



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Ermittlung der Konzentration von Folsäuremetaboliten
in biologischen Proben mittels LC-MS/MS“

Verfasserin
Beate Teuschler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Jürgen König, Univ.-Ass. Dr. Elisabeth Rudolph-König und Univ.-Prof. Dr. Gottfried Reznicek für die stets gute Betreuung und Ermöglichung dieser interessanten Diplomarbeit, die in Kooperation mit dem Institut für Ernährungswissenschaften - Emerging Focus Nutrigenomics - und dem Institut für Pharmakognosie, durchgeführt wurde, bedanken.

Auch den Mitarbeitern des Emerging Focus Nutrigenomics, vor allem Ing. Sandra Auer-nigg-Haselmaier, möchte ich für die engagierte Unterstützung während meiner Diplomarbeit danken.

Ich möchte mich auch bei allen bedanken, die mich während meines Studiums motiviert und unterstützt haben, für mich da waren und an mich geglaubt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1. PROBLEMSTELLUNG.....	1
1.2. ZIELSETZUNG	2
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. FOLSÄURE - STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN	3
2.2. FOLATE: FUNKTIONEN UND VORKOMMEN	4
2.3. FOLATE: ABSORPTION UND METABOLISMUS	6
2.4. FOLATE: BIOVERFÜGBARKEIT	7
2.5. FOLATE: BEDARF UND MANGEL.....	8
2.6. FOLSÄURE: NAHRUNGSMITTELANREICHERUNG UND SUPPLEMENTIERUNG	10
2.7. FOLATE: STABILITÄT	12
2.8. FOLSÄUREANALYTIK	13
2.8.1. Serum und Plasma.....	14
2.8.2. Erythrozyten	15
2.9. HPLC.....	17
2.9.1. Geeignete Laufmittel und Säule	19
2.9.2. Gradientenelution.....	20
2.10. MASSENSPEKTROMETRIE	20
2.10.1. Ionisierung	21
2.10.2. MS-triplequadrupole.....	23
2.10.3. MS-qTOF.....	24
3. MATERIALIEN UND METHODEN	25
3.1. CHEMIKALIEN.....	25
3.2. GERÄTE.....	26
3.3. SOFTWARE	27
3.4. MATERIALIEN	27
3.5. FOLAT-STANDARDSUBSTANZEN.....	28
3.6. BIOLOGISCHE MATERIALIEN	28
3.7. METHODENENTWICKLUNG - MS TRIPLEQUADRUPOLE:	29
3.7.1. Methode 1: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (neg. Modus).....	30
3.7.2. Methode 2: 10 mM Wasserstoffacetatpuffer (pos. Modus).....	32
3.7.3. Methode 3: 10 mM Wasserstoffacetatpuffer (pos. Modus) – veränderter Gradient	34
3.7.4. Methode 4: 0,1% HCOOH-Puffer (pos. Modus)	35
3.7.5. Methode 5: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus).....	37

3.7.6.	<i>Methode 6: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus) – veränderter Gradient und Säulenfluss.....</i>	38
3.7.7.	<i>Methode 7: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus) – veränderte Laufmittel.....</i>	40
3.7.8.	<i>Methode 8: Puffer: 50:50 Methanol/Wasser (v/v) (pos. und neg. Ionenmodus)</i>	44
3.7.9.	<i>Ermittlung der Stabilität der Metaboliten</i>	48
3.7.10.	<i>Methode 9: 50 mM Phosphatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus).....</i>	50
3.8.	METHODENENTWICKLUNG – MS QTOF:	52
3.8.1.	<i>Vergleich von 100mM Ammoniumacetat und 0,1% HCOOH als Laufmittel</i>	52
3.8.2.	<i>Vergleich der Intensitäten der Metaboliten im positiven und negativen Ionenmodus (100 mM Ammoniumacetatpuffer)</i>	53
3.8.3.	<i>Methode 10: Zusatz von Dimethylhexylamin (DMHA) zur mobilen Phase – (100 mM Ammoniumacetatpuffer, pos. und neg. Modus)</i>	54
3.8.4.	<i>Vergleich der Intensitäten der Metaboliten in unterschiedlichen Pufferlösungen (positiver Ionenmodus).....</i>	55
3.9.	BLUTAUFBEREITUNGSMETHODEN:	57
3.9.1.	<i>Blutaufbereitungsmethode 1: Methanol, Ethanol, Methanol-Chloroform.....</i>	57
3.9.2.	<i>Blutaufbereitungsmethode 2: Methanol, K₂HPO₄-Puffer</i>	59
3.9.3.	<i>Blutaufbereitungsmethode 3: K₂HPO₄, Erhöhung des Überstandsvolumens</i>	62
3.9.4.	<i>Blutaufbereitungsmethode 4: Dekonjugation der 5-MTHF-Polyglutamate durch Aktivierung der Pteroylpolyglutamathydrolase.....</i>	62
4.	ERGEBNISSE	65
5.	DISKUSSION UND SCHLUSSBETRACHTUNG.....	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	108
7.	SUMMARY	109
8.	LITERATURVERZEICHNIS	110
	LEBENS LAUF	118

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau des Folsäuremoleküls.....	3
Abbildung 2: Reduktion von Folat zu Tetrahydrofolat (katalysiert durch DHFR).....	4
Abbildung 3: Folat-abhängiger Stoffwechsel	5
Abbildung 4: Intestinale Folatabsorption	6
Abbildung 5: Transport und Metabolismus von L-5-Methyl-THF.....	7
Abbildung 6: Empfohlene Folatzufuhr	9
Abbildung 7: Chromatogramm	17
Abbildung 8: HPLC-Apparatur mit zwei Laufmitteln für Gradientenelution	18
Abbildung 9: Schema der Elektro-Spray-Ionisierung (ESI).....	22
Abbildung 10:ESI-Triplequad-Massenspektrometer.....	23
Abbildung 11: Quadrupole-TOF Mass Spectrometer (MS/MS).....	24
Abbildung 12: Vergleich von THF und 5-MTHF in unterschiedlichen Puffern und Ionenmodi	33
Abbildung 13: Peak von 5-MTHF (bestehend aus den zwei intensivsten Ionenübergängen)	39
Abbildung 14: PteGlu2 (20 min Methode)	42
Abbildung 15: PteGlu2 (30 min Methode)	43
Abbildung 16: Erste Messung von PteGlu2.....	43
Abbildung 17: Zweite Messung von PteGlu2.....	44
Abbildung 18: Intensität der Metaboliten bei Lagerung im Autosampler.....	48
Abbildung 19: Intensität der Metaboliten bei Lagerung im Tiefkühlschrank	49
Abbildung 20: Vergleich von Methode 6 und 7.....	52
Abbildung 21: Auswirkung der unterschiedlichen Ionenmodi auf die Intensität der Metaboliten	53
Abbildung 22: Vergleich von Ammoniumacetatpuffer und Phosphatpuffer (K_2HPO_4)(pos. Modus).....	55
Abbildung 23: Ergebnis der Aufbereitung der Erythrozyten.....	61
Abbildung 24: Standardgeraden 5-MTHF	69
Abbildung 25: 5-MTHF (1:100)	71
Abbildung 26: Standardgeraden THF.....	74
Abbildung 27: THF (1:40).....	75
Abbildung 28: Standardgeraden DHF	77
Abbildung 29: DHF (1:80).....	78
Abbildung 30: Standardgeraden p-ABA.....	80
Abbildung 31: p-ABA (1:100).....	82
Abbildung 32: Standardgeraden PteGlu2	85
Abbildung 33: PteGlu2 (1:100).....	86
Abbildung 34: Standardgeraden 5-MTHF (HPLC-qTOF)	90
Abbildung 35: 5-MTHF (1:40; HPLC-qTOF)	90
Abbildung 36: Standardgeraden THF (HPLC-qTOF).....	93
Abbildung 37: THF (1:20; HPLC-qTOF).....	93
Abbildung 38: Standardgeraden DHF (HPLC-qTOF)	96
Abbildung 39: DHF (1:20; HPLC-qTOF)	96
Abbildung 40: Standardgeraden p-ABA (HPLC-qTOF).....	99
Abbildung 41: p-ABA Verdünnungsreihe (HPLC-qTOF)	99
Abbildung 42: Standardgeraden PteGlu2 (HPLC-qTOF)	102
Abbildung 43: PteGlu2 (1:10; HPLC-qTOF)	102

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ausgewählte Lösungsmittel nach steigender Polarität geordnet	19
Tabelle 2: 100 mM Ammoniumacetatpuffer	30
Tabelle 3: Übergänge 1 (Methode 1 – negativer Modus).....	30
Tabelle 4: Übergänge 2 (Methode 1 – negativer Modus).....	31
Tabelle 5: 10mM Wasserstoffacetatpuffer	32
Tabelle 6: Übergänge 3 (Methode 2 – positiver Modus).....	34
Tabelle 7: Gradientenelution (Methode 3 - positiver Modus)	34
Tabelle 8: 0,1% HCOOH-Puffer.....	35
Tabelle 9: Gradientenelution (Methode 4 - positiver Modus)	36
Tabelle 10: Gradientenelution (Methode 4 modifiziert - positiver Modus)	36
Tabelle 11: 100 mM Ammoniumacetatpuffer	37
Tabelle 12: Gradientenelution (Methode 6 - negativer Modus)	38
Tabelle 13: Gradientenelution (Methode 7 – positiver und negativer Modus).....	40
Tabelle 14: Gradientenelution (Methode 7 modifiziert - positiver Modus)	41
Tabelle 15: Gradientenelution (Methode 7 modifiziert - positiver Modus)	42
Tabelle 16: Multi-Step-Gradienten	45
Tabelle 17: Vergleich von Methode 7 und 8	46
Tabelle 18: 100 mM Ammoniumacetatpuffer	47
Tabelle 19: Übersicht der Intensitäten der Metaboliten bei Lagerung im Autosampler	48
Tabelle 20: Übersicht der Intensitäten der Metaboliten bei Lagerung im Tiefkühlschrank.....	49
Tabelle 21: Multi-Step-Gradienten (Verdünnungsreihe)	51
Tabelle 22: Multi-Step-Gradienten für Messungen mit HPLC-qTOF	53
Tabelle 23: 50 mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffer	56
Tabelle 24: Auszug aus dem Pipettierschema [modifiziert nach ZHANG et. al. 2009]	57
Tabelle 25: Aufarbeitungsschema anhand zwei verschiedener Methoden.....	58
Tabelle 26: Aufarbeitungsschema anhand zwei neuer Methoden.....	60
Tabelle 27: Aufbereitungsschema für Methode nach PFEIFFER und GREGORY 1996.....	63
Tabelle 28: Aufbereitungsschema mit Zusatz von Plasma (nach GREGORY und PFEIFFER 1996).....	63
Tabelle 29: Gradienten zur Messung der Verdünnungsreihe (HPLC-triplequadrupole)	65
Tabelle 30: Gradient zur Messung der Verdünnungsreihe (HPLC-qTOF)	66
Tabelle 31: Pipettierschema für Verdünnungsreihen (HPLC-triplequadrupole)	67
Tabelle 32: Auswertung 5-MTHF 1.....	68
Tabelle 33: Auswertung 5-MTHF 2.....	69
Tabelle 34: Auswertung 5-MTHF (1:80 bis 1:100)	70
Tabelle 35: Auswertung THF 1	72
Tabelle 36: Auswertung THF 2	73
Tabelle 37: Auswertung DHF 1	75
Tabelle 38: Auswertung DHF 2.....	76
Tabelle 39: Auswertung DHF (1:80).....	78
Tabelle 40: Auswertung p-ABA 1	79
Tabelle 41: Auswertung p-ABA 2	80
Tabelle 42: p-ABA (1:80 und 1:100)	81
Tabelle 43: Auswertung PteGlu2 1	83
Tabelle 44: Auswertung PteGlu2 2	84

Tabelle 45: PteGlu2 1:100	85
Tabelle 46: Pipettierschema für Verdünnungsreihen (HPLC-qTOF)	87
Tabelle 47: Auswertung 5-MTHF 1 (HPLC-qTOF)	88
Tabelle 48: Auswertung 5-MTHF 2 (HPLC-qTOF)	89
Tabelle 49: Auswertung THF 1 (HPLC-qTOF).....	91
Tabelle 50: Auswertung THF 2 (HPLC-qTOF).....	92
Tabelle 51: Auswertung DHF 1 (HPLC-qTOF)	94
Tabelle 52: Auswertung DHF 2 (HPLC-qTOF)	95
Tabelle 53: Auswertung p-ABA 1 (HPLC-qTOF).....	97
Tabelle 54: Auswertung p-ABA 2 (HPLC-qTOF).....	98
Tabelle 55: Auswertung PteGlu2 1(HPLC-qTOF)	100
Tabelle 56: Auswertung PteGlu2 2 (HPLC-qTOF)	101
Tabelle 57: LOD/LOQ: HPLC-triplequadrupole	106
Tabelle 58: LOD/LOQ - HPLC-qTOF	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
5-MTHF	5-Methyl-Tetrahydrofolat
ACN	Acetonitril
API	atmosphere pressure ionisation (Atmosphärendruck-Ionisierung)
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
C ₁₈ -Säule	Chromatographiesäule, bestehend aus 18 C-Atomen, die an das Trägermaterial gebunden sind
CH ₃ COO ⁻ NH ₄ ⁺	Ammoniumacetat
CO ₂	Kohlendioxid
cps	counts per second (Impulse pro Sekunde)
DHF	Dihydrofolat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMHA	Dimethylhexylamin
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (Gerinnungshemmer)
EIC	extracted ion chromatogram (extrahiertes Ionenchromatogramm)
ESI	electrospray ionisation (Elektrospray-Ionisierung)
FA	folic acid (Folsäure)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAc	Wasserstoffacetat/Essigsäure
HCOOH (HfO)	Ameisensäure (Formic acid)
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography (Hydrophile Interaktionschromatographie)
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPP	Isopentenylpyrophosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)

LiOH	Lithiumhydroxid
LM	Laufmittel
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionisation
MCE	2-Mercaptoethanol
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol (Stoffmengeneinheit)
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
MRM	multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTHFR	5,10-Methylen tetrahydrofolat-Reduktase
MW	molecularweight (Molekulargewicht)
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ng	Nanogramm
p-ABA	p-Aminobenzoyl-L-glutamic acid (para-Aminobenzoesäure)
PteGlu2	Pteroyldi- γ -L-glutamic acid (Pteroyldi- γ -L-Glutaminsäure)
PteGlu3	Pteroyltri- γ -L-glutamic acid (Pteroyltri- γ -L-Glutaminsäure)
RCF	reduced folate carrier (Folattransporter 1)
RP	reversed-phase (Umkehrphase)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SIM	selected ion monitoring (ausgewählte Ionen-Detektion)
THF	Tetrahydrofolat
TIC	total ion current (Totalionenstrom)
TOF-MS	time of flight (Flugzeitmassenspektrometer)
v/v	Volumen/Volumen

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1. Problemstellung

Folate sind eine Gruppe von wasserlöslichen Vitaminen (B9). Der Begriff „Folate“ wird als allgemeine Bezeichnung für Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure) und Substanzen, mit vergleichbarer biologischer Aktivität, verwendet. Eine adäquate Folataufnahme ist besonders wichtig, um das Risiko für Neuralrohrdefekte, Herz-Kreislaufkrankungen, einige Krebserkrankungen sowie Bluthochdruck bei Frauen zu senken [DE BROUWER et al., 2008].

Eine höhere Aufnahme von Folaten über die Nahrung und/oder Folsäuresupplementierung kann den Folatstatus in den Erythrozyten erhöhen und somit das Risiko für Neuralrohrdefekte minimieren [GIBSON, 2005]. Dabei ist es besonders wichtig, dass Frauen bereits einige Wochen vor der Konzeption, mit der Supplementierung von Folsäure beginnen, da sich das Neuralrohr des Embryos bereits innerhalb der ersten vier Wochen anlegt. In Österreich sind es jährlich in etwa 70 bis 80 Säuglinge, die mit dieser Fehlbildung des ZNS geboren werden [ZWIAUER K, 2005]. Dass eine ausreichende Versorgung der Schwangeren, während der Phase des Neuralrohrschlusses, mit Folaten bzw. Folsäure wesentlich zur Reduktion von Neuralrohrdefekten und anderen Fehlbildungen beiträgt, wird seit etwa drei Jahrzehnten stetig belegt [CZEIZEL, 1995; CZEIZEL und DUDAS, 1992; RIEDER, 1994; SMITHELLS et al., 1981].

In den USA wird seit Mitte der 90-iger Jahre Mehl mit Folsäure angereichert, um die Entstehung von Neuralrohrdefekten zu vermindern. Des Weiteren können Nahrungsfolate und Folsäure den Plasmahomocysteinspiegel senken, der in engem Zusammenhang mit Neuralrohrdefekten und Herz-Kreislaufkrankungen steht. Ein erhöhter Homocysteinspiegel stellt einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar [BROUWER et al.; 2001]. Besonders bei Müttern, die Kinder mit Neuralrohrdefekten zur Welt bringen, sind wesentlich häufiger Genpolymorphismen in der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) zu beobachten, welche mit einem gesteigerten Homocysteinspiegel einhergehen [VAN DER PUT et al., 1995].

Für die Bewertung des Folatstatus werden für gewöhnlich die Folatkonzentrationen im Serum (Normalbereich: 6-20 ng/ml) oder Plasma (Normalbereich: 315 ng/ml) ermittelt. Erythrozytenfolatkonzentrationen (Normalbereich: 150-700 ng/ml) korrelieren jedoch signifikant mit dem Folatspiegel in der Leber, welcher den zellulären Folatstatus widerspiegelt [OWENS et al, 2005; CLIFFORD et al, 2004]. Der Erythrozytenfolatstatus gibt Auskunft über eine längerfristige Folataufnahme (etwa drei Monate), wohingegen Serum und Plasma die aktuelle Nahrungsaufnahme reflektieren [OWENS et al, 2007a].

Studien über die Bestimmung der Folatkonzentrationen in den roten Blutkörperchen sind wesentlich seltener anzufinden, als über die Plasma- bzw. Serumfolatanalyse, da die Aufbereitung der Erythrozytenfolate viel komplexer ist. Nichts desto weniger ist die Tatsache, dass die Erythrozyten den Hauptort der Folatspiegel repräsentieren, schon seit Jahrzehnten bekannt. Bereits in der von IWAN et al. 1963 und in der von MORTENSEN 1976 veröffentlichten Studie, wurden die Folatkonzentrationen in den roten Blutkörperchen bestimmt.

1.2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, eine schnelle, aussagekräftige und sensitive Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie Methode (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS), für die Bestimmung der empfindlichen Folate in wässrigen Standardlösungen sowie in Erythrozyten, zu entwickeln. Die Erarbeitung einer geeigneten Methode wird vorerst in wässrigen Standardlösungen durchgeführt.

