytik komplexer Proben zu entwickeln.

3.3 Zusammenstellung aller Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen

Folgende Arbeiten wurden bzw. werden in Kürze veröffentlicht.

C. Portner, *Entwicklung flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub*, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg, 2012, Dissertation.

K. Oeste, T. Teutenberg, T. Letzel, *Defining the general limits for online hyphenation of enzyme assays with liquid chromatography*, Publikation in Vorbereitung.

K. Ingenbosch, *Untersuchung des Einflusses von Matrixeffekten auf die Quantifizierung mittels LC-MS/MS am Beispiel von Mykotoxinen im Hausstaub*, Fachbereich Chemie, Hochschule Niederrhein, Krefeld, 2011, Bachelor thesis.

M. Kläßen, *Identification of Acetylcholinesterase-Inhibitors in Environmental Samples using On-line Enzyme-Assay and HPLC-UV/VIS*, Fachbereich Biochemie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2012, Master thesis, in Bearbeitung.

R. K. Scheerle, J. Grassmann und T. Letzel, *Enzymatic conversion continuously monitored with a robotic nanoESI-MS tool: Experimental status*. Anal. Methods, 2011, 3, 822-830.

R. K. Scheerle und J. Grassmann, *LC-MS for the Determination of the Enzymatic Activity of Proteins*, in Protein and Peptide Analysis by LC-MS, T. Letzel, Editor. 2011, Royal Society of Chemistry: Cambridge, 133-141.

R. K. Scheerle, J. Grassmann und T. Letzel, *Real-time ESI-MS of enzymatic conversion: Impact of organic solvents and multiplexing*, Analytical Sciences, submitted.

3.4 Angaben über gewerbliche Schutzrechte, sofern sie erworben wurden, oder ihre Anmeldung beabsichtigt ist

Es wurden keine gewerblichen Schutzrechte erworben. Die Anmeldung gewerblicher Schutzrechte ist nicht geplant.

3.5 Einschätzung der Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und ggf. aktualisierten Transferkonzepts

Im Rahmen des abgeschlossenen Projekts wurden die Ergebnisse den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses in zwei Sitzungen präsentiert und ausgiebig diskutiert. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse einem breiten Interessentenkreis durch Vorträge und Poster auf nationalen und internationalen Tagungen und Kongressen vorgestellt. Während der gesamten Projektlaufzeit haben zahlreiche Beratungsgespräche, vornehmlich mit kmU aus dem Bereich der Analysetechnik, stattgefunden, um die weiteren technischen Maßnahmen zu diskutieren. Alle Angaben finden sich in der nachfolgenden Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Aktualisierter und fortgeschriebener Plan zum Transfer der Ergebnisse in die industrielle Praxis.

Datum/Zeitraum	Bereits umgesetzte Maßnahmen	Erläuterung
23.03.-26.03.2010	Posterbeitrag Analytica 2010 in München. „Development of a direct coupled mass spectrometric method for the fast determination of biological activity in house dust using an enzymatic assay“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Analytica. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle, Mess- und Prüftechnik sowie