Gemessen wird an zwei unterschiedlichen MS-Typen – time of flight (TOF) und tandem/triplequadrupole. Um die einzelnen Methoden miteinander vergleichen zu können, werden zusätzlich die gerätespezifischen Nachweisgrenzen bestimmt. Des Weiteren soll eine annehmbare Methode zur Aufarbeitung der Erythrozyten entwickelt werden, um diese nach Etablierung einer geeigneten Methode, messen zu können.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Folsäure - Struktur und Eigenschaften

Folsäure zählt zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine, genauer genommen zur Gruppe der B-Vitamine. Sie ist die reine synthetische Form des Vitamins B9, die in der Natur nicht vorkommt, sondern ausschließlich in Nahrungsergänzungsmitteln, Medikamenten oder angereicherten Lebensmitteln [PIETRZIK et al., 2010]. Folsäure ist sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff, Licht, Hitze, Säuren und Basen. Pteroylmonoglutamat ist die korrekte chemische Bezeichnung für Folsäure, die sich aus einem Pteridinring, einem p-Aminobenzoatesäurering und einem Glutamatrest zusammensetzt. Der Begriff Folsäure ist dennoch sehr gebräuchlich [ARCOT und SHRESHTA, 2005].

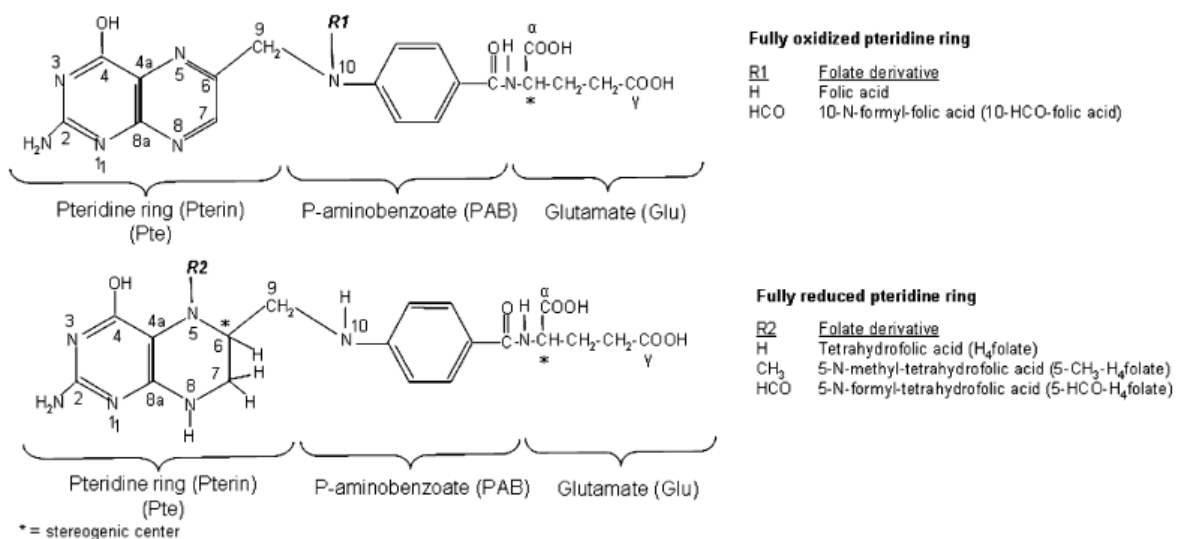


Abbildung 1: Aufbau des Folsäuremoleküls

[PATRING und JASTREBOVA, 2007]

Folat, ist die Bezeichnung für die unterschiedlichen Verbindungen der Pteroylmonoglutaminsäure, mit ähnlicher biologischer Aktivität. DHF und THF sind die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe. Tetrahydrofolat ($H_4PteGlu_n$) entsteht über eine NADPH-abhängige Reaktion aus der Folsäure, über Dihydrofolat ($H_2PteGlu_n$) [BROUWER et al.; 2001].

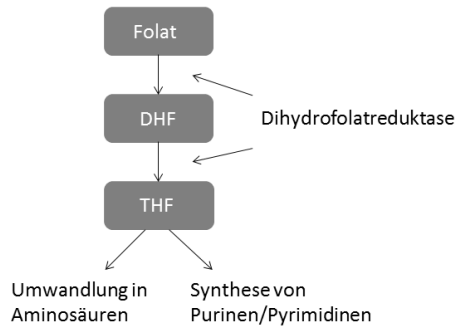


Abbildung 2: Reduktion von Folat zu Tetrahydrofolat (katalysiert durch DHFR)

[modifiziert nach WISELL K et al., 2008]

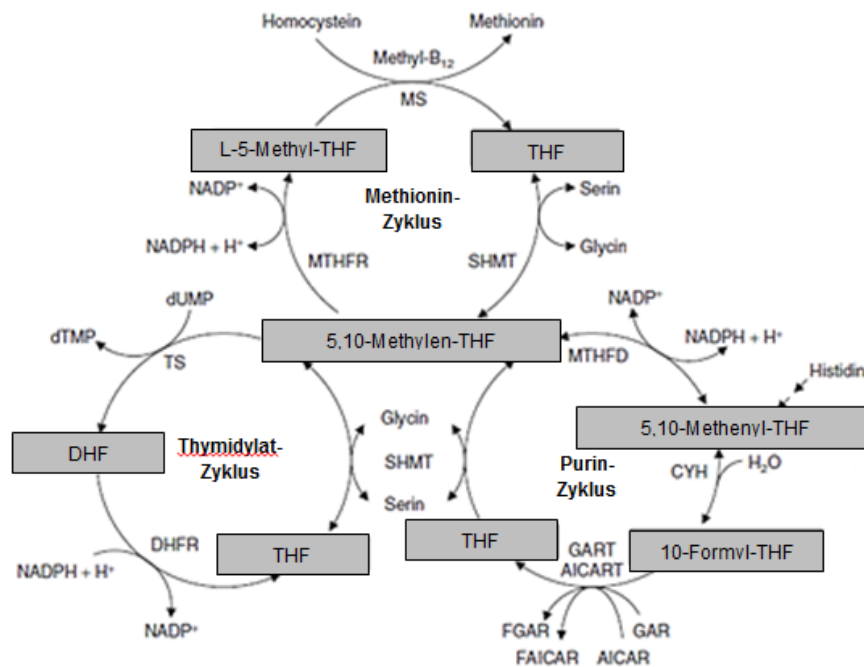
In pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln kommen fast ausschließlich Pteroylpolyglutamate vor. Pteroylmonoglutamate und Pteroylpolyglutamate unterscheiden sich durch die Anzahl an Glutamatresten (2 - 9). THF (5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure) ist die aktive Form der Pteroylmonoglutamate [GIBSON, 2005].

2.2. Folate: Funktionen und Vorkommen

THF ($H_4PteGlu_n$), die „aktive Folsäure“ hat eine wichtige Bedeutung im Intermediärstoffwechsel, als Überträger von C_1 -Körpern. Die wichtigste Quelle für C_1 -Körper ist Serin, wobei auch Histidin und Glycin als Lieferanten der C_1 -Bausteine dienen [PIETRZIK et al., 2010].

Durch Reaktionen mit der Aminosäure Serin wird ein C_1 -Körper auf THF übertragen, Methyl-THF entsteht, das in weiterer Folge zu Methyl-THF reduziert wird. Durch

Übertragung der CH₃-Gruppe von Methyl-THF auf Homocystein, wird Methionin synthetisiert. Als Zwischenträger der Methylgruppe dient Cobalamin (Vitamin B₁₂). Als Überträger von Methyl- (CH₃-), Methylen- (=CH₂-) und Formyl-Gruppen (-CHO-) ist THF an einer Reihe von Stoffwechselfvorgängen wie z.B. der Cholinsynthese, der DNA-Synthese und der Purinsynthese beteiligt [QUINLIVAN et al., 2006; PIETRZIK et al., 2010].



AICAR = Aminoamidazol-Carboxamid-Ribonucleotid; **AICART** = AICAR Formyltransferase; **B12** = Vitamin B₁₂ (Cobalamin); **CYH** = Methenyl-THF-Cyclohydrolase; **DHF** = Dihydrofolat; **DHFR** = DHF Reduktase; **dTMP** = Desoxythymidinmonophosphatase; **dUMP** = Desoxyuridinmonophosphatase; **MTHFD** = Methylen-THF-Dehydrogenase; **MTHFR** = 5,10-Methylen-THF-Reduktase; **NADP** = Nicotinamidadeninucleotidphosphat; **NADPH** = reduziertes NADP; **SHMT** = Serin-Hydroxymethyltransferase; **THF** = Tetrahydrofolat; **TS** = Thymidylatsynthase.

Abbildung 3: Folat-abhängiger Stoffwechsel

[modifiziert nach PIETRZIK et al., 2010]

Die Hauptquellen für Folate sind Hefe, grünes Blattgemüse (wie Spinat, Kohlrarten), Tomaten, Gurken, Vollkornbrot und -backwaren, Eidotter, Leber, Weizenkeime, Sojabohnen [DE BROUWER et al, 2008; D_A_CH, 2008].

2.3. Folate: Absorption und Metabolismus

Nahrungsfolate liegen zu großen Teilen als Pteroylpolyglutamate vor und müssen, bevor sie im Jejunum absorbiert werden, durch das Enzym Pteroylpolyglutamathydrolase zu Monoglutamaten hydrolysiert werden, da die Folate vorwiegend in dieser Form absorbiert werden. Folsäure kann unverändert aufgenommen werden, da es sich bereits um ein Pteroylmonoglutamat handelt. Da die Folsäure-Monoglutamate fast uneingeschränkt absorbiert werden, zeigen sie eine höhere Bioverfügbarkeit als Polyglutamate. Während ihrer Passage durch die intestinale Mucosa werden die meisten Nahrungsfolate und Folsäure in L-5-Methyl-THF metabolisiert. Folsäure wird, wie bereits erwähnt, durch die Dihydrofolatreduktase zuerst zu DHF und anschließend zu THF reduziert. Über die Serin-Hydroxymethyltransferase und die 5,10-Methylenetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) wird THF schließlich zu L-5-Methyl-THF, aus der nach Aufnahme in die Zelle Folylpolyglutamate gebildet werden. Im Duodenum und proximalen Jejunum erfolgt über einen Carrier-vermittelten Prozess (z.B. über den reduced folate carrier-RFC) die Absorption der Monoglutamate (pH-Optimum zwischen 5 und 6). Bei höheren pH-Werten und höheren Folsäuregaben (pharmakologische Dosen) spielt auch die passive Diffusion als Transportmechanismus eine wichtige Rolle [PIETRZIK et al., 2010; GIBSON, 2005].

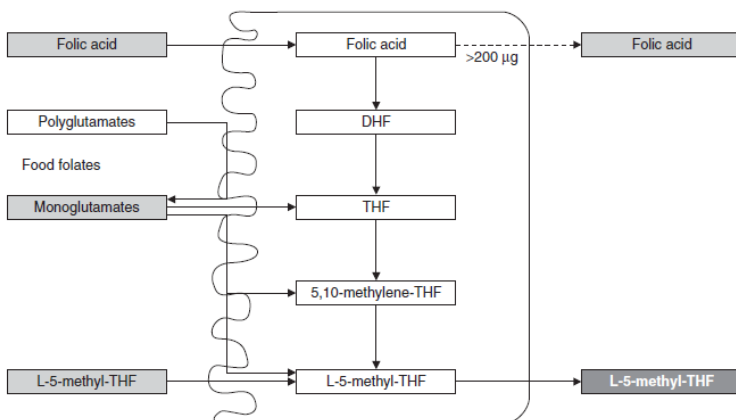


Abbildung 4: Intestinale Folatabsorption (von der Bürstensaummembran durch die Dünndarmmucosa über die Pfortader in den peripheren Kreislauf)

[PIETRZIK et al.; 2010]

Aus dem Plasma werden hauptsächlich reduzierte Folat-Monoglutamate (L-5-Methyl-THF) in die Zelle aufgenommen, die in weiterer Folge mit Glutamatresten verbunden und zu Polyglutamaten verknüpft werden [GIBSON, 2005]. So gut wie alle Gewebsfolate sind Polyglutamate. Der Stoffwechsel von Monoglutamaten zu Polyglutamaten ist notwendig, da die Polyglutamate viel effektivere Substrate für folatabhängige Enzyme sind und die zelluläre Retention verbessert wird [PIETRZIK et al., 2010].

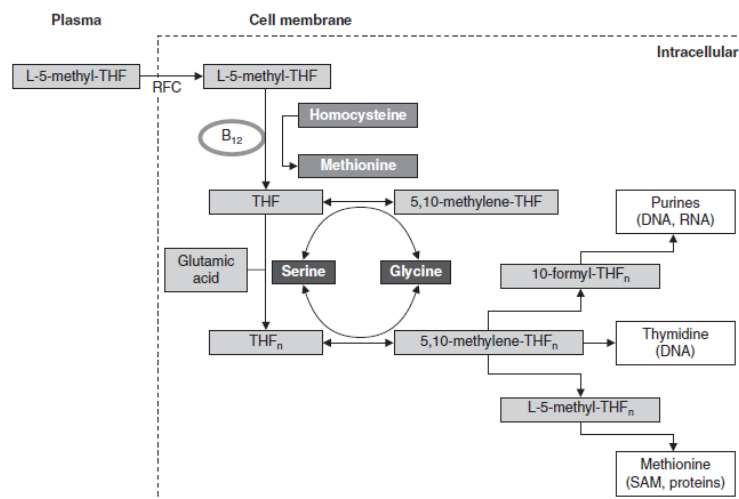


Abbildung 5: Transport und Metabolismus von L-5-Methyl-THF

[PIETRZIK et al., 2010]

2.4. Folate: Bioverfügbarkeit

Wie bereits unter Punkt 2.3. erwähnt, werden Folat-Monoglutamate fast uneingeschränkt absorbiert, wohingegen Polyglutamate, die durch die enzymatische Spaltung in Monoglutamate, eine Absorptionsrate von lediglich 50 % durchschnittlich aufweisen. Die Verwertbarkeit von Folaten aus gemischter Kost beträgt ca. 50–70 %, wobei die Folat-Bioverfügbarkeit aus tierischen Produkten höher ist, als die von pflanzlichen Lebensmitteln. Die Monosaccharide Glucose und Galactose können die Absorption zusätzlich fördern. Synthetische Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure) in Form von Supplementen kann somit vom Körper fast unlimitiert absorbiert werden. Der Begriff „Folatäquivalent“ wurde daraus folgend eingeführt, um auf die Bioverfügbarkeiten der

unterschiedlichen Folatverbindungen aus Lebensmitteln Rücksicht zu nehmen [PIETRZIK et al., 2010; BROUWER et al., 2001].

1 µg Folatäquivalent

= 0,5 µg synthetisches Folat (Pteroylmonoglutamat)

= 1 µg Nahrungsfolat (Pteroylpolyglutamat)

[D_A_CH, 2008]

Folsäure, sowie die meisten Folate, sind empfindlich gegenüber Sauerstoff, Licht, Hitze, Säuren und Basen. Vor allem THF und 5-Methyl-THF sind hier zu erwähnen, da sie mitunter zu den instabilsten Folatverbindungen zählen. Bei der Lagerung und der Zubereitung von Lebensmitteln kann es daher zu Veränderungen der Folatstruktur kommen, was zu einer verminderten Bioverfügbarkeit der Folate im Körper führt [ARCOT und SHRESHTA, 2005].

Einen weiteren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit übt auch die Einnahme bestimmter Medikamente aus. Durch längerfristige Einnahme von Antiepileptika, Antimalariamittel, oraler Kontrazeptiva, aber auch durch Alkoholabusus wird die Folatkonjugase (=Pteroylpolyglutamathydrolase) gehemmt und somit die Verfügbarkeit der Folate beeinflusst. Des Weiteren kann auch ein Vitamin-B₁₂-Mangel für eine verminderte Folat-Bioverfügbarkeit verantwortlich sein, da aus Methyl-THF kein THF gebildet werden kann, wodurch auch kein Methionin aus Homocystein entstehen kann [GIBSON, 2005; PIETRZIK et al, 2010].

2.5. Folate: Bedarf und Mangel

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Zufuhr von 50-100 µg freier Folsäure bzw. 100-200 µg Nahrungsfolat den Bedarf von Erwachsenen decken und Mangelerscheinungen entgegengewirkt werden kann. Jedoch kann erst ab einer Zufuhr von 400 µg Nahrungsfolat, die Homocysteinkonzentration im Blut, die ein Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen darstellt, auf minimale Werte gesenkt werden [BROUWER et al., 2001; ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Die Empfehlungen für die Aufnahme von Nahrungsfolat liegen für Kinder und Jugendliche ab 10 Jahren, sowie für Erwachsene bei 400 µg pro Tag. Für Frauen mit Kinderwunsch wird eine zusätzliche Supplementierung von 400 µg synthetischer Folsäure pro Tag empfohlen. Schwangeren und Stillenden wird zu einer Gesamtfolatzufuhr von täglich 600 µg geraten [D_A_CH, 2008].

ALTER	FOLSÄURE (Nahrungsfolat) µg-Äquivalent ¹ /Tag
Säuglinge	
0 bis unter 4 Monate ²	60
4 bis unter 12 Monate	80
Kinder	
1 bis unter 4 Jahre	200
4 bis unter 10 Jahre	300
10 bis unter 15 Jahre	400
Jugendliche und Erwachsene	
15 bis unter 51 Jahre ³	400
51 bis unter 65 Jahre	400
65 Jahre und älter	400
Schwangere ³	600
Stillende	600
¹ berechnet nach der Summe folatwirksamer Verbindungen in der üblichen Nahrung = Folat-Äquivalente (gemäß neuer Definition) ² hierbei handelt es sich um einen Schätzwert ³ Frauen, die schwanger werden wollen oder können, sollten zusätzlich 400 µg synthetische Folsäure (=Pteroylmonoglutaminsäure/PGA) in Form von Supplementen aufnehmen, um Neuralrohrdefekten vorzubeugen. Diese erhöhte Folsäurezufuhr sollte spätestens 4 Wochen vor Beginn der Schwangerschaft erfolgen und während des ersten Drittels der Schwangerschaft beibehalten werden.	

Abbildung 6: Empfohlene Folatzufuhr

[modifiziert nach D_A_CH, 2008]

Folate spielen besonders bei der Zellteilung eine große Rolle. Ein klinischer Folatmangel macht sich zuerst in der Hämatopoese und danach in epithelialen Veränderungen z.B. in Blut- und Schleimhautzellen bemerkbar. Die gestörte Blutbildung führt in weite-

rer Folge zur Ausbildung einer makrozytären, hyperchromen Anämie. Die frühesten Anzeichen sind Kernanomalien bei neutrophilen Granulozyten d.h. die im Knochenmark zirkulierenden Blutkörperchen sind megaloblastisch, was zum Auftreten von makrozytären (abnorm großen) roten Blutkörperchen führen kann. Die makrozytäre, hyperchrome Anämie kann auch durch einen Vitamin-B₁₂-Mangel hervorgerufen werden, weshalb empfohlen wird, nicht mehr als 1 mg Folat pro Tag aufzunehmen, um nicht einen möglichen Vitamin-B₁₂ Mangel zu verschleiern. Die zuvor erwähnten epithelialen Veränderungen können zu Malabsorption, Zungenentzündung (Glossitis) und Entzündung der Lippen Schleimhaut (Cheilosis) führen. Besonders ältere Menschen können von einem ernährungsbedingten Folatmangel betroffen sein, der sich in Depressionen, Polyneuropathie und anderen neuro-psychiatrischen Störungen äußern kann.

Wie bereits unter 2.4. Folate – Bioverfügbarkeit erwähnt, können die längerfristige Einnahme von Medikamenten sowie Alkoholismus einen negativen Einfluss auf den Folatstatus ausüben. Des Weiteren können ein erhöhter Bedarf in der Schwangerschaft und beim Stillen, sowie eine unzureichende Folatzufuhr oder Malabsorption (z.B. bei Zöliakie), die Folgen für einen Folatmangel sein [GIBSON, 2005].

2.6. Folsäure: Nahrungsmittelanreicherung und Supplementierung

In vielen industrialisierten Ländern sind die Hauptnahrungsquellen für Folate Frühstückscerealien, wenn diese mit Folaten angereichert wurden, und Gemüse [GIBSON, 2005]. Wie zu Beginn erwähnt, wurde in den USA und Kanada 1998 die Anreicherung von Mehl eingeführt. Zusätzlich zum Mehl werden auch Frühstückscerealien mit Folsäure angereichert [ZWIAUER, 2005].

Durch diese Anreicherung konnte in den USA eine gesteigerte Zufuhr von 200µg Folsäure/Tag, sowie ein um 23 % verringertes Auftreten von Neuralrohrdefekten, beobachtet werden, wohingegen sich in Kanada ein fast doppelt so hoher Rückgang bei offenen Neuralrohrdefekten zeigte [HONEIN et al., 2001; MATHEWS et al., 2002; PERSAD et al., 2002].

Die Wichtigkeit einer ausreichenden Versorgung mit Folaten zur Vorbeugung von Neuralrohrdefekten scheint in der Bevölkerung durchaus bekannt zu sein. Die von der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Ernährung empfohlene tägliche Zufuhr von 400 µg Folat für Erwachsene wird aber oft nicht erreicht. Daher wird eine präkonzeptionelle Supplementierung von täglich 400 µg Folsäure, für Frauen mit Kinderwunsch, angeraten, [KOLETZKO und KRIES, 1995; ZWIAUER, 2005; D_A_CH, 2008] wobei in Österreich und Deutschland die ergänzende präkonzeptionelle Folsäureaufnahme nur sehr gering umgesetzt und akzeptiert wird, was vermutlich an mangelnder Aufklärung betreffend der Notwendigkeit einer Folsäuresupplementierung vor der Schwangerschaft, bzw. vor dem Neuralrohrverschluss, liegt [ZWIAUER, 2005].

In Kanada konnte jedoch zusätzlich gezeigt werden, dass alleine durch die Empfehlungen einer perikonzeptionellen Folsäuresupplementierung, kein signifikanter Rückgang von Neuralrohrdefekten erreicht wurde. Erst durch Einführung der Nahrungsmittelanreicherung kam es zu einem signifikanten Einfluss auf die Inzidenz [PERSAD et al., 2002].

Ob es auch in der EU zu einer verpflichtenden Anreicherung von Mehl bzw. Grundnahrungsmitteln kommen wird, ist noch nicht geklärt [MRC Vitamin Study Research Group, 1991; EFSA meeting summary report, 2009].

2.7. Folate: Stabilität

Folsäure, sowie die meisten Folate, sind empfindlich gegenüber Sauerstoff, Licht, Hitze, Säuren und Basen. Bei allen Untersuchungen von Folaten werden dem Extraktionspuffer Antioxidantien, d.h. Substanzen, welche Oxidationsvorgänge verhindern oder verzögern, hinzugefügt. Zu den am Häufigsten in der Folatanalytik verwendeten Antioxidantien zählt die Ascorbinsäure und 2-Mercaptoethanol, einer Verbindung bestehend aus einer Mercapto- und einer Hydroxygruppe [ARCOT und SHRESHTA, 2005].

Auch Dithiothreitol (DTT) wird oft in Kombination mit Ascorbinsäure als Antioxidans eingesetzt. Die Antioxidantien werden dem Extraktionspuffer nicht nur zugesetzt, um vor dem Verlust von Folaten zu schützen, der in erster Linie mit der oxidativen Spaltung an der C9-N10-Bindung verbunden ist, sondern es soll gleichzeitig der Pteridin-Ring stabilisiert werden [QUINLIVAN et al., 2006].

Ascorbinsäure bzw. deren Säurerest-Ionen, die Ascorbate werden häufig als alleinige Antioxidantien eingesetzt [HANNISDAL et al., 2008; WRIGHT et al., 2000; OWENS et al., 2005; KOK et al., 2004; NELSON et al., 2003], oft aber auch in Kombination mit 2-Mercaptoethanol [HART et al., 2002; VISHNUMOHAN et al., 2011; STOKES und WEBB, 1999; PATRING und JASTREBOVA, 2007; WANG et al., 2010; FREISLEBEN et al., 2003a; SMITH et al., 2006; FREISLEBEN et al., 2003b; PFEIFFER und GREGORY, 1996], Citronensäure [GARRAT et al., 2005] oder DTT [DE BROUWER et al., 2008; LIANG et al., 2009; NELSON et al. 2005] verwendet.

Wird Ascorbinsäure in einem sauren pH-Bereich von 4-5 eingesetzt, zeigt sich eine noch größere Stabilität der Folate, im Vergleich zu neutralem pH-Wert [GREGORY, 1989]. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass sich die Stabilität der Folate erhöht, wenn Ascorbinsäure zusammen mit 2-Mercaptoethanol eingesetzt wird [VAHTERISTO et al., 1996a].

Dem Folatverlust kann aber nicht nur durch Zusatz von Antioxidantien entgegen gewirkt werden. Durch Begasung der Gefäße (Folat-Standardsubstanzen bzw. der Pufferlösung in dem bereits Folate gelöst wurden) mit Stickstoff oder Argon, wird Sauerstoff verdrängt bzw. entfernt, wodurch die für die Oxidation wesentliche Substanz fehlt, und

somit nicht oder nur verlangsamt ablaufen kann [QUINLIVAN et al., 2006; OWENS et al., 2007; PATRING und JASTREBOVA, 2007; KOK et al., 2004; PAWLOSKY et al., 2001].

Das Verwenden von dunklen Gefäßen sowie gedämpftes Licht können zusätzlich den Folatabbau entschleunigen [QUINLIVAN et al., 2006; WANG et al., 2010; PATRING und JASTREBOVA, 2007; NELSON et al., 2004].

2.8. Folsäureanalytik

Die Analysenmethoden für Folsäure und deren metabolische Vorstufen werden in biologische, mikrobiologische, biospezifische (Radiobinding Assays), chromatographische und chemische Methoden eingeteilt [ARCOT und SHRESHTA, 2005]. Biologische Methoden, wie etwa Untersuchungen an Ratten, werden für Folatuntersuchungen grundsätzlich nicht mehr verwendet, mit Ausnahme für Erforschungen der Ernährungsaspekte des Vitamins [KEAGY, 1985].

Mikrobiologische und biospezifische Untersuchungen, sowie chromatographische Methoden zur Bestimmung von Folatkonzentrationen im Serum, Plasma und Vollblut finden vorwiegend Anwendung. Heutzutage dienen die mikrobiologischen und biospezifischen Methoden oft als Vergleichsmethode für chromatographische Methoden [FAZILI et al., 2004; PFEIFFER, 2004]. Obwohl der mikrobiologische Assay nach wie vor die anerkannteste Methode der Folatanalytik ist [PATRING und JASTREBOVA, 2007] gibt es auch Nachteile, die mit diesem Assay verbunden sind wie z.B. dass keine Folatmetaboliten unterschieden werden können, sondern ausschließlich der Gesamtfolatgehalt bestimmt werden kann. Dieses Problem kann durch den Einsatz von modernen Messmethoden z.B. LC-MS umgangen werden [ARCOT und SHRESHTA, 2005].

Auch mikrobiologische Assays gekoppelt mit HPLC werden zur Unterscheidung und Quantifizierung von THF angewendet, jedoch können damit keine Pteroylpolyglutamate bestimmt werden [BELZ und NAU, 1998].

Sowohl GC als auch HPLC zählen zu den chromatographischen Methoden, die heutzutage immer häufiger für die Folatanalytik eingesetzt werden, wobei bei der GC die Ana-

lyten vor der Messung derivatisiert werden müssen, um deren Flüchtigkeit zu erhöhen, was eine gewisse Fehlerquote mit sich bringt [LIANG et al., 2009; PFEIFFER et al., 2004].

Die HPLC kann nicht nur mit mikrobiologischen Assays, sondern auch mit Detektoren, wie etwa dem UV/VIS-Detektor [PFEIFFER und GREGORY, 1996], dem Fluoreszenzdetektor [FREISLEBEN et al., 2003b] oder dem elektrochemischen Detektor, gekoppelt werden. Die Auswahl der unterschiedlichen Detektoren ist von einigen Parametern abhängig. Besitzt beispielsweise ein Molekül aromatische Gruppen, eignet sich ein UV/VIS-Detektor zur Detektion, weist aber die Probe eine natürliche Fluoreszenz auf, ist ein Fluoreszenzdetektor besser geeignet. Welcher Detektor letztendlich verwendet wird, hängt somit von der Folatform, dem Probenvolumen, der Probenmatrix, den Kosten und auch der Sensitivität ab [GARRAT et al., 2005].

Für klinische Forschungsstudien von Folaten werden jedoch GC und HPLC sehr häufig mit einem MS-Detektor gekoppelt [GIBSON, 2005]. Durch Verbindung von HPLC mit Massenspektrometrie ergibt sich die Möglichkeit, die Folate in ihrem natürlichen Zustand zu analysieren und quantifizieren, während zu gleich die Schwierigkeiten, die durch Kopplung von HPLC mit Fluoreszenz-Detektor oder elektrochemischem Detektor einhergehen, umgangen werden [GARRAT et al., 2005].

2.8.1. Serum und Plasma

Das Blut setzt sich aus den Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) und einem flüssigen Bestandteil, dem Blutplasma, zusammen. Blutserum ist eine Flüssigkeit, die in Folge der Blutgerinnung aus dem Plasma entsteht. Der wesentliche Unterschied zwischen Plasma und Serum besteht vor allem darin, dass Serum kein Fibrinogen oder andere Gerinnungsfaktoren enthält [THEWS et al., 1999].

Sowohl im Plasma, als auch im Serum, sind keine Polyglutamate sondern nur Monoglutamate vorhanden, vorwiegend in Form von 5-MTHF [HANNISDAL et al., 2009; KOK et al., 2004; NELSON et al., 2004]. Die Folate sind größtenteils an Plasma- bzw. Serumproteine gebunden, daher ist es für deren Analyse notwendig, sie von den Proteinen

freizusetzen, aber nicht zu zerstören. Die Probenaufbereitung von Serum- und Plasma-proben ist wesentlich einfacher, als die von Vollblutproben. Im Prinzip umfasst die Aufbereitung eine Proteinfällung um die Folate freizusetzen und häufig eine Aufreini-gung der erhaltenen Substanzen. Die Problematik hierbei besteht jedoch darin, dass der genaue Anteil an proteingebundenen Folaten nicht bekannt ist und eine Proteinpräzipi-tation daher auch Folate mitreißen könnte. Nelson et al. 2004 haben sich die Erkenntnis, dass bei einem pH von $\leq 3,5$ die Folate nicht mehr an Proteine gebunden sind, zu Nutze gemacht. Der pH-Wert von $\leq 3,5$ wurde durch Verwendung von Ascorbinsäure und meta-Phosphorsäure erlangt.

Die Proteinpräzipitation kann unter anderem durch Methanol oder Ethanol [ZHANG et al., 2009], Perchlorsäure [KHAN et al., 1991], Aceton [KOHASHI et al., 1986], Trichloressigsäure oder, wie bereits erwähnt, durch meta-Phosphorsäure [NELSON et al., 2004] erfolgen.

In einigen Fällen wird jedoch keine Proteinfällung, sondern nur eine Festphasenextrak-tion als Aufreinigungsschritt durchgeführt [NELSON et al., 2003; PAWLOSKY et al., 2001; PFEIFFER et al., 2004].

Die Aufreinigung der Folate ist nicht auf die Solid Phase Extraction (SPE) beschränkt, sie kann auch mittels Filtration oder Affinitätschromatographie erfolgen.

2.8.2. Erythrozyten

Erythrozyten machen den Hauptanteil der zellulären Bestandteile des Blutes aus. Die Lebensdauer der Erythrozyten beträgt in etwa 110 bis 120 Tage. Danach werden sie in der Leber, Milz oder im Knochenmark phagozytiert. Durchschnittlich werden 0,8 % der gesamten roten Blutkörperchen innerhalb von 24 Stunden abgebaut und laufend durch neue ersetzt [THEWS et al., 1999].

Folate liegen in den roten Blutkörperchen vorwiegend als Polyglutamate vor, genauer genommen als 5-MTHF Polyglutamate. Daher muss vor der Folatanalytik eine Hämolyse, d.h. eine Auflösung der Erythrozyten, und eine Dekonjugation stattfinden. Die Hä-

molyse kann mittels wässriger Ascorbinsäurelösung [PFEIFFER und GREGORY, 1996; IWAI K, 1963; MORTENSEN E, 1976; WRIGHT et al, 2000; OWENS et al, 2007; GUNTER et al, 1996; OWEN und ROBERTS, 2003] oder durch Zugabe von Wasser [VAN HAANDEL, 2009; SANA et al, 2008; ZHANG et al, 2008] erfolgen. Durch zusätzliche Anwendung eines Hämolyse-Agens, wie z. B. Saponin, kann eine vollständige Hämolyse gewährleistet werden [WRIGHT et al., 2000; BAUMAN et al., 2000; OWEN und ROBERTS, 2003].

Die Funktion von Ascorbinsäure besteht nicht nur in der Hämolyse, sondern auch in der pH-Einstellung, die für die darauffolgende Einwirkung der Konjugase besonders wichtig ist. Zusätzlich bietet die Ascorbinsäure einen antioxidativen Schutz für die sehr empfindlichen Folate [WRIGHT et al., 1998].

Die Dekonjugation von 5-MTHF-Polyglutamaten zu 5-MTHF-Monoglutamaten erfolgt mittels Plasmafolat-Konjugase (γ -glu-x Carboxypeptidase). Das Hämolyolat inkubiert normalerweise mit der Konjugase für einen gewissen Zeitraum bei einer gewissen Temperatur, generell für zwei Stunden bei 37 °C [GIBSON, 2005]. Neben der Temperatur und der Inkubationszeit, spielt auch der pH-Wert einen wichtigen Einflussfaktor bei der Freisetzung der Folate [WRIGHT et al., 2000; FAZILI et al., 2005; PFEIFFER und GREGORY, 1996;].

Wie bereits unter Punkt 1.1. erwähnt, wird die Folatanalytik vorwiegend im Serum oder Plasma, und weniger im Vollblut durchgeführt, obwohl die Erythrozytenfolatkonzentration ein besserer Indikator wäre, da sie nicht den aktuellen Folatstatus, sondern den Folat-Körperspeicher widerspiegeln [GIBSON, 2005; PAWLOSKEY et al., 2001].

2.9. HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist ein Verfahren zur Auftrennung, Quantifizierung sowie Identifizierung von Substanzen. Der Unterschied zwischen Gaschromatographie und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie besteht darin, dass bei der Gaschromatographie die Substanzen flüchtig bzw. verdampfbar sein müssen, wohingegen mittels HPLC auch nicht flüchtige Stoffe aufgetrennt und analysiert werden können. Der Begriff Chromatographie bedeutet im Allgemeinen, die Interaktion von Substanzen mit einer stationären und mobilen Phase. Das Chromatogramm, in dem auf der x-Achse die Zeit gegen Analytensignale, in Form von Peaks, auf der y-Achse aufgetragen werden, ist das Endergebnis einer chromatographischen Auftrennung. Ein wichtiges qualitatives Kennzeichen der Analyten sind die unterschiedlichen Retentionszeiten, während die Peakflächen bzw. Peakhöhen dazu dienen, die Konzentration der Analyten zu ermitteln, und somit quantitative Kennzeichen darstellen [GEY, 2008].

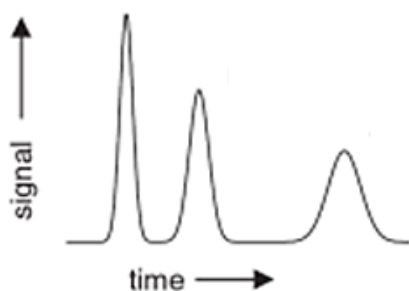


Abbildung 7: Chromatogramm

[SNYDER et al., 2010]

Bei der HPLC werden die Laufmittel bzw. die mobile Phase durch eine Pumpe zum Injektor geleitet, wodurch die Probe, die sich im Autosampler befindet, in die Säule gelangt. Durch die Verwendung einer Vorsäule wird die Hauptsäule, die zur Auftrennung der Analyten dient, geschont, da Probenverunreinigungen zurückgehalten werden können. Die Auftrennung erfolgt durch Interaktion der Analyten zwischen stationärer

und mobiler Phase. Mithilfe von Detektoren werden die analytischen Trennergebnisse in Signale bzw. Peaks umgewandelt [GEY, 2008].

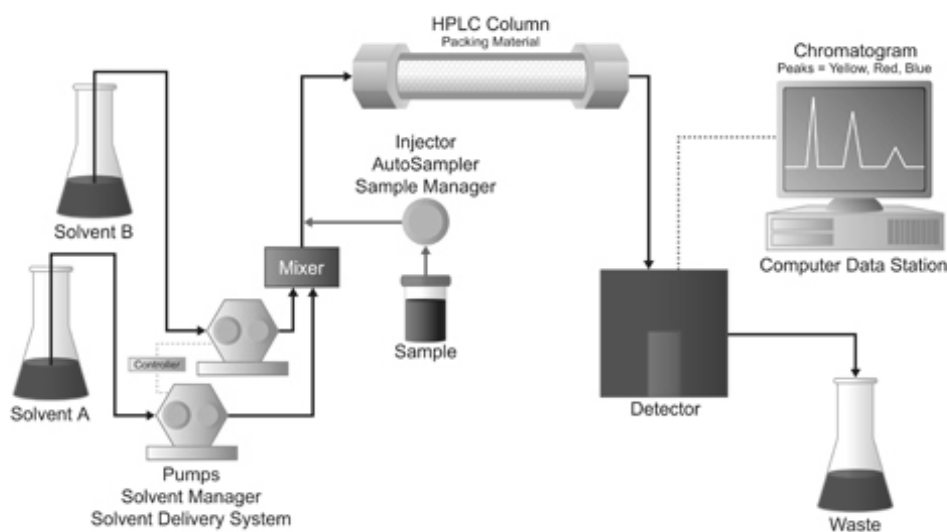


Abbildung 8: HPLC-Apparatur mit zwei Laufmitteln für Gradientenelution

[WATERS, 2012]

Wie bereits unter Punkt 2.8. erwähnt, werden heutzutage nach wie vor mikrobiologische und biospezifische Methoden zur Folatanalytik verwendet, jedoch gewinnen die HPLC-Verfahren, die sehr häufig als Umkehrphasenchromatographie (RP-Chromatographie), im Falle von HILIC-Säulen (hydrophile Interaktionschromatographie) auch als Normalphasenchromatographie (NP-Chromatographie) [YOUNG et al., 2011; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2010] angewendet werden, für die Bestimmung von Folaten immer mehr an Bedeutung. In zahlreichen Publikationen wird der bedeutende Einsatz der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in der Analyse von Folaten aufgezeigt [PFEIFFER und GREGORY, 1996; FREISLEBEN et al., 2003; VAHTERISTO et al., 1996]. Sehr häufig wird ein Massenspektrometer als Detektor für die HPLC verwendet, um Folate zu bestimmen [WANG et al., 2010; HANNISDAL et al., 2008; OWENS et al., 2005; PATRING und JASTREBOVA, 2007; GARRAT et al., 2005; KOK et al., 2004; FAZILI et al., 2005; NELSON et al., 2004].