		Biotechnologie, Life Sciences und Diagnostika.
22.04.2010	Erster Projektbegleitender Ausschuss in Duisburg.	Vorstellung des Projekts und Diskussion der ersten Ergebnisse.
14.06.-16.06.2010	Posterbeitrag 32. Mykotoxinworkshop, Lyngby, Dänemark. „Development of a direct coupled mass spectrometric method for the fast determination of enzymatic regulation in house dust using enzymatic assays“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des Mykotoxin-Workshops. Die internationale Veranstaltung der Gesellschaft für Mykotoxinforschung ist eine der größten Tagungen zum Thema Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln.
12.09.-16.09.2010	Posterbeitrag International Symposium on Chromatography (ISC) 2010 in Valencia, Spanien. “Development of a direct coupled mass spectrometric method for the fast determination of enzymatic regulation in house dust using enzymatic assays“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des International Symposium on Chromatography (ISC). Die ISC ist eine der größten internationalen Tagungen auf dem Gebiet der chromatografischen Trenntechnik und dient dem Austausch zwischen Industrie und Wissenschaft.
20.09.-22.09.2010	Posterbeiträge 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Stuttgart-Hohenheim. Titel der Poster: „Entwicklung direkt gekoppelter massenspektrometrischer Verfahren zur schnellen Erfassung der biologischen Aktivität von Hausstaub mittels μ Enzymassay“. „Miniaturisierung und Automatisierung massenspektrometrischer Verfahren zur Untersuchung von Enzymassays“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 39. Lebensmittelchemikertags. Bei dieser deutschsprachigen Veranstaltung treffen sich die Fachkollegen und Hochschullehrer aus dem Bereich der Lebensmittelchemie und –analytik.
21.09.-23.09.2010	Posterbeitrag ProcessNet Jahrestagung 2010 in Aachen. „Development of a direct coupled mass spectrometric method for the fast determination of enzymatic regulation in house dust using enzymatic assays“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der ProcessNet-Jahrestagung 2010. Die ProcessNet Jahrestagung ist eine gemeinsame Plattform der Chemischen Technik und Verfahrenstechnik von DECHEMA und VDI-GVC. Es besteht die Möglichkeit, sich über neueste industrielle Entwicklungen zu informieren und Kontakte zu Firmen zu knüpfen.
30.09.-02.10.2010	Posterbeitrag 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Präventivmedizin (GHUP) in Aachen. „Entwicklung direkt gekoppelter massenspektrometrischer Verfahren zur schnellen Erfassung der enzymatischen Regulation von Hausstaub mittels enzymatischer Assays“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Präventivmedizin (GHUP). Im Fokus dieser Tagung stehen u. a. Themen wie Schimmelpilze und Bioaerosole.
08.11.-09.11.2010	Posterbeitrag 7. Langenauer Wasserforum in Langenau. “Development of a direct coupled mass spectromet-	Vorstellung von Teilergebnissen innerhalb des Langenauer Wasserforums (LWF). Das LWF widmet sich den aktuellen Entwicklungen im Bereich der

	ric method for the fast determination of enzymatic regulation in house dust using enzymatic assays".	Wasser- und Umweltanalytik.
16.11.2010	Zweiter Projektbegleitender Ausschuss in Freising.	Vorstellung der erzielten Ergebnisse und Diskussion der weiteren Arbeiten.
09.01.-11.01.2011	Vortrag 21. Doktorandenseminar in Hohenroda. „Kopplung von Enzymassays mit Hochtemperatur-HPLC zur massenspektrometrischen Identifizierung von enzymregulatorischen Substanzen in komplexen Gemischen“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 21. Doktorandenseminars des Arbeitskreises Separation Science der Fachgruppe Analytische Chemie der GDCh. Das Seminar bietet Doktoranden/innen, die auf dem Gebiet der analytischen Trenntechniken tätig sind, die Gelegenheit, ihre Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient das Seminar dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.
22.03.-25.03.2011	Posterbeiträge ANAKON 2011 in Zürich. „Development of a method for the direct determination of enzymatic regulation in house dust using high temperature HPLC-MS and an enzymatic assay“. “Optimization of a miniaturized and automated setup for real-time monitoring of enzymatic assays by mass spectrometry“. “Adaptation of enzymatic reactions for use with a nanoESI-MS robotic setup“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Anakon. Die Anakon ist die deutschsprachige Analytik-Tagung, die u. a. dem Gebiet der analytischen Trenntechniken großen Platz einräumt und die Gelegenheit gibt, Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient die Tagung dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.
19.06.-23.06.2011	Posterbeiträge HPLC 2011 in Budapest. „The challenge of hyphenating a continuous flow system with capillary liquid chromatography for detection of enzymatic regulation in house dust“. “Coupling of high temperature HPLC with enzymatic assays – The issue of organic solvent“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der HPLC 2011. Die HPLC ist eine der größten Tagungen im Bereich der Flüssigchromatografie.
28.08.-31.08. 2011	Posterbeitrag 18 th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, Tbilisi, Georgien “Online-coupling of liquid chromatography with enzymatic assays“.	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des Electro- and Liquid Phase-separation-Symposiums 2011.
Kontinuierlich	Studienarbeiten zur Problematik des Forschungsvorhabens.	Kennenlernen und Vermitteln von wissenschaftlichen Erkenntnissen und Methoden, Heranführen von Studierenden an selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten.
Kontinuierlich	Beratung von kmU	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wurde fortlaufend über die gesamte Projektlaufzeit durchgeführt.