2.9.1. Geeignete Laufmittel und Säule

Für die Auswahl der mobilen Phase sollte zunächst die Art der verwendeten Chromatographie zur Trennung der Substanzen bekannt sein. Um Substanzen aufzutrennen, bedient man sich mittlerweile größtenteils der Umkehrphasenchromatographie, bei der es sich um ein polares Laufmittel und eine unpolare stationäre Phase (z.B. C₁₈-Säulen) handelt. Bei der Normalphasenchromatographie ist es genau umgekehrt, die stationäre Phase (z.B. Kieselgel mit Silanolgruppen) ist polar und die mobile Phase (z.B. Hexan) unpolar. Im Fall der RP-HPLC passieren unpolare Stoffe die Säule langsamer als polare Substanzen, hingegen werden bei einer Normalphasenchromatographie unpolare Substanzen leichter eluiert. Der Trennmechanismus basiert auf der Wechselwirkung der Analyten mit dem Säulenmaterial. Häufig werden Methanol, Acetonitril und Wasser als Laufmittel in der Umkehrphasenchromatographie eingesetzt, da diese Lösungsmittel eine hohe Polarität aufweisen [OTTO, 2011].

SOLVENS	POLARITÄTSINDEX
Cyclohexan	0,04
n-Hexan	0,1
Iso-Propylether	2,4
Diethylether	2,8
Methylenchlorid	3,1
Chloroform	4,1
Ethanol	4,3
Dioxan	4,8
Methanol	5,1
Acetonitril	5,8
Wasser	10,2

Tabelle 1: Ausgewählte Lösungsmittel nach steigender Polarität geordnet

[modifiziert nach OTTO, 2001]

2.9.2. Gradientenelution

In der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP) wird häufig eine Gradientenelution angewendet, wobei auch eine isokratische Elution, bei der das Laufmittel bzw. die mobile Phase während des gesamten Analysevorgangs konstant bleibt, möglich ist.

Bei der Gradientenelution hingegen ändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während des Trennungsvorgangs, was eine unterschiedliche Elutionsstärke mit sich bringt. In dem der Anteil der Laufmittel mit höherer Elutionskraft gesteigert wird, nimmt auch die Elutionskraft zu. Diese Modifikation der mobilen Phase kann in Stufen, linear oder nicht linear erfolgen [MATISSEK et al., 2010].

2.10. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, welches der Bestimmung der Masse von Molekülen dient. Mit einem Massenspektrometer werden aus den Analyten gasförmige Ionen erzeugt, die durch ein elektrisches Feld geleitet und beschleunigt werden. Die sich in der Gasphase befindlichen Ionen werden nach Masse und Ladung getrennt und liefern letztendlich ein Massenspektrum, das für die genaue Ermittlung der Substanzen notwendig ist [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

LC-MS zählt heutzutage zu einem beliebten und häufig verwendeten Analyseinstrument in modernen Laboratorien. Im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Detektionsmethoden, kann LC-MS eine bessere Spezifität, höhere Sensitivität und meist niedrigere Nachweisgrenzen bieten, was sich ideal für die Folatanalyse eignet [STOKES und WEBB, 1999; ZHANG et al., 2005].

Die Verknüpfung von HPLC mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ist bereits erfolgreich bei der Quantifizierung von Pteroylmonoglutamaten aus pflanzlichen Quellen zum Einsatz gekommen [FREISLEBEN et al., 2003b]. Als zusätzlichen Nutzen der Kopplung erhält man einen genaueren Nachweis der Identität des Analyten [GARRAT et al., 2005].

Single-quadrupole Massenspektrometer [CLIFFORD et al., 2004; NELSON et al., 2004; HART et al., 2002; LIN et al., 2002], Flugzeitmassenspektrometer (TOF) [FERRER und THURMANN, 2003], Ionenfallen-Massenspektrometer [FREISLEBEN et al., 2003b; HANNISDAL et al., 2009], der Triplequadrupol-Massenspektrometer (aus der Gruppe der Tandem-Massenspektrometer) [SMITH et al., 2006; LIANG et al., 2009; GARRAT et al., 2005; FAZILI et al., 2005; CLIFFORD et al., 2004; HANNISDAL et al., 2008; NELSON et al., 2005; MÖNCH et al., 2009; VAN HAANDEL et al., 2009; KOUFOPANTELIS et al., 2009; KOK et al., 2004; GARBIS et al., 2001], sind die gebräuchlichsten MS-Detektoren, die mit einer HPLC oder GC verbunden werden.

2.10.1. Ionisierung

Positive oder negativ geladene Moleküle oder Atome werden als Ionen bezeichnet, der Hergang der Ionenbildung als Ionisierung. Mit einem Massenspektrometer können positive wie auch negative Ionen analysiert werden. Häufig erfolgt die Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI), bei der das aus der HPLC-Säule stammende Eluat durch feine Tröpfchenbildung und angelegter Hochspannung, ionisiert wird [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Die Ionisierung durch Atmosphärendruck (APCI) wird in der Folatanalytik kaum verwendet, da sehr hohe Temperaturen notwendig sind. APCI kommt daher meist für hitzestabile oder fettlösliche Analyten, deren Ionisierung mit ESI schlecht funktioniert, zum Einsatz [BALTES und KROH, 2004].

Die Analyse von Folaten kann sowohl im positiven [NELSON et al., 2005; LIANG et al., 2009; KOK et al., 2004; WANG et al., 2010] als auch im negativen [GARRATT et al., 2005; HART et al., 2002] ESI-Modus erfolgen, wobei der positive Modus häufiger angewendet wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich im positiven Modus das Molekulargewicht um eine Ladungseinheit erhöht $[M+H]^+$, und im negativen Modus um eine reduziert $[M+H]^-$ [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

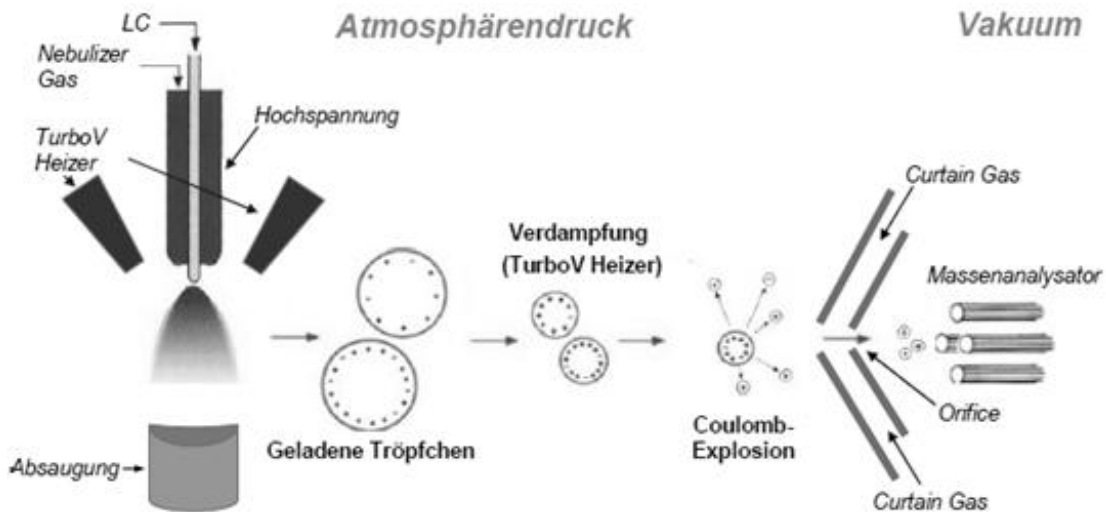


Abbildung 9: Schema der Elektro-Spray-Ionisierung (ESI)

[APPLIED BIOSYSTEMS, 2009]

Die Lösung wird unter Hochspannung durch eine Kapillare gesprüht, wobei kleine, positiv oder negativ geladene Tröpfchen erzeugt werden. Diese Tröpfchen werden im Hochvakuum beschleunigt, während die Lösung langsam verdampft. Die immer kleiner werdenden Tröpfchen zerplatzen (Coulomb-Explosion) und setzen positive oder negative Molekülonen frei, die mit dem Massenspektrometer detektiert werden [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

2.10.2. MS-triplequadrupole

Ein MS-triplequadrupole ist ein Detektor, der aus mehreren Analysatoren besteht. Auch bei einem Quadrupol-Quadrupol-TOF werden verschiedene Detektoren kombiniert, wodurch eine bessere Quantifizierung der Analyten ermöglicht werden soll. Die Koppelung von mehreren Detektoren wird als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

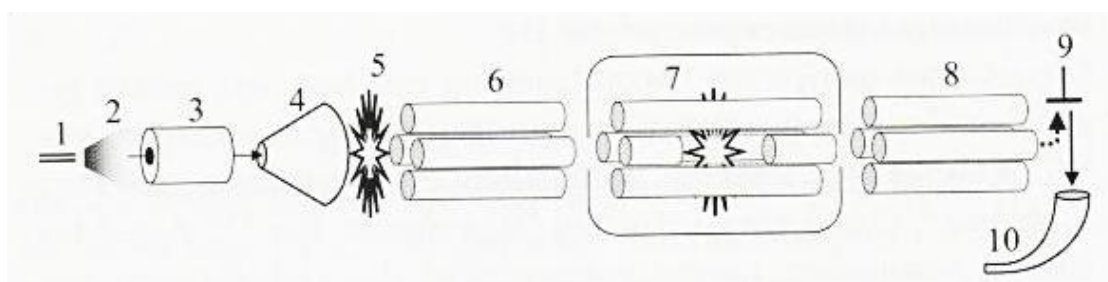


Abbildung 10:ESI-Triplequad-Massenspektrometer

[BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005]

(1) ESI-Kapillare, (2) ESI-Spray, (3) geheizte Transferkapillare, (4) Skimmer, (5) Skimmer-CID-Region, (6) erster Quadrupol, (7) zweiter Quadrupol (Kollisionszelle), (8) dritter Quadrupol, (9) Ablenkelektrode und Konversionsdynode, (10) Detektion mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV).

Triplequadrupolgeräte setzen sich aus drei Einheiten zusammen, von denen der erste Quadrupol die Molekülonen (precursor ions) selektiert. In der Kollisionszelle (zweiter Quadrupol) werden die Molekülonen fragmentiert, die daraus entstandenen Fragmenten (product ions) im dritten Quadrupol nach m/z getrennt und analysiert [FREDE, 2006; BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

2.10.3. MS-qTOF

Mit einem Flugzeit-Massenspektrometer wird durch Messung der Flugzeit von Ionen die Masse von Molekülen, bzw. das Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) bestimmt. Die Ionisierung kann durch ESI, APCI oder MALDI erfolgen. In einem elektrischen Feld werden die Ionen durch einen Puls beschleunigt, durch ein Flugrohr geleitet und durch einen Detektor, der sich am Ende des Rohres befindet, detektiert. Leichte, kleine Ionen gelangen zuerst durch das Flugrohr und erreichen den Detektor vor den schweren, großen Ionen [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

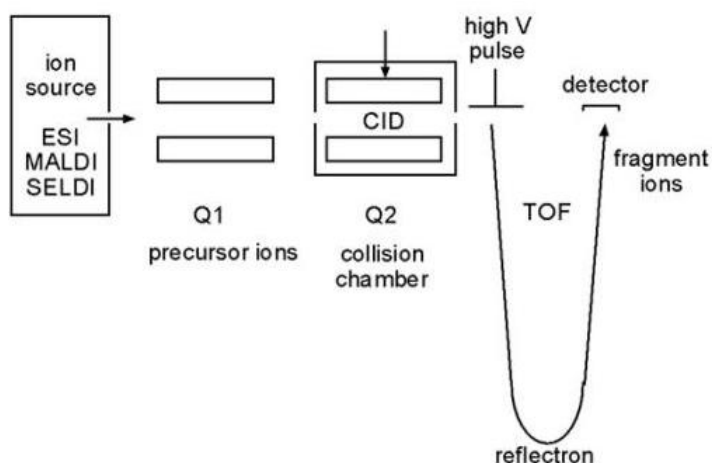


Abbildung 11: Quadrupole-TOF Mass Spectrometer (MS/MS)

[GRONINGEN PROTEOMICS FACILITY, 2010]

Durch den abgewinkelten Bau der Flugrohre bei neueren Geräten, kommt es zum Einsatz von Ionenspiegeln bzw. Reflektronen. Die Ionen werden dadurch in einem Winkel reflektiert, was zu einer Verlängerung der Flugstrecke und einer noch genaueren Analyse führt, wodurch gute Nachweisempfindlichkeiten erreicht werden.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Chemikalien

- Acetonitril, Rotisolv® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Wasser, Rotisolv® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol, Rotisolv® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Ameisensäure, Rotipuran® $\geq 98\%$, p.a., ACS, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniaklösung, Rotipuran®, 30%, p.a., Ammoniumhydroxidlösung, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumacetat, $\geq 97\%$, p.a., ACS, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumformiat, $\geq 95\%$, reinst, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Argon $\geq 99,999\%$, ALPHAGAZ™ Ar¹, Druck bei 15 °C: 200 bar, Air Liquide Austria GmbH (Schwechat, Österreich)
- L(+)-Ascorbinsäure, Ph. Eur., USP, BP, E 300, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Chloroform, Rotipuran® $\geq 99\%$, p.a., ACS, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄), Ph. Eur., BP, wasserfrei, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- N,N-Dimethylhexylamine, 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- DL-Dithiothreitol solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

- Essigsäure, 100 %, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- meta-Phosphorsäure, p.a., Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Stickstoff
- Citronensäure $\geq 99,5\%$, p.a., ACS, wasserfrei, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Methotrexate $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Lithiumformiatlösung zum Kalibrieren für MS MicroTOF-qII: 50 ml LiOH - 10mmol, 49 ml Isopentenylpyrophosphat (IPP), 1 ml HCOOH)

3.2. Geräte

- HPLC Ultimate 3000 Series Chromatograph (bestehend aus Ultimate 3000 Column Compartment, Ultimate 3000 Autosampler, Ultimate 3000 Pumpe), Dionex Austria GmbH (Wien, Österreich)
- MS MicroTOF-qII mit ESI-Quelle, Bruker Daltonics® GmbH (Bremen, Deutschland)
- MS triplequadrupole mit ESI Quelle, API 4000TM, LC/MS/MS System (Applied Biosystems/MDS Sciex)
- Chromatographiesäule: Atlantis T3 2,1mm x 150mm x 3 μm (Vorsäule: Atlantis T3 2,1 x 10 mm x 3 mm)
- Konzentrator, Eppendorf concentrator plus, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Heizblock, Stuart block heater SBH200D, Barlworld Scientific Limited Stone (Staffordshire, UK)
- Zentrifuge, Jouan BR4i multifunction centrifuge, Thermo Electron Corporation (Frankreich)
- pH-Meter, Seven EasyTM pH Meter S20, Mettler Toledo GmbH (Schweiz)
- Pipetten (5 – 200 μl , 10 - 100 μl , 100 - 1000 μl), Eppendorf Reference® variable autoclavable, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Vortexer, IKA® MS1 230 Minishaker, IKA-Works. Inc. (Wilmington, USA)

- Präzisionswaage, Sartorius 74537, MC 410 S, Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

3.3. Software

- Für die HPLC Ultimate 3000: Hystar 3.2 User Manual (Bruker Daltonics® GmbH, Bremen, Deutschland)
- Für MS-MicroTOF-qII: microTOF control 2.1 und Data Analysis™ 4.0 SP 1, Bruker Daltonics® GmbH (Bremen, Deutschland)
- Für MS triplequadrupole: Software Analyst 1.4 (Applied Biosystems/MDS Sciex)

3.4. Materialien

- Filterspitzen, MultiGuard™ Barrier Tips (100 – 1000 µl), Sorenson Bioscience
- Pipettenspitzen, eppendorf ep T.I.P.S. (20 µl, 200 µl, 1000 µl), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf-Vial (safe-lock-tubes) 1,5 ml, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- HPLC-Vials, 2 ml vial amber, Agilent Technologies (Deutschland)
- Snap cap 11 mm, Agilent Technologies (Deutschland)
- Rotilabo®-Einsätze für HPLC-Vials, 100 µl, Borosilikat., Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Wiegeschälchen (zum Einwiegen der Metaboliten)
- Spatel
- dunkle Glasflaschen mit Schraubverschluß (100ml, 500 ml, 1000 ml)
- Messzylinder 100 ml, 500ml, 1000ml
- Erlenmeyerkolben

3.5. Folat-Standardsubstanzen

- Folsäure, Folic acid, approx. 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) (MW: 441 g/mol)
- 5-MTHF: (6S)-5-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, Sodium-L-Mefolate, Merck-Eprova AG (MW: 459 g/mol)
- THF: (6S)-H₄PteGlu-Na₂, Merck-Eprova AG (MW: 445 g/mol)
- DHF: 7,8-Dihydrofolic acid, Impurity reference standard, Merck-Eprova AG (MW: 443,4 g/mol)
- p-ABA: p-Aminobenzoyl-L-glutamic acid, Schircks laboratories (MW: 266,3 g/mol)
- PteGlu2: Pteroyldi- γ -L-glutamic acid, Schircks laboratories (MW: 570,5 g/mol)
- PteGlu3: Pteroyltri- γ -L-glutamic acid, Schircks laboratories (MW: 699 g/mol)

3.6. Biologische Materialien

- Erythrozyten:
Gewonnen aus Blutproben von freiwilligen Probanden, die an einer Studie zur Untersuchung eines Folsäure-Polymorphismus teilgenommen haben.
Nach Entnahme des Blutes mit Antikoagulantien (Heparin oder EDTA) wurde das Plasma durch Zentrifugieren von den Erythrozyten getrennt. Nach mehrmaligem Waschen (3 Mal) mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und Zugabe von Stabilisatoren (1 % Natriumascorbat und 1 % 2-Mercaptoethanol) wurden die roten Blutkörperchen aliquotiert, mit Argon begast, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20° C gelagert.

3.7. Methodenentwicklung - MS triplequadrupole:

Ein HPLC Ultimate 3000 Series Chromatograph (Dionex, Austria) gekoppelt mit einem Triplequadrupole Massenspektrometer API 4000TM mit ESI Quelle (Applied Biosystems/MDS Sciex) wurde für die Methodenentwicklung verwendet. Bei sämtlichen Analysen mit dem Triplequadrupole Massenspektrometer wurden mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) einzelne Fragmentationen ausgewählt, wodurch die Quantifizierung sehr sensitiv und selektiv verlaufen kann. Die MRM-Einstellung wurde so gewählt, dass für jeden Metaboliten, die zwei intensivsten Übergänge bzw. Fragmente detektiert wurden.

Parallel dazu wurden mit Hilfe eines Flugzeitmassenspektrometers (MicroTOF-qII) weitere Methoden erarbeitet, bzw. wurde versucht, die bereits mit dem Triplequadrupole Massenspektrometer durchgeführten Methoden anzuwenden, worauf unter Punkt 3.8 näher eingegangen wird.

Zur Methodenentwicklung (für beide Massenspektrometer gültig) wurden Folat-Standardsubstanzen verwendet, die in unterschiedlichen wässrigen Lösungen gelöst und je 1 ml davon in ein HPLC-Vial pipettiert wurde. Für alle Messungen wurden braune HPLC-Vials verwendet, um die empfindlichen Folate vor Licht zu schützen. Die HPLC-Vials wurden mit Stickstoff oder Argon begast und entweder bei kurz darauffolgender Messung in den Autosampler bei 4 °C gegeben oder sofort bei -18 °C bis zur nächsten Verwendung tiefgekühlt. Die Lagerungsdauer der HPLC-Vials bei -18°C reichte von einem Tag bis vier Wochen. Für jede Messung wurde die Chromatographiesäule Atlantis T3 verwendet. Um eine optimale Methode zur Messung der Metaboliten zu ermitteln, wurde im Vorhinein eine umfassende Literaturrecherche zum Thema Analyse von Folsäuremetaboliten mittels LC-MS durchgeführt.

3.7.1. Methode 1: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (neg. Modus)

In Anlehnung an die Studie von WANG et. al. 2010 wurden die Folsäuremetaboliten THF, 5-MTHF und DHF im negativen Ionenmodus gemessen.

Puffer:		
100	mM	Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4$)
1	%	Ascorbinsäure
0,2	%	2-Mercaptoethanol (MCE)

Tabelle 2: 100 mM Ammoniumacetatpuffer

Die Einwaage von 771,98 mg $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4$ (MW: 77,08g/mol) wurde in einem Messkolben mit 100 ml HPLC-Wasser gelöst und zusätzlich mit 1,03g Ascorbinsäure sowie 200 μl MCE versetzt, was eine 100,15 mM Ammoniumacetatlösung ergibt.

Je 1 mg der Metaboliten wurden in 10 ml des 100 mM Puffers (pH 7,9 laut WANG et. al. 2010) gelöst, je 1 ml davon in ein HPLC-Vial überführt und im Autosampler bei 4 °C bis zur Messung gelagert. Dieser Vorgang, d.h. das Lösen von 1 mg der Metaboliten in 10 ml des jeweiligen Puffers und anschließendes pipettieren von 1 ml in ein HPLC-Vial, wurde für alle Methoden genau nach diesem Schema durchgeführt.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,5 ml, Einspritzvolumen: 10 μl , isokratische Methode – Laufmittel A: HPLC-Wasser (20%), Laufmittel B: Acetonitril (80%).

	5-MTHF	THF	DHF
MRM:	458,018/328,8	443,878/314	-
	458,018/127,9	443,878/127	-

Tabelle 3: Übergänge 1 (Methode 1 – negativer Modus)

Für 5-MTHF sowie für THF konnten das jeweilige Massengewicht und auch die zwei intensivsten Übergänge bzw. Fragmente detektiert werden, wohingegen für DHF weder Massengewicht noch Fragmente gefunden wurden. Selbst nach mehrmaligem Messen und Herstellung einer neuen Lösung für DHF, in der Annahme, dass sich DHF zu schnell abbaut, konnten für DHF keine Ergebnisse erzielt werden.

Ein erneuter Versuch mit einem bis zu diesem Zeitpunkt noch ungeöffnetem DHF-Standard, brachte den erhofften Erfolg. Für die drei Metaboliten p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 mussten ebenso einige Messungen durchgeführt und letztendlich auch neue Lösungen mit frischen Reinsubstanzen hergestellt werden, bevor Werte erhalten wurden.

	DHF	p-ABA	PteGlu2	PteGlu3
MRM:	441,852/176,0	264,943/204,8	569,27/421,60	698,296/422,0
	441,852/132,9	264,943/174,9	569,27/293,10	698,296/127,8

Tabelle 4: Übergänge 2 (Methode 1 - negativer Modus)

Um die Stabilität der Metaboliten in der Pufferlösung zu testen, wurden die HPLC-Vials im Autosampler bei 4 °C für 24 Stunden stehengelassen und danach erneut mit den exakt selben Einstellungen gemessen.

Lediglich für 5-MTHF konnten Ergebnisse erzielt werden, wobei die Intensität auch bei diesem Metaboliten stark abgenommen hat und somit keine reproduzierbaren Resultate erhalten wurden.

3.7.2. Methode 2: 10 mM Wasserstoffacetatpuffer (pos. Modus)

Methode 2 wurde anhand der von PATRING und JASTREBOVA 2007 veröffentlichten Studie, in der Folate mittels positiver Elektrosprayionisierung (ESI) detektiert und quantifiziert wurden, durchgeführt. In der Annahme, dass Phosphate sich im Massenspektrometer ablagern, wurde anstelle des von PATRING und JASTREBOVA verwendeten 100 mM Phosphatpuffer, ein 10 mM Puffer (HAc – Wasserstoffacetat/Essigsäure) mit einem pH-Wert von 2,90 benutzt.

Puffer:	
10 mM	HAc
1 %	Ascorbinsäure
0,2 %	2-Mercaptoethanol

Tabelle 5: 10mM Wasserstoffacetatpuffer

61,8 mg HAc (MW: 60,05 g/mol) wurden in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit 100 ml HPLC-Wasser und zusätzlich mit 1,00 g Ascorbinsäure sowie 200 µl MCE versetzt, was eine 10,29 mM HAc-Lösung ergibt.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,4 ml, Einspritzvolumen: 10µl, isokratische Methode (30 min) – Laufmittel A: 10mM HAc (pH 2,92) 20 %, Laufmittel B: Acetonitril 80%.

Zur Herstellung von Laufmittel A wurden 1000 ml HPLC-Wasser mit 600,7 mg HAc versetzt.

PATRING und JASTREBOVA haben in ihrer Studie zwei unterschiedliche Puffer, 10mM HAc und 10 mM HFo (Ameisensäure), miteinander verglichen, wobei eindeutig höhere Intensitäten für Metaboliten, gelöst in 10mM HAc im positiven Ionenmodus, erzielt werden konnten. Diese Puffer waren Bestandteil der mobilen Phase, die sich weiters aus ACN und MeOH zusammengesetzt hat.

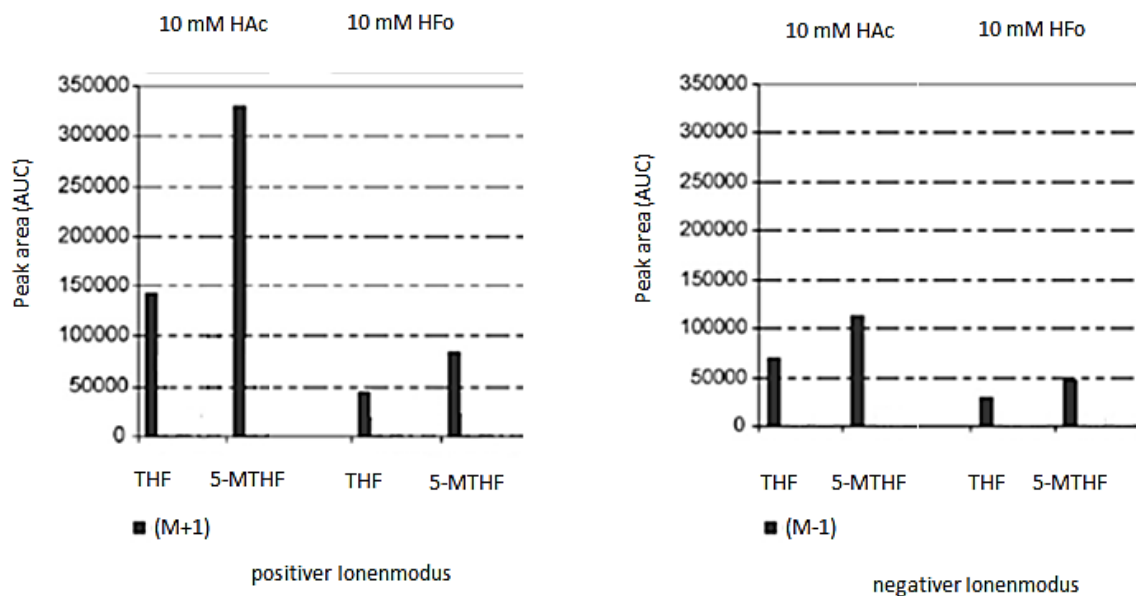


Abbildung 12: Vergleich von THF und 5-MTHF in unterschiedlichen Puffern und Ionenmodi

[modifiziert nach PATRING und JASTREBOVA, 2007]

Aufgrund der anschaulichen Resultate von PATRING und JASTREBOVA mit dem HAc-Puffer, als Bestandteil der mobilen Phase, wurde die Methode nicht mit dem HFo-Puffer, sondern lediglich mit dem HAc-Puffer, sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus durchgeführt.

Dass deutlich höhere Intensitäten der Metaboliten im positiven Modus erzielt werden können, konnte bestätigt werden, jedoch wurden keine Ergebnisse für DHF und PteGlu2 erhalten.

	5-MTHF	THF	DHF
MRM:	460,341/313,30	446,40/166,50	-
	460,341/180,10	446,40/342,10	-

	p-ABA	PteGlu2	PteGlu3
MRM:	267,272/120,10	-	700,334/295,0
	267,272/64,90	-	700,334/176,2

Tabelle 6: Übergänge 3 (Methode 2 – positiver Modus)

3.7.3. Methode 3: 10 mM Wasserstoffacetatpuffer (pos. Modus) – veränderter Gradient

Da sich die Resultate aus Methode 2 als suboptimal darstellten, wurde in Anlehnung an die Studie von FREISLEBEN et. al. 2003b versucht, durch Veränderung des Gradienten auf 100% ACN, die volle Elutionskraft auszunutzen und so eine Verbesserung der Messergebnisse zu erlangen.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,4 ml/min, Einspritzvolumen: 5 µl, Gradientenelution (40 min) – Laufmittel A: 10mM HAc (pH 2,92), Laufmittel B: Acetonitril.

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,4	6
12	0,4	20
24	0,4	100
30	0,4	6
40	0,4	0

Tabelle 7: Gradientenelution (Methode 3 - positiver Modus)

Die beiden Laufmittel, sowie der Puffer wurden vorerst aus Methode 2 beibehalten. Das Einspritzvolumen wurde von 10 μl auf 5 μl verringert, um eine Überladung der Säule zu vermeiden und schmalere Peaks zu erhalten.

Das Ergebnis dieser Methode war noch weniger überzeugender als die Resultate der vorhergehenden Messungen, da lediglich für einen Metaboliten, 5-MTHF, ein Peak erzielt wurde.

3.7.4. Methode 4:0,1% HCOOH-Puffer (pos. Modus)

Methode 4 beruht ebenso wie Methode 3 auf der Studie von FREISLEBEN et. al. 2003b, jedoch wurden nunmehr auch die Eluenten und der Puffer (pH 3,23) verändert.

Puffer:		
0,1	%	HCOOH
1	%	Ascorbinsäure
0,2	%	2-Mercaptoethanol

Tabelle 8: 0,1% HCOOH-Puffer

Ein 100 ml Messkolben wurde bis zur Markierung mit HPLC-Wasser gefüllt, mit 100 μl flüssiger Ameisensäure (MW: 46,03 g/mol), 1,00 g Ascorbinsäure sowie 200 μl MCE versetzt.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens Temperatur: 30 °C, Säulenfluss: 0,4 ml/min, Einspritzvolumen: 5 μl , Gradientenelution (40 min) – Laufmittel A: 0,1% HCOOH (pH 3,22), Laufmittel B: Acetonitril.

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,4	6
12	0,4	20
24	0,4	100
30	0,4	6
40	0,4	0

Tabelle 9: Gradientenelution (Methode 4 - positiver Modus)

Das Ergebnis konnte jedoch keinen Unterschied zur vorherigen Methode aufzeigen, da wiederum nur für 5-MTHF, ein Peak erhalten wurde.

Selbst durch Anpassung des Gradienten an die von FREISLEBEN et. al. 2003b vorgegebenen Einstellungen (siehe Tabelle 10), konnte kein überzeugendes Resultat erreicht werden.

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,4	10
6	0,4	20
7	0,4	80
8	0,4	100
10	0,4	100
20	0,4	10
23	0,4	0

Tabelle 10: Gradientenelution (Methode 4 modifiziert - positiver Modus)

3.7.5. Methode 5: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus)

Da auch WANG et. al. 2010 (siehe Methode 1) die Analyse der Folsäuremetaboliten mittels HPLC, gekoppelt an einen Triplequadrupole-Massenspektrometer, durchgeführt hatten, wurde erneut versucht, die von ihm verwendete Methode anzuwenden.

Es wurde wiederum derselbe 100 mM Ammoniumacetatpuffer hergestellt, doch zusätzlich wurde auch der pH-Wert, der laut WANG et. al. 2010 bei 7,9 liegen sollte, mit einem pH-Meter überprüft. Der gemessene pH-Wert von 3,4 erreichte nicht annähernd den laut Studie leicht basischen pH-Wert von 7,9, was die wenig zufriedenstellenden Resultate aus Methode 1 erklären könnten.

Mit der unter wässrigen Bedingungen als Base wirkende Substanz, wurde Ammoniak verwendet, um den gewünschten pH-Wert von 7,9 zu erreichen.

Puffer:		
100	mM	Ammoniumacetat
0,8	ml	Ammoniak
1	%	Ascorbinsäure
0,2	%	2-Mercaptoethanol

Tabelle 11: 100 mM Ammoniumacetatpuffer

Die Einwaage von 770,6 mg $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4$ (MW: 77,08g/mol) wurde in einem Messkolben mit 100 ml HPLC-Wasser gelöst. Durch Zusatz von 0,8 ml Ammoniak, konnte der pH-Wert von 7,9 erreicht werden. Des Weiteren wurde der Puffer mit 1,019 g Ascorbinsäure sowie 200 μl MCE versetzt, was eine 99,97 millimolare Ammoniumacetatlösung ergibt.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,4 ml, Einspritzvolumen: 5 µl, Gradientenelution (40 min – siehe Methode 3) – Laufmittel A: 100 mM CH₃COO⁻NH₄ (pH 7,9), Laufmittel B: Acetonitril.

Bei Methode 5 wurden die Metaboliten sowohl im positiven als auch im negativen Modus gemessen, wobei im positiven Modus nur für zwei (5-MTHF, p-ABA) von den sechs Metaboliten Peaks erhalten wurden. Hingegen konnten im negativen Ionenmodus alle gemessenen Metaboliten detektiert und anhand von Peaks analysiert werden, obwohl die niedrige Intensität sowie die Breite der Peaks eine nicht optimale Trennung erkennen ließen.

3.7.6. Methode 6: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus) – veränderter Gradient und Säulenfluss

Methode 6 entstand durch Weiterentwicklung von Methode 5, wobei der Großteil der Einstellungen, bis auf den Säulenfluss und den Gradienten, beibehalten wurde. Der Säulenfluss wurde von 0,4 ml/min auf 0,3 ml/min reduziert, die Gradientenelution auf 40% ACN beschränkt und die Dauer der Methode auf 15 min verkürzt.

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
5	0,3	20
10	0,3	40
15	0,3	0,1

Tabelle 12: Gradientenelution (Methode 6 - negativer Modus)

Obwohl die Peakbreite sowie die Intensität noch nicht optimal waren, konnte durch Methode 6 eine deutliche Verbesserung erreicht werden. Die Peakbreite für 5-MTHF, die sich bei den vorangegangenen Versuchen im Bereich von 1,0 bis 2,0 Minuten bewegte, konnte deutlich reduziert werden, das anhand von Abbildung 13 zu sehen ist.

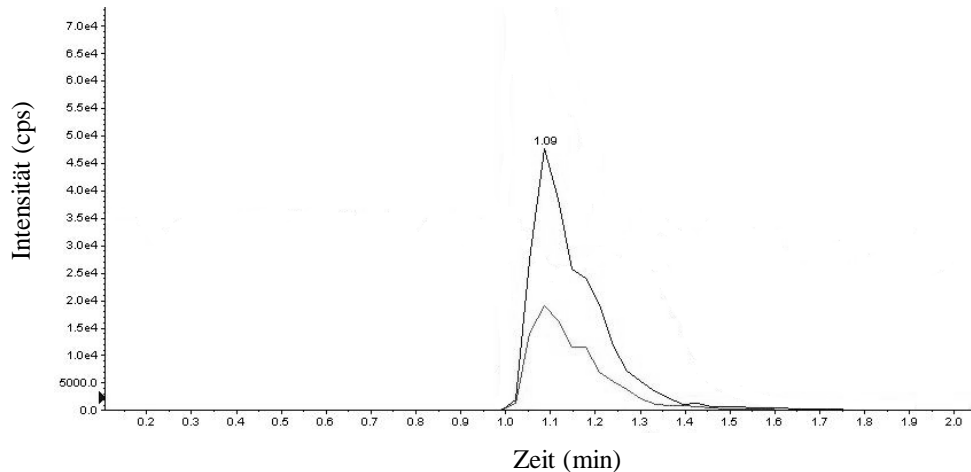


Abbildung 13: Peak von 5-MTHF (bestehend aus den zwei intensivsten Ionenübergängen)

Die nächste Herausforderung bezog sich in erster Linie darauf, herauszufinden, weshalb mit dieser Methode, keine Peaks für p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3, sondern nur für 5-MTHF, THF sowie DHF erhalten wurden.

Die für die Analyse von Methode 6 verwendeten Metaboliten-Lösungen, wurden alle am selben Tag mit dem gleichen Puffer und Stabilisatoren (siehe Tabelle 11) hergestellt, wodurch zunächst keine offensichtliche Erklärung zu finden war.

Da p-ABA mit Methode 5 auch im positiven Ionenmodus detektiert werden konnte, wurden die sechs Metaboliten mit denselben Einstellungen nun auch im positiven Modus gemessen. Das Resultat dieser Analyse war, dass Peaks nur für zwei der Metaboliten, 5-MTHF und p-ABA, Peaks erhalten wurden, was sich als noch weniger zufriedenstellend herausstellte.

3.7.7. Methode 7: 100 mM Ammoniumacetatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus) – veränderte Laufmittel

Methode 7 ist eine Weiterentwicklung der Methode 3 und 4 nach FREISLEBEN et. al. 2003b. Da sich die Metaboliten in der 100 millimolaren Ammoniumacetatlösung gut gelöst haben, wurde diese weiterhin als Puffer verwendet. Die Gradientenelution (siehe Tabelle 10) wurde nicht von dieser Studie übernommen, da der Anstieg der mobilen Phase B bzw. ACN auf 100%, sich bereits in Methode 4 als nicht optimal herausstellte. Der Gradient von Methode 6, wurde bis auf minimale Veränderungen, fortgeführt. Eluent A und B wurden nach FREISLEBEN et. al. 2003b übernommen, zusätzlich wurde der mobilen Phase B, 0,1 % HCOOH, zur besseren Ionisierung zugefügt.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,3 ml/min, Einspritzvolumen: 5 µl, Gradientenelution (10 min) – Laufmittel A: 0,1% HCOOH (pH 3,22), Laufmittel B: Acetonitril + 0,1% HCOOH.