Datum/Zeitraum	Geplante Maßnahmen	Erläuterung
Nach Projektende Ab 2012	Aus- und Weiterbildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projekts erzielten Forschungsergebnisse über Seminare und Fortbildungsveranstaltungen. Die Seminare verbinden theoretische Grundkenntnisse mit der praktischen Tätigkeit im Labor und richten sich an HPLC-Anwender.
Nach Projektende Ab 2012	Akademische Ausbildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projekts erzielten Forschungsergebnisse in die Lehrveranstaltungen zur Analytischen Chemie an der Technischen Universität München sowie im Aufbaustudiengang Analytische Chemie. Des Weiteren werden die neuen Erkenntnisse in der Ausbildungsstätte für instrumentelle Analytik (AsiA) der TU München direkt in Kursen an akademische sowie nicht-akademische Teilnehmer weitergegeben. So werden die Informationen insgesamt jedes Jahr an mehrere hundert in der Ausbildung befindliche Personen vermittelt.

Das vorgeschlagene Transferkonzept konnte in allen wesentlichen Punkten erfolgreich umgesetzt werden.

4 Anhang

4.1 Material und Methoden

Tabelle 4-1: Verwendete Chemikalien.

Substanzen für die UV-Detektion	CAS Nr.	Hersteller
Aceton	67-64-1	LGC Standards
Acenaphthylen	208-96-8	Fluka
5 α -Androstan	521-18-6	Sigma-Aldrich
Cis-Androsteron	53-41-8	Sigma-Aldrich
Benz[a]anthracen	56-55-3	Fluka
Benzo[a]pyren	50-32-8	Fluka
Bisphenol A	80-05-7	Supelco
Bis(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)	117-81-7	Fluka
Chrysen	218-01-9	Sigma-Aldrich
Trans-Dehydroandrosteron	53-43-0	Sigma-Aldrich
Diethylphthalat (DEP)	84-66-2	Sigma-Aldrich
Epitestosteron	434-22-0	Sigma-Aldrich
Ergosterin	57-87-4	Fluka
Etiocholan	53-42-9	Sigma-Aldrich
Naphthalen	91-20-3	Fluka
Nikotin	54-11-5	Sigma-Aldrich
19-Nortestosteron	434-22-0	Sigma-Aldrich
Testosteron	58-22-0	Fluka
Substanzen für die ESI-MS-Detektion		
Aflatoxin B1	1162-65-8	Sigma-Aldrich
Aflatoxin B2	7220-81-7	Sigma-Aldrich
Benzylbutylphthalat	85-68-7	Sigma-Aldrich
Diacetoxyscirpenol	2270-40-8	Sigma-Aldrich
Diethylphthalat (DEP)	84-66-2	Sigma-Aldrich
Gliotoxin	67-99-2	Sigma-Aldrich
Nikotin	54-11-5	Sigma-Aldrich
Roridin A	14729-29-4	Iris Biotech GmbH
Stachybotryslactam	163391-76-2	Alexis Biochemicals
Sterigmatocystin	10048-13-2	Iris Biotech GmbH

Zearalenone 17924-92-4 Sigma-Aldrich

Lösungsmittel und Chemikalien		Qualität
2-Propanol	LGC Standards (Wesel, Deutschland)	ULC/MS grade
Eisessig	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)	ULC/MS grade
Acetonitril	LGC Standards (Wesel, Deutschland)	ULC/MS grade
Aceton	Sigma (Steinheim, Deutschland)	LC/MS grade
Ammoniumacetat	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)	ULC/MS grade
Ammoniumformiat	Biosolve (Valkenswaard, Netherlands)	ULC/MS grade
Ethanol	LGC Standards (Wesel, Deutschland)	ULC/MS grade
Ameisensäure	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)	ULC/MS grade
Methanol	LGC Standards (Wesel, Deutschland)	ULC/MS grade
Tetrahydrofuran	LGC Standards (Wesel, Deutschland)	ULC/MS grade
Wasser (HPLC-MS)	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)	ULC/MS grade
Wasser (HPLC-UV)	J.T. Baker (Griesheim, Deutschland)	gradient grade
Enzyme und Substrate		
Chitinase from Streptomyces griseus	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Acetylcholinesterase from electric eel	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Elastase from human Neutrophils	BioCentrum (Krakow, Polen)	
Elastase from porcine pancreas	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
α -Chymotrypsin	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Hexa-N-Acetylchitohexaose	American Diagnostica Inc. (USA)	
Acetylcholinchlorid	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
N-Suc-Tyr-Leu-Val-pNA	LOXO (Dossenheim, Deutschland)	
N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	LOXO (Dossenheim, Deutschland)	
Spectrozyme	LOXO (Dossenheim, Deutschland)	

Tabelle 4-2: *m/z* der verwendeten Analyten.

Analyt	Vorläufer-Ion <i>m/z</i>	Produkt-Ion <i>m/z</i>
Aflatoxin B1	313 [M+H] ⁺	128
Aflatoxin B2	315 [M+H] ⁺	259
Benzylbutylphthalat	313 [M+H] ⁺	91, 149
Diacetoxyscirpenol	384 [M+NH ₄] ⁺	105
Diethylphthalat	223 [M+H] ⁺	149, 177
Gliotoxin	327 [M+H] ⁺	263
Nikotin	163 [M+H] ⁺	117, 130
Roridin A	550 [M+NH ₄] ⁺	249
Stachybotryslactam	384 [M - H] ⁻	177
Sterigmatocystin	325 [M+H] ⁺	281
Zearalenon	317 [M - H] ⁻	131

Tabelle 4-3: Verwendete Geräte.

Gerätebezeichnung	Hersteller
Unique LC-TOFMS	Leco Instrumente GmbH (Mönchengladbach, Deutschland)
QTrap 3200 Massenspektrometer	ABSciex (Darmstadt, Deutschland)
Quadrupol Massenspektrometer	Knauer (Berlin, Deutschland)
IonTrap LCQ Duo Massenspektrometer	Thermo Finnigan (San Jose, USA)
HPLC-System 1100	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
LC10 HPLC-System	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
LC20 HPLC-System	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Eksigent nanoLC ultra 2D	Eksigent (Dublin, CA, USA)
Accelerated Solvent Extraction System 200	Dionex GmbH (Idstein, Deutschland)

Tabelle 4-4: Ausgewählte Analyten und die verwendeten Konzentrationen in der Probenaufarbeitung.

Analyt	Konz. Stammlösung	Zugegebenes Volumen	Resultierende Konz. in der Probe	Konz. Standard-Mix
Nikotin	100 µg/mL	50 µL	20 µg/g	0,5 µg/mL
Aflatoxin B1	1 mg/mL	50 µL	200 µg/g	5 µg/mL
Diethylphthalat	100 µg/mL	50 µL	20 µg/g	0,5 µg/mL
Sterigmatocystin	1 mg/mL	50 µL	200 µg/g	5 µg/mL
Benzylbutylphthalat	100 µg/mL	50 µL	20 µg/g	0,5 µg/mL

5 Projektbearbeiter und Autoren des Abschlussberichts

Projektleiter: Dr. Thorsten Teutenberg
(Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., IUTA)

Dr. Volker Plegge
(Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., IUTA)

Dr. Christoph Portner
(Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., IUTA)

Dipl.-Leb. Chem. Katja Oeste
(Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., IUTA)

Dipl.-Ing. Paul Ermisch
(Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., IUTA)

Projektleiter: PD Dr. Thomas Letzel
(Technische Universität München, TUM)

Dr. Johanna Graßmann
(Technische Universität München, TUM)

Dipl.-Leb. Chem. Romy Scheerle
(Technische Universität München, TUM)