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
3,5	0,3	10
5	0,3	20
7	0,3	40
10	0,3	0,1

Tabelle 13: Gradientenelution (Methode 7 – positiver und negativer Modus)

Ergebnis der Messung im positiven Modus:

Peaks für 5-MTHF und p-ABA

Ergebnis der Messung im negativen Modus:

Peaks für 5-MTHF, THF, DHF

5-MTHF zeigte eine höhere Intensität und einen weniger breiten Peak im negativen Modus. Der Peak für PteGlu2 im negativen Modus, wurde erst während der zeitlich darauffolgenden Analyse von PteGlu3 geliefert, für PteGlu3 wurde ein Peak erst während der darauffolgenden Messung von 5-MTHF detektiert, was darauf schließen lässt, dass PteGlu2 und PteGlu3 erst nach 10 min eluieren. Daher wurde der Gradient erneut modifiziert und die Methode verlängert.

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
3,5	0,3	10
5	0,3	20
7	0,3	40
10	0,3	100
20	0,3	100
21	0,3	0,1
30	0,3	0,1

Tabelle 14: Gradientenelution (Methode 7 modifiziert - positiver Modus)

p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 wurden im positiven Modus anhand des in Tabelle 14 beschriebenen Gradienten, mit denselben Einstellungen und Laufmitteln gemessen.

Ergebnis der Messung im positiven Modus (30 min):

Peaks konnten für alle drei gemessenen Metaboliten erhalten werden. Um die relativ breiten Peaks von p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 zu optimieren, wurden der Gradient und der Säulenfluss geringfügig verändert:

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,4	0,1
3,5	0,4	10
5	0,4	20
7	0,4	40
7,2	0,4	100
12	0,4	100
12,1	0,4	0,1
20	0,4	0,1

Tabelle 15: Gradientenelution (Methode 7 modifiziert - positiver Modus)

Ergebnis der Messung im positiven Modus (20 min):

Es wurden wiederum Peaks für alle drei Metaboliten geliefert, die eine höhere Intensität und noch deutlich schmalere Peaks, als mit der zuvor gemessenen 30 min Methode, zeigten.

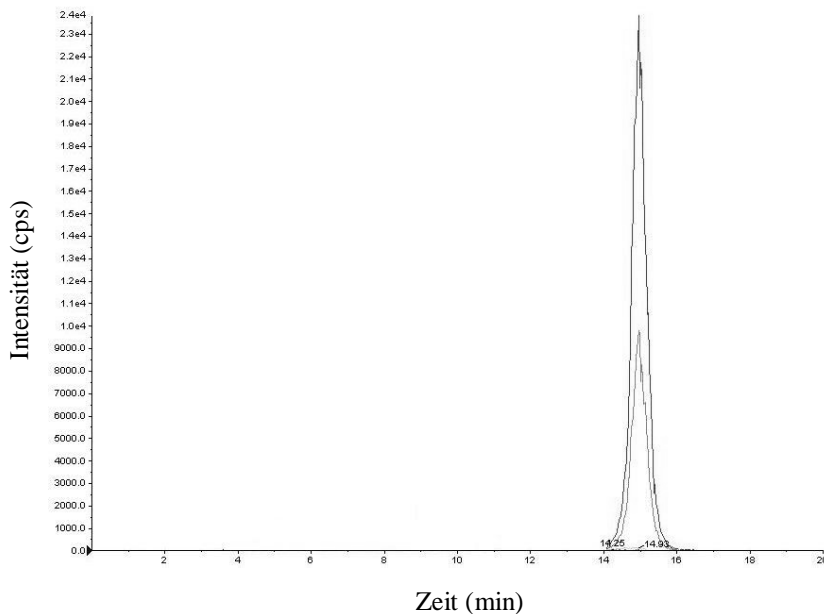


Abbildung 14: PteGlu2 (20 min Methode)

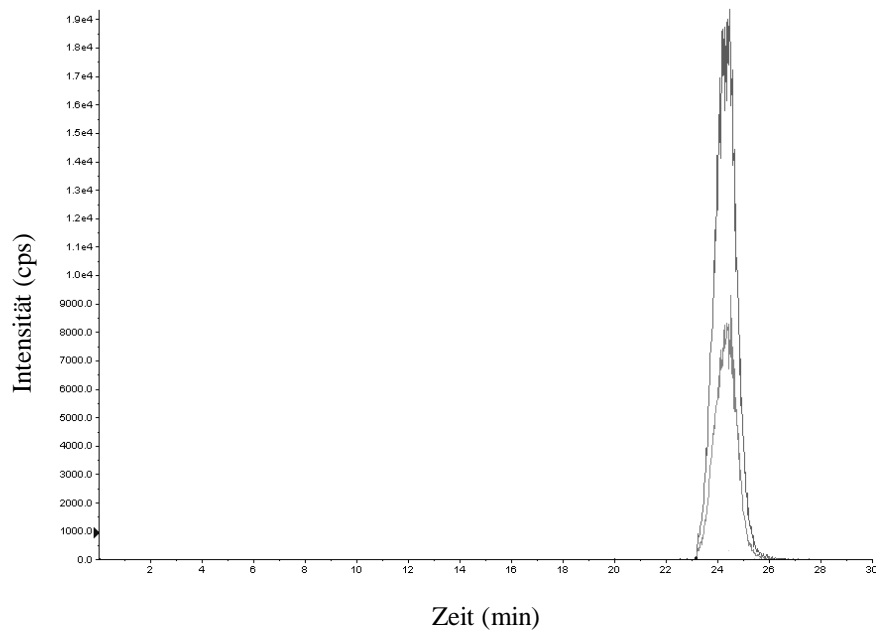


Abbildung 15: PteGlu2 (30 min Methode)

Um die Stabilität der Metaboliten zu ermitteln, wurden mehrere Messungen für jeden Metaboliten direkt hintereinander durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass vor allem die Polyglutamate, PteGlu2 und PteGlu3 sehr schnell abbauen und sich unbekannte Substanzen in der Probe anreichern, wie in Abbildung 16 und 17 ersichtlich ist. Zwischen diesen zwei Messungen von PteGlu2 liegt lediglich ein Zeitunterschied von maximal 20 min.

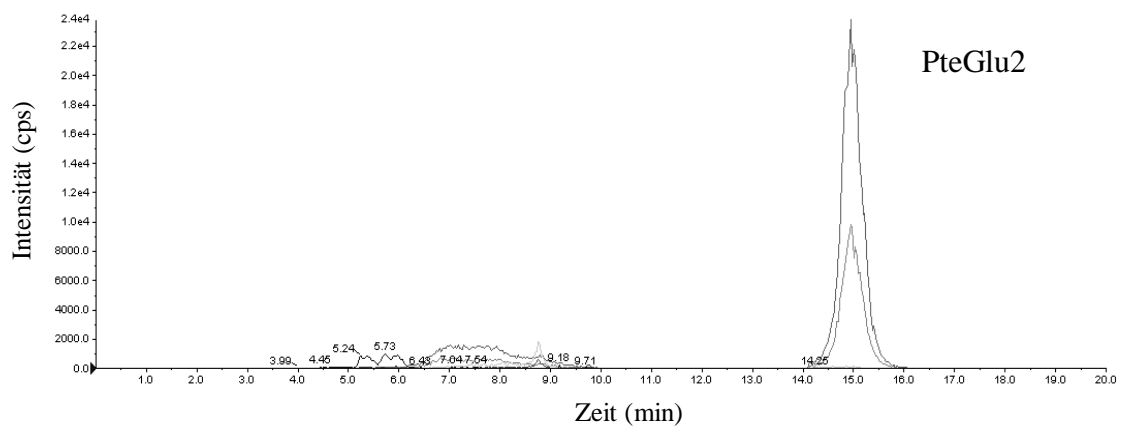


Abbildung 16: Erste Messung von PteGlu2

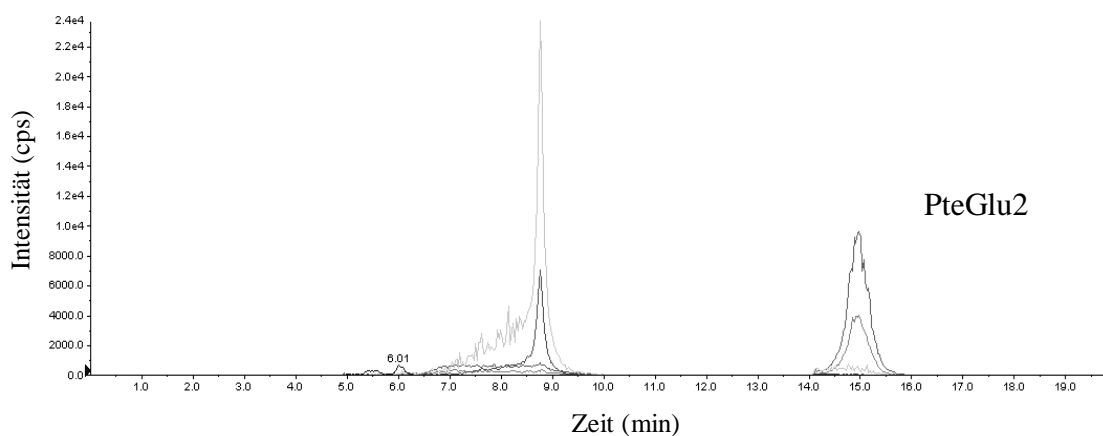


Abbildung 17: Zweite Messung von PteGlu2

Um die Stabilität der Metaboliten zu erhöhen, wurde erneut eine umfassende Literaturrecherche zum Thema Stabilisatoren in Verbindung mit Folaten bzw. Polyglutamatn durchgeführt. Wie bereits unter Punkt 2.7 angeführt, werden häufig Ascorbinsäure, 2-Mercaptoethanol, Zitronensäure sowie DTT verwendet, um die empfindlichen Folate zu stabilisieren.

3.7.8. Methode 8: Puffer: 50:50 Methanol/Wasser (v/v) (pos. und neg. Ionenmodus)

LIANG et. al. 2009 haben als Pufferlösung für ihre Analyten ein Methanol/Wassergemisch im Verhältnis 50:50 verwendet, zu dem pro ml Flüssigkeit, je 100 µg Ascorbinsäure, Zitronensäure und DTT hinzugefügt wurden.

Aus je 50 ml Methanol und Wasser wurde in einem 100 ml Messkolben eine Lösung hergestellt, die mit 10,63 mg Ascorbinsäure, 10,74 mg Zitronensäure sowie 10,00 mg DTT versetzt wurde. Je 10 mg der Metaboliten wurde in jeweils 10 ml des Puffers zur Lösung gebracht.

Als Laufmittel bedienten sich LIANG et. al. 2009 einer 5mM Ammoniumformiatlösung (pH 3,2) und 0,15% HCOOH (LM A), Laufmittel B setzte sich aus Acetonitril und 0,15% HCOOH zusammen.

Die Einwaage von 157,56 mg Ammoniumformiat (MW: 63,06 g/mol) für Laufmittel A wurde in 500 ml HPLC-Wasser gelöst und mit 750 µl HCOOH versetzt (pH 3,24). Laufmittel B setzte sich aus 500 ml ACN und 750 µl HCOOH zusammen.

Der in der Studie verwendete Gradient zeigte einen sehr hohen Anstieg von ACN auf 100%, der sich wie bereits unter Methode 3, 4, 5 und 7 erwähnt, nur für p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 als optimal herausstellte. Die Laufmittel wurden von LIANG et. al. 2009 übernommen, die beiden Gradienten jedoch von Methode 7 beibehalten, da nach zahlreichen Optimierungsversuchen, die lediglich für einzelne Metaboliten eine Verbesserung bewirkten, sich die in Tabelle 16 aufgezeigten Gradienten als optimal herausstellten.

Multi-Step-Gradient:
(5-MTHF, THF, DHF)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
3,5	0,3	10
5	0,3	20
7	0,3	40
10	0,3	0,1

Multi-Step-Gradient:
(p-ABA, PteGlu2, PteGlu3)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,4	0,1
3,5	0,4	10
5	0,4	20
7	0,4	40
7,2	0,4	100
12	0,4	100
12,1	0,4	0,1
20	0,4	0,1

Tabelle 16: Multi-Step-Gradienten

Um Methode 7 und 8 direkt miteinander vergleichen zu können, wurde für jede Methode die jeweilige Metaboliten-Lösung vor der Analyse frisch zubereitet. Tabelle 17 veranschaulicht die Resultate der Messungen in Bezug auf Intensität und Peakbreite der Metaboliten für beide Methoden, wobei E die Zehnerpotenzen darstellt.

	Methode 8		Methode 7	
	Intensität (cps)	Peakbreite (sec)	Intensität (cps)	Peakbreite (sec)
	LM A: 5mM Ammoniumformiat + 0,15% HCOOH		LM A: 0,1% HCOOH	
	LM B: ACN + 0,15% HCOOH		LM B: ACN + 0,1% HCOOH	
5-MTHF	2,6E5	30	6,8E5	25
THF	1,7E5	25	1,8E5	30
DHF	2,7E5	60	1,8E5	75
p-ABA	6,9E5	90	2,1E6	50
PteGlu2	-	-	1,9E4	120
PteGlu3	-	-	8,0E3	180

Tabelle 17: Vergleich von Methode 7 und 8

5MTHF, THF und DHF wurden für Methode 8 nur im negativen Modus gemessen, da schon einige Vorversuche gezeigt hatten, dass für diese Metaboliten im positiven Modus deutlich breitere Peaks geliefert werden als im Negativen. Des Weiteren kam es laufend zu Intensitätseinbußen bei Messungen im positiven Ionenmodus.

p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 wurden sowohl im negativen, als auch im positiven Modus gemessen, wobei nur im positiven Ionenmodus Peaks erhalten wurden.

Der Vergleich von Methode 7 und 8, wie in Tabelle 17 dargestellt, zeigt, dass bis auf THF, deutliche Unterschiede, zu Gunsten von Methode 7, in den Peak-Intensitäten liegen. DHF, PteGlu2 und PteGlu3 konnten kaum in der Stocklösung von Methode 8, bestehend aus gleichen Teilen Methanol und Wasser sowie Stabilisatoren, gelöst werden, was auch der Grund für die Resultate der Polyglutamate bzw. die sehr niedrige Intensität für DHF sein könnte. Ammoniumformiat ist offensichtlich als Laufmittel für Polyglutamate ungeeignet.

Methode 7 wurde daher nicht durch Methode 8 abgelöst, es wurde lediglich der 100mM Ammoniumacetatlösung, die als Puffer für Methode 5, 6 und 7 verwendet wurde, zusätzlich DTT zur Stabilisierung zugefügt. DTT wird häufig in Kombination mit anderen Stabilisatoren, wie z.B. Ascorbinsäure oder 2-Mercaptoethanol, eingesetzt [LIANG et. al., 2009; WANG et. al., 2008; NELSON et. al., 2005, DE BROUWER et. al., 2008].

Puffer:		
100	mM	Ammoniumacetat
0,8	ml	Ammoniak
1	%	Ascorbinsäure
0,2	%	2-Mercaptoethanol
1	%	DTT

Tabelle 18: 100 mM Ammoniumacetatpuffer

3.7.9. Ermittlung der Stabilität der Metaboliten

Dass sich die Stabilität der Metaboliten vor dem Zusatz von DTT als suboptimal herausstellte (siehe Abbildung 16), wurde anhand von zahlreichen Versuchen herausgefunden, dass die Metaboliten zum Teil höhere Intensitäten aufweisen und länger nachweisbar sind, wenn sie nach dem Messen mit Stickstoff oder Argon begast und bis zur nächsten Messung bei -18 °C aufbewahrt werden, als wenn sie im Autosampler bei 4 °C verweilen.

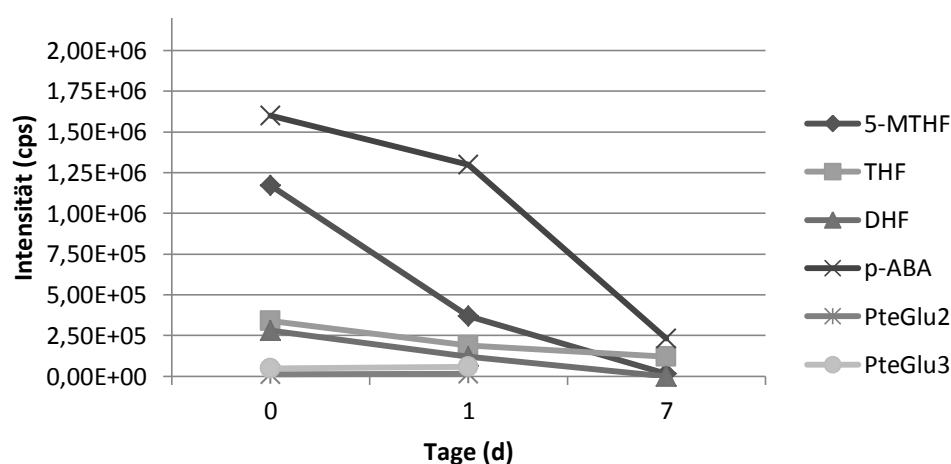


Abbildung 18: Intensität der Metaboliten bei Lagerung im Autosampler

	Intensität cps bei +4 °C		
	0 d	1 d	7 d
5-MTHF	1,17E+06	3,70E+05	1,55E+04
THF	3,40E+05	1,90E+05	1,20E+05
DHF	2,80E+05	1,20E+05	-
p-ABA	1,60E+06	1,30E+06	2,30E+05
PteGlu2	1,20E+04	1,50E+04	-
PteGlu3	4,90E+04	5,90E+04	-

Tabelle 19: Übersicht der Intensitäten der Metaboliten bei Lagerung im Autosampler

Bei den Polyglutamaten wurde von vorne herein die geringste Intensität beobachtet. Bereits 48 Stunden nach der Lagerung im Autosampler waren weder PteGlu2, noch PteGlu3 nachweisbar.

5-MTHF, THF und p-ABA nahmen kontinuierlich ab, und konnten selbst nach sieben-tägiger Lagerung noch mit sehr hoher Intensität nachgewiesen werden.

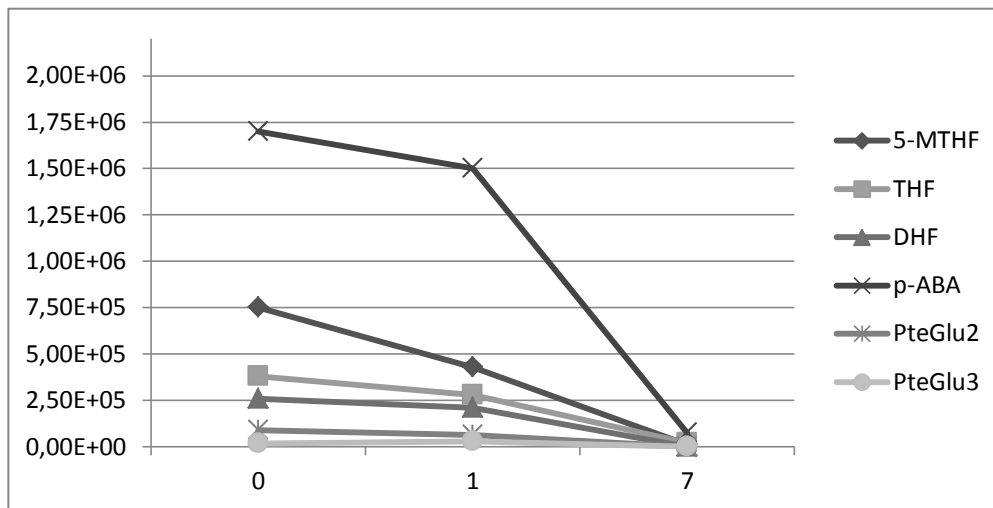


Abbildung 19: Intensität der Metaboliten bei Lagerung im Tiefkühlschrank

	Intensität (cps) bei -18 °C		
	0 d	1 d	7 d
5-MTHF	7,50E+05	4,30E+05	1,20E+04
THF	3,80E+05	2,80E+05	2,20E+04
DHF	2,60E+05	2,10E+05	-
p-ABA	1,70E+06	1,50E+06	7,50E+04
PteGlu2	9,00E+04	6,50E+04	-
PteGlu3	3,00E+04	1,90E+04	-

Tabelle 20: Übersicht der Intensitäten der Metaboliten bei Lagerung im Tiefkühlschrank

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, konnte durch Begasung und Lagerung der Metaboliten bei -18 °C, für p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3, eine bessere Stabilität erreicht werden. Die Polyglutamaten konnten selbst nach 48 h Lagerung noch nachgewiesen werden. Die Werte für 5-MTHF und DHF sind annähernd gleich geblieben, während sich die

Lagerung im Tiefkühlschrank für THF als nachteilig herausstellte, da im Vergleich zur Lagerung im Autosampler, die Intensität um das 6-fache verringert wurde.

3.7.10. Methode 9: 50 mM Phosphatpuffer (pos. und neg. Ionenmodus)

Wie bereits erwähnt, wurden parallel zu den Messungen mit dem HPLC-triplequadrupole, auch Methoden mit dem HPLC-qTOF entwickelt. Primär wurde versucht, die am HPLC-triplequadrupole getesteten Methoden und Einstellungen, auch für das HPLC-qTOF zu übernehmen bzw. anzupassen, um die beiden Massenspektrometer hinsichtlich Nachweisgrenzen auch miteinander vergleichen zu können.

Abbildung 21 zeigt den Vergleich der Ergebnisse für 5-MTHF, THF, DHF sowie Folsäure, gelöst in 100 mM Ammoniumacetatpuffer und 50 mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffer (K_2HPO_4).

Die ursprünglichen Befürchtungen, bezüglich der Ablagerung der Phosphate im Massenspektrometer, wurden durch die Möglichkeit der Ableitung von unerwünschten Substanzen, wie z.B. Phosphate oder Proteine, entkräftet. Durch ein Schaltventil wurde das Eluat für die ersten drei Minuten nicht von der HPLC in das MS, sondern direkt in den Abfall (waste) geleitet. Da keiner der zu messenden Metaboliten vor Minute fünf eluierte, konnte somit durch das Ableiten, eine Verschmutzung der Ionenquelle durch polare Substanzen, die im Falle der verwendeten RP-Chromatographie zu Beginn eluieren, vermieden werden. Phosphate werden zudem häufig als Puffer in der Folatanalytik eingesetzt [DE BROUWER et. al., 2008; HANNISDAL et. al., 2008; PATRING et. al., 2007; NELSON et. al., 2004; FREISLEBEN et. al., 2003; HART et. al., 2002; OWENS et. al., 2005; KOK et. al., 2004].

Neue Messversuche mittels HPLC-triplequadrupole, mit K_2HPO_4 als Puffer für die Lösungen, zeigten weniger optimale Ergebnisse, wie z.B. Fronting, was einen weniger steilen Peakanstieg als Peakabfall beschreibt, als mit HPLC-qTOF. Nach Modifizierung des Gradienten, konnten jedoch auch diese Differenzen bewerkstelligt werden.

Tabelle 21 zeigt die unterschiedlichen Gradienten, die letztendlich auch zur Messung der Verdünnungsreihe, die der Ermittlung der Nachweisgrenzen diente, verwendet wurden.

5-MTHF und p-ABA wurden zwar mit demselben Gradienten, allerdings nicht im selben Ionenmodus, gemessen. Die Messung von 5-MTHF, THF und DHF erfolgte nach wie vor im negativen Modus, p-ABA sowie PteGlu2 im Positiven. PteGlu3 wurde von der Verdünnungsreihe ausgeschlossen, da die Stabilität und Reproduzierbarkeit dieses Metaboliten als unzufriedenstellend bewertet wurde.

Multi-Step-Gradient:
(5-MTHF, p-ABA)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
14,5	0,3	95
18,5	0,3	95
19	0,3	0,1
25	0,3	0,1

Multi-Step-Gradient:
(THF, DHF)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
20	0,3	0,1

Multi-Step-Gradient:
(PteGlu2)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
14,5	0,3	95
28	0,3	95
28,5	0,3	0,1
35	0,3	0,1

Tabelle 21: Multi-Step-Gradienten (Verdünnungsreihe)

3.8. Methodenentwicklung – MS qTOF:

Das Flugzeitmassenspektrometer (MicroTOF-qII) mit ESI Quelle (Bruker Daltonics), das mit einer HPLC Ultimate 3000 Series Chromatograph (Dionex, Austria) verbunden ist, wurde parallel zum HPLC-triplequadrupole zur Methodenentwicklung herangezogen.

Jene Methoden, die bereits für das triplequadrupol MS entwickelt wurden, wurden bei dem Flugzeitmassenspektrometer ebenfalls verwendet.

3.8.1. Vergleich von 100mM Ammoniumacetat und 0,1% HCOOH als Laufmittel

Die für Methode 6 und 7 (HPLC-triplequadrupole) verwendeten Laufmittel und Gradienten, wurden auch mit dem HPLC-qTOF getestet, zunächst nur an 5-MTHF, THF und DHF. Abbildung 19 zeigt die unterschiedlichen Ergebnisse beider Methoden.

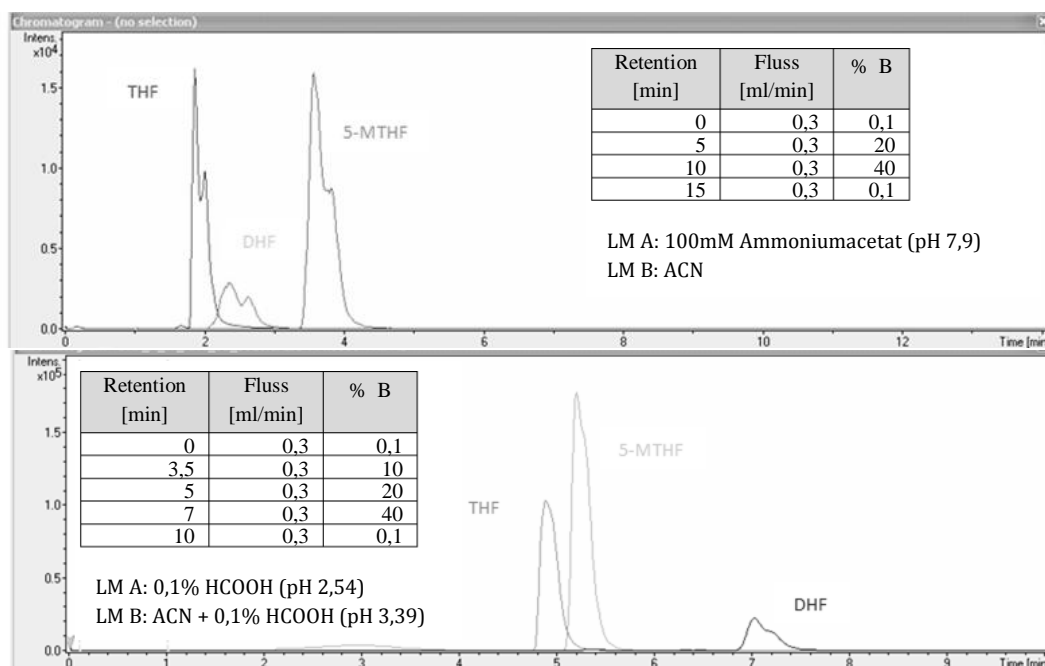


Abbildung 20: Vergleich von Methode 6 und 7

Abbildung 19 zeigt deutlich den Einfluss der unterschiedlichen Laufmittel auf die Auftrennung und Intensität der Peaks. Die Verwendung von 100 mM Ammoniumacetat als Laufmittel hatte zur Folge, dass Doppelpeaks entstanden, was z.B. darauf hindeuten könnte, dass die Säule und das Laufmittel nicht kompatibel sind bzw. dass, der pH-Wert des Laufmittels (pH 7,9) zu wenig sauer war. Die Auftrennung der Peaks, im Vergleich zur Messung mit 0,1% HCOOH als Laufmittel (pH 2,54), stellte sich als nicht optimal heraus.

3.8.2. Vergleich der Intensitäten der Metaboliten im positiven und negativen Ionenmodus (100 mM Ammoniumacetatpuffer)

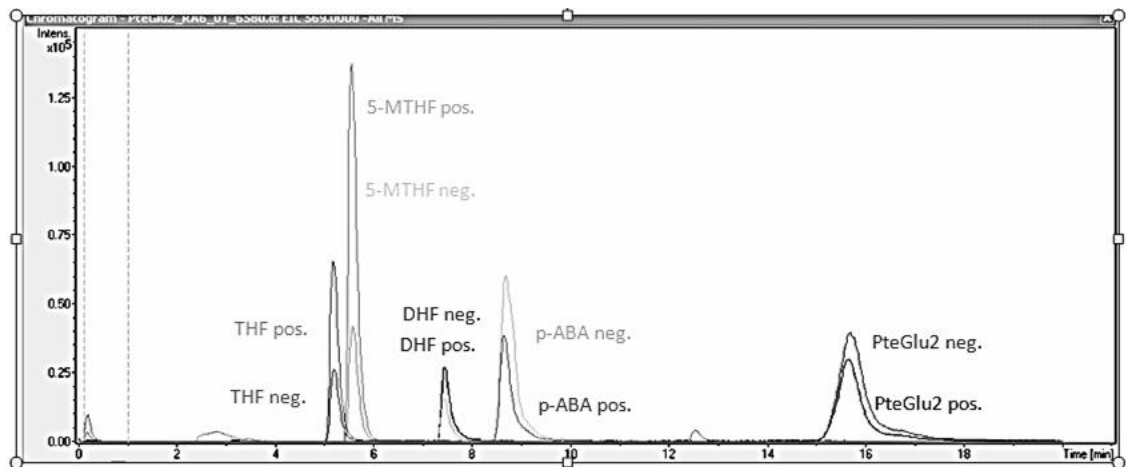


Abbildung 21: Auswirkung der unterschiedlichen Ionenmodi auf die Intensität der Metaboliten

Multi-Step-Gradient:
(5-MTHF, THF, DHF)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
3,5	0,3	10
5	0,3	20
7	0,3	40
10	0,3	0,1

Multi-Step-Gradient:
(p-ABA, PteGlu2, PteGlu3)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
20	0,3	0,1

Tabelle 22: Multi-Step-Gradienten für Messungen mit HPLC-qTOF

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,3 ml/min, Einspritzvolumen: 10 µl, LM A: 0,1% HCOOH, LM B: ACN + 0,1% HCOOH.

Für PteGlu3 konnte kein Peak detektiert werden, selbst nach zahlreichen Versuchen, den Gradienten bzw. den Säulenfluss zu verändern. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des HPLC-triplequadrupole, konnten für 5-MTHF und THF eindeutig höhere Intensitäten im positiven Modus erzielt werden, während sich für DHF, p-ABA sowie PteGlu2 der negative Modus als nicht wesentlich vorteilhafter erwies. Für 5-MTHF und THF war zwischen positivem und negativem Modus ein mehr als doppelt so hoher Intensitätsunterschied festzustellen.

Die verwendeten Gradienten (siehe Tabelle 22) wurden für alle weiteren Messungen beibehalten.

3.8.3. Methode 10: Zusatz von Dimethylhexylamin (DMHA) zur mobilen Phase – (100 mM Ammoniumacetatpuffer, pos. und neg. Modus)

In Anlehnung an die Studie von GARRAT et. al. 2005, wurde Dimethylhexylamin, anstelle von HCOOH, der mobilen Phase zugesetzt, um die Ionisierung zu verbessern.

Zur Herstellung von Eluent A wurden 10 ml Methanol (MeOH) und 190 ml HPLC-H₂O vermengt und mit 129 µl DMHA (MW: 129,24 g/mol) versetzt. Um den pH-Wert von 8,1 (laut GARRAT et. al. 2005) zu erhalten, wurde mittels Pasteurpipette tropfenweise HCl hinzugefügt. Eluent B setzte sich aus 200 ml MeOH, 129 µl DMHA sowie HCl (bis zum Erreichen von pH 8,1) zusammen.

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,3 ml/min, Einspritzvolumen: 10 µl, Gradientenelution für 5-MTHF, THF und DHF 10 min, für p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 20 min.) – Laufmittel A: MeOH:H₂O (5:95, v/v) + 5mM DMHA (pH 8,1), Laufmittel B: MeOH + 5mM DMHA (pH 8,1).

Da mit dieser Methode keine Peaks für PteGlu2 und PteGlu3, sowie für 5-MTHF, THF, DHF und p-ABA deutlich breitere Peaks erhalten wurden, kamen nur mehr 0,1% HCOOH und ACN als Laufmittel zum Einsatz.

3.8.4. Vergleich der Intensitäten der Metaboliten in unterschiedlichen Pufferlösungen (positiver Ionenmodus)

Wie bereits unter 3.7.10 (Methode 9) erwähnt, konnten die zu Beginn erhobenen Befürchtungen, in Bezug auf die Ablagerung der Phosphate, durch die Möglichkeit der Ableitung von unerwünschten Substanzen, entkräftet werden. Da sich DHF zwischen- durch immer wieder sehr schlecht im 100 mM Ammoniumacetatpuffer auflöste, musste ein weiterer Puffer getestet werden, um diese Problematik zu umgehen.

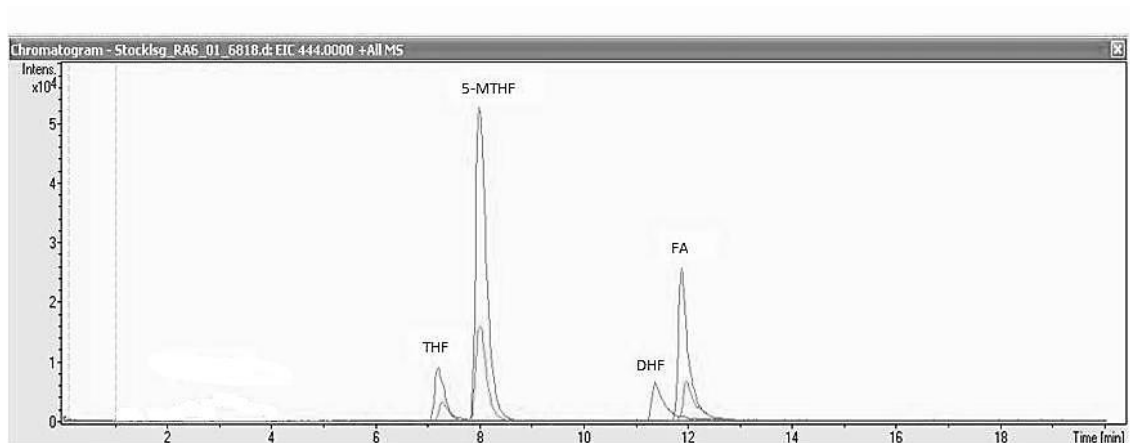


Abbildung 22: Vergleich von Ammoniumacetatpuffer und Phosphatpuffer (K₂HPO₄)(pos. Modus)

Abbildung 22 zeigt den Vergleich der Ergebnisse für 5-MTHF, THF, DHF sowie Folsäure (FA), gelöst in 100mM Ammoniumacetatpuffer (kleinerer Peak) und 50mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffer (größerer Peak). Da sich die Metaboliten im K_2HPO_4 -Puffer besser gelöst haben als im Ammoniumacetatpuffer und eindeutig höhere Intensitäten erreicht wurden, ersetzte der K_2HPO_4 -Puffer den zuletzt verwendeten Puffer. Für DHF konnte nur ein Peak (Phosphatpuffer) erhalten werden.

Puffer:		
50	mM	K_2HPO_4
1	%	Ascorbinsäure
0,2	%	2-Mercaptoethanol
1	%	DTT

Tabelle 23: 50 mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffer

Die Einwaage von 870,0 mg K_2HPO_4 (MW: 174,18 g/mol) wurde in einem Messkolben mit 100 ml HPLC-Wasser gelöst. Des Weiteren wurde der Puffer mit 1,003 g Ascorbinsäure, 200 μ l MCE sowie 1 ml DTT versetzt, was einer 49,95 millimolaren Ammoniumacetatlösung entspricht.

Die Löslichkeit von DHF in der Pufferlösung konnte zusätzlich verbessert werden, indem nach dem Einwiegen in ein Wiegeschiffchen, die teilweise sehr körnige Substanz, mit einem Glasstab pulverisiert wurde.

3.9. Blutaufbereitungsmethoden:

Um die in wässrigen Lösungen entwickelten Methoden auch für Erythrozyten anzuwenden, mussten vor der Analyse mit LC-MS, nach ausgiebiger Literaturrecherche, die roten Blutkörperchen aufbereitet werden.

Nach der Methode von NELSON et. al. 2004, bei der 500 µl der Serumprobe mit 10% Ascorbinsäurelösung vermengt und nach dem Vortexen 10 µl 50% Metaphosphorsäure zur Fällung der Proteine zugesetzt wurde, konnte für die Erythrozyten kein optimales Resultat erzielt werden. Im Vergleich zum Serum, weisen rote Blutkörperchen eine zähe Konsistenz auf, die ein Pipettieren anhand dieser Methode unmöglich machten.

Ein weiterer Versuch eine geeignete Aufarbeitungsmethode für Erythrozyten zu finden, missglückte aufgrund der un schlüssigen Aufarbeitungsschritte in der Studie von SANA et. al. 2008. Es konnte nicht eindeutig herausgefunden werden, ob es sich bei den verwendeten biologischen Proben um Erythrozyten oder um Vollblutproben handelte, da zwar einerseits in der Aufarbeitung von Erythrozyten geschrieben wurde, jedoch die Aufarbeitungsschritte, wie z.B. Zentrifugieren und Abnehmen des Überstands ohne rote Blutkörperchen zu entfernen, für Vollblutproben treffender sind.

3.9.1. Blutaufbereitungsmethode 1: Methanol, Ethanol, Methanol-Chloroform

ZHANG et. al. 2008 haben sich ebenso wie SANA et. al. 2008 mit der Erforschung der Metaboliten in Erythrozyten beschäftigt, jedoch zeigten ZHANG et. al. 2008 eine ausführlichere und übersichtlichere Aufarbeitung auf.

	Methanol (µl)	Ethanol (µl)	Chloroform (µl)	Erythrozyten (mg)	H ₂ O (µl)
1	900	0	0	50	50
2	700	0	200	50	50
3	0	700	200	50	50

Tabelle 24: Auszug aus dem Pipettierschema [modifiziert nach ZHANG et. al. 2009]

Insgesamt führten ZHANG et. al. 2008 27 verschiedene Versuche mit fünf verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, Chloroform, Aceton und Isopropanol) durch, wobei die beste Effizienz zur Extrahierung der Metaboliten aus den roten Blutkörperchen durch Methanol-Chloroform-Wasser (siehe Tabelle 24, Versuch 2) erzielt wurde.

Die Aufarbeitung der Erythrozyten wurde zunächst mit MeOH-H₂O und MeOH-Chloroform-H₂O, anhand des Aufarbeitungsschemas aus Tabelle 25, durchgeführt.

50 mg Erythrozyten (Hämolyse)
+ 50 µl H ₂ O
+ 100 µl 5-MTHF-Lösung
vortexen, 15 sec, 2400 U/min.
+ 900 µl MeOH (oder + 700 µl MeOH + 200 µl Chloroform)
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 11.000 rpm
→ 100 µl Überstand in ein neues Eppendorf-Vial
→ im Konzentrator einengen (1 h)
→ in 100 µl MeOH-H ₂ O (700:50, v/v) lösen
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 11.000 rpm
Überstand in ein HPLC-Vial, mit Argon begasen und messen (HPLC-MS triplequadrupole)

Tabelle 25: Aufarbeitungsschema anhand zwei verschiedener Methoden

50 mg Erythrozyten wurden in ein Eppendorf-Vial eingewogen, mit 50 µl HPLC-Wasser versetzt und gevortext, wodurch ein Aufplatzen der Erythrozyten, eine sogenannte Hämolyse erfolgte, sofern das Aufplatzen nicht bereits durch das Einfrieren erreicht wurde. Wie bereits unter 2.8.2. erwähnt, kann eine Hämolyse sowohl durch Zusatz von Wasser als auch durch wässrige Ascorbinsäure erreicht werden. Der Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt, daher wurde einem Eppendorf-Vial 900 µl Methanol, dem anderen 700 µl Methanol und 200 µl Chloroform zugesetzt. Beiden Eppendorf-Vials wurden je 100 µl einer 5-MTHF-Lösung (Konzentration: 0,5 mg/100 ml) zugesetzt, bevor sie für 15 min zentrifugiert wurden. Diese 5-MTHF-Lösung sollte aufzeigen, ob durch die Aufarbeitungsschritte Metaboliten, in diesem Fall 5-MTHF, verlo-

ren gehen oder ob es sich um eine optimale Methode zur Messung der Erythrozyten handelt.

Nach dem Zentrifugieren wurden je 100 µl Überstand in neue Eppendorf-Vials pipettiert, anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur konzentriert und die erhaltenen Rückstände in 100 µl einer Lösung bestehend aus Methanol-H₂O gelöst, bevor sie weitere 15 min bei 11.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden in HPLC-Vials pipettiert und mit LC-MS-triplequadrupole gemessen.

Da untersucht werden sollte, ob auch in Erythrozyten noch Reste der Pteroylpolyglutamathydrolase vorhanden waren, welche die in Erythrozyten vorherrschenden 5-MTHF Polyglutamate zu 5-MTHF Monoglutamate abbauen [PFEIFFER und GREGORY, 1996], wurde dieselbe Methode angewendet, die auch für 5-MTHF und p-ABA zum Einsatz kam (siehe Tabelle 21).

Das Ergebnis dieser Messung war leider wenig zufriedenstellend, da zwar Peaks für 5-MTHF gefunden wurden, es sich aber der Intensität nach, lediglich um die hinzugefügte 5-MTHF-Lösung handeln konnte, da für alle Messungen, annähernd dieselben Mengen detektiert wurden. Allerdings konnte gezeigt werden (siehe Tabelle 26 und Abbildung 23), dass durch die Aufarbeitungsschritte keine Metaboliten verloren gehen.

Da keinerlei Unterschiede in der Aufbereitung zwischen Methanol und dem Methanol-Chloroform-Gemisch festzustellen waren, wurde Methanol als Lösungsmittel ausgewählt. Anstelle von Methanol-Chloroform kam der 50 mM K₂HPO₄-Puffer zum Einsatz, da sich, wie schon unter 3.8.4 erwähnt, eine gute Löslichkeit der Metaboliten in diesem Puffer zeigte.

3.9.2. Blutaufbereitungsmethode 2: Methanol, K₂HPO₄-Puffer

Um festzustellen, ob in den Erythrozyten entweder kein 5-MTHF bzw. keine Pteroylpolyglutamathydrolase vorhanden oder die enthaltene Menge an 5-MTHF in den Erythrozyten zu gering war, wurden weitere Versuche durchgeführt. Anhand von Tabelle 26 ist zu erkennen, dass vier verschiedene Möglichkeiten, jeweils im Doppelansatz (a,b), er-

probt wurden. Die Erythrozyten für diese Messungen stammten alle von ein und demselben Probanden.

		1 (a,b)	2 (a,b)	3 (a,b)	4 (a,b)
Erythrozyten (µl)	(Hämolyse)	-	60	60	-
H ₂ O (µl)		50	50	50	50
5-MTHF-Lsg. (µl)		60	-	60	60
vortexen, 15 sec., 2400 U/min.					
MeOH (µl)		900	900	840	-
K ₂ HPO ₄ -Puffer (µl)		-	-	-	900
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 12.000 rpm					
100 µl Überstand in neues Eppendorf-Vial + konzentrieren (1 h)					
in 100 µl K ₂ HPO ₄ -Puffer (50mM) lösen					
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 12.000 rpm					
Überstand in ein HPLC-Vial, mit Argon begasen und messen (HPLC-MS triplequadrupole)					

Tabelle 26: Aufarbeitungsschema anhand zwei neuer Methoden

Anstelle von 100 µl 5-MTHF-Lösung wurden nunmehr 60 µl zugesetzt, um jeweils ein einheitliches Endvolumen von 1,01 ml zu erhalten. Versuch 1 und 4 waren bis auf das Lösungsmittel ident.

Versuch 2 hingegen enthielt Erythrozyten und H₂O, dafür aber keine 5-MTHF-Lösung, während Versuch 3 sowohl aus Erythrozyten, als auch aus 5-MTHF-Lösung und H₂O bestand.

Von diesem Aufarbeitungsschema wurde erwartet, dass durch Versuch 1, 2 und 4 annähernd dieselben Ergebnisse erhalten werden, da entweder 60 µl 5-MTHF-Lösung (Versuch 1 und 4) oder 60 µl Erythrozyten (Versuch 2) enthalten waren. Der Peak aus Versuch 3 sollte deutlich größer sein, da sich dieser Versuch aus 60 µl Erythrozyten und 60 µl 5-MTHF-Lösung zusammensetzte.

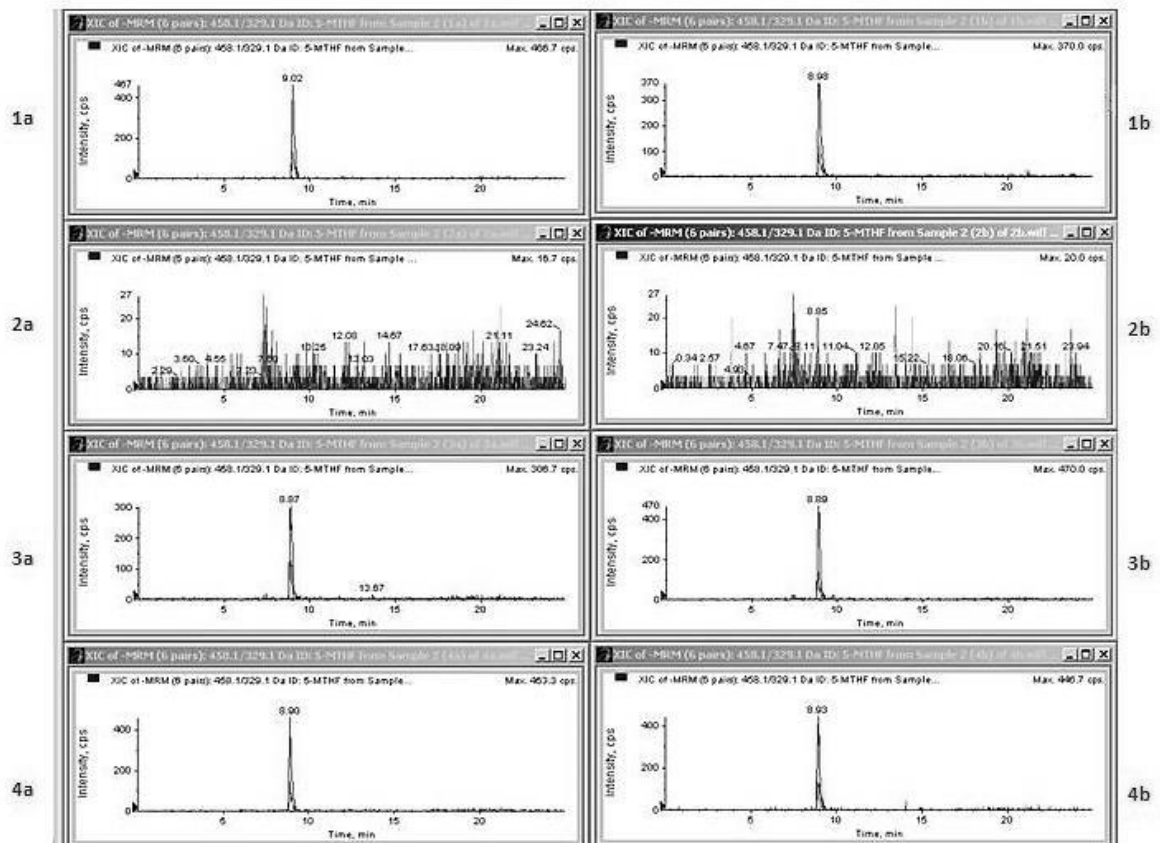


Abbildung 23: Ergebnis der Aufbereitung der Erythrozyten

Das Ergebnis entsprach jedoch nicht den erwarteten Werten. Durch Abbildung 23 ist deutlich zu erkennen, dass sich der 50 mM K_2HPO_4 -Puffer am besten zur Aufarbeitung der Erythrozyten und für ein reproduzierbares Ergebnis eignet, da sowohl Versuch 4a als auch Versuch 4b übereinstimmende Resultate zeigten. Die Proben für Versuch 1 und 3 wurden mit Methanol aufgearbeitet, das zu Schwankungen der Intensität des gesuchten Metaboliten und somit keinem reproduzierbarem Ergebnis führte. Aufgrund der Resultate aus Versuch 2, konnte wiederum nicht festgestellt werden, ob bzw. wie viel 5-MTHF in den Erythrozyten vorhanden war.

Angeichts der annähernd selben Werte für Versuch 1, 3 und 4, sowie für die 5-MTHF-Lösung ohne Aufarbeitung, konnte wiederum bestätigt werden, dass durch die Aufarbeitungsschritte kaum Metaboliten verloren gehen. Daher musste nach einem anderen Grund für die unbefriedigenden Ergebnisse gesucht werden.

3.9.3. Blutaufbereitungsmethode 3: K_2HPO_4 , Erhöhung des Überstandsvolumens

Anstelle von 100 μ l Überstand wurde versucht, durch Einengen im Eppendorf Konzentratoren von 500 μ l, 600 μ l und 700 μ l Überstand, die Menge bzw. Konzentration an Erythrozyten und somit auch der Metaboliten zu erhöhen. Außerdem wurde Methanol als Lösungsmittel gänzlich durch den 50 mM K_2HPO_4 -Puffer abgelöst, was aber den erhofften Erfolg ausbleiben ließ. Zusätzlich wurden noch die Proben von drei weiteren Probanden aufgearbeitet und gemessen, um sicher zu gehen, dass nicht die zuerst gemessene Probe fehlerhaft war.

3.9.4. Blutaufbereitungsmethode 4: Dekonjugation der 5-MTHF-Polyglutamate durch Aktivierung der Pteroylpolyglutamathydrolase

Wie bereits unter 3.9.1. erwähnt, konnten PFEIFFER und GREGORY in ihrer 1996 veröffentlichten Studie aufzeigen, dass praktisch alle Folate, die in den roten Blutkörperchen vorkommen, 5-MTHF Polyglutamate sind.

Um 5-MTHF in Erythrozyten nachzuweisen, müssen die 5-MTHF-Polyglutamate vor der Messung dekonjugiert werden. Dies wurde in der Studie durch eine 1:10 Verdünnung der Vollblutproben mit 50 mM Natriumascorbat oder 57 mM Ascorbinsäurelösung (10 g/L), und einer Inkubation für 90 min bei 37 °C, wodurch die Pteroylpolyglutamathydrolase aktiviert wird, erreicht [PFEIFFER und GREGORY, 1996].

Da es sich bei unseren Proben jedoch nicht um Vollblut sondern um Erythrozyten handelte, war es daher schwierig abzuschätzen, ob der von PFEIFFER und GREGORY 1996 durchgeführte Versuch, auch für rote Blutkörperchen übertragbar war.

Die bereits zuvor durchgeführten Messungen der Erythrozyten zeigten keinen Erfolg, daher wurden die Proben von vier verschiedenen Probanden jeweils im Doppelansatz aufgearbeitet, wobei ein Teil der Proben vor der der Aufbereitung für 90 Minuten auf 37 °C erhitzt wurde, um die möglicherweise zum Teil noch enthaltene Pteroylpolyglutamathydrolase zu aktivieren.

		1	2	3	4
Erythrozyten (µl)	(Hämolyse)	60	60	60	60
H ₂ O (µl)		50	50	50	50
vortexen, 15 sec., 2400 U/min.					
K ₂ HPO ₄ -Puffer (µl)		900	900	900	900
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 12.000 rpm					
700 µl Überstand in neues Eppendorf-Vial + konzentrieren (2 h)					
in 100 µl K ₂ HPO ₄ -Puffer (50mM) lösen					
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 12.000 rpm					
Überstand in ein HPLC-Vial, mit Argon begasen und messen (HPLC-MS triplequadrupole)					

Tabelle 27: Aufbereitungsschema für Methode nach PFEIFFER und GREGORY 1996

Doch auch diese Messungen konnten keine positiven Ergebnisse liefern.

Wie bereits erwähnt, handelte es sich bei unseren Proben lediglich um Erythrozyten, was darauf schließen lässt, dass selbst durch Erhitzen keine Hydrolase aktiviert werden kann, da vermutlich keine endogene Pteroylpolyglutamathydrolase enthalten war.

Des Weiteren wurde den Erythrozyten Plasma zugegeben und für 90 Minuten auf 37 °C erhitzt, um die Plasma-Pteroylpolyglutamathydrolase zu aktivieren.

		1	2	3	90 min, 37°C inkubieren
Erythrozyten (µl)	(Hämolyse)	60	60	60	
H ₂ O (µl)		50	50	50	
Plasma (µl)		50	50	50	
vortexen, 15 sec., 2400 U/min.					
K ₂ HPO ₄ (µl)		900	900	900	
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 12.000 rpm					
700 µl Überstand in neues Eppendorf-Vial + konzentrieren (2 h)					
in 100 µl K ₂ HPO ₄ -Puffer (50mM) lösen					
15 min. bei 4 °C zentrifugieren, 12.000 rpm					
Überstand in ein HPLC-Vial, mit Argon begasen und messen (HPLC-MS triplequadrupole)					

Tabelle 28: Aufbereitungsschema mit Zusatz von Plasma (nach GREGORY und PFEIFFER 1996)

Das Ergebnis brachte jedoch auch nicht den erhofften Erfolg, weshalb nach weiteren Möglichkeiten gesucht wurde.

Da im Plasma vorwiegend Folat-Monoglutamate, in Form von 5-MTHF, vorliegen, wurde als nächster Schritt eine Messung der Plasmaproben, in Anlehnung an NELSON et. al. 2004, durchgeführt. Dazu wurde je Eppendorf-Vial 500 µl Plasma vorgelegt, mit 500 µl Ascorbinsäurelösung (10%ig) versetzt, begast und gevortext. Der Versuch wurde mit drei verschiedenen Plasmaproben durchgeführt. Nach einer 15 minütigen Equilibrierung auf Eis, wurden den Lösungen je 10 µl einer meta-Phosphorsäure (50%ig) zugesetzt und erneut gevortext, um die vorhandenen Proteine zu fällen. Bei 5 °C und 12.000 rpm wurden die Proben anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand von 650 µl wurde in ein neues Eppendorf-Vial pipettiert, mit 375 µl der 50 mM K_2HPO_4 -Lösung versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur konzentriert. Der Rückstand wurde in 100 ml 50 mM K_2HPO_4 -Puffer gelöst, in ein HPLC-Vial überführt, mit Argon begast und mittels HPLC-triplequadrupole gemessen.

Doch auch im Plasma konnte kein 5-MTHF nachgewiesen werden, weshalb die Vermutung sehr nahe lag, dass entweder die passende Aufarbeitungsmethode noch nicht gefunden wurde, oder die Qualität der Proben durch die Lagerung Einbußen erlitt.

4. ERGEBNISSE

Sowohl mit HPLC-triplequadrupole als auch mit HPLC-qTOF wurden für 5-MTHF, THF, DHF, p-ABA und PteGlu2, die gerätespezifischen Nachweisgrenzen bestimmt.

Um eine Substanz in einer Probe nachweisen zu können, muss zwischen Peakhöhe und dem Signalrauschen ein merklicher Unterschied erkennbar sein. Die Nachweisgrenze bzw. Lower Limit of Detection (LLOD) wird häufig als ein Signal-Rausch-Verhältnis $(S/N) > 3$ und die Bestimmungsgrenze bzw. Lower Limit of Quantification (LLOQ) als $S/N > 10$ angegeben. Die Abweichung zwischen dem niedrigsten und höchsten Messsignal, im peaklosen Bereich des Chromatogramms, wird als Rauschen bezeichnet [DE BROUWER et. al., 2008; LIANG et. al., 2009; KROMIDAS und KUSS, 2008].

Zur Ermittlung der linearen Standardgeraden und der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Metaboliten mittels HPLC-triplequadrupole, wurden folgende Gradienten, Laufmittel und Einstellungen verwendet:

Multi-Step-Gradient:
(5-MTHF, p-ABA)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
14,5	0,3	95
18,5	0,3	95
19	0,3	0,1
25	0,3	0,1

Multi-Step-Gradient:
(THF, DHF)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
20	0,3	0,1

Multi-Step-Gradient:
(PteGlu2)

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
14,5	0,3	95
28	0,3	95
28,5	0,3	0,1
35	0,3	0,1

Tabelle 29: Gradienten zur Messung der Verdünnungsreihe (HPLC-triplequadrupole)

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,3 ml/min, Einspritzvolumen: 5 µl, Laufmittel A: 0,1% HCOOH, Laufmittel B: ACN + 0,1% HCOOH. 5-MTHF, THF, DHF – neg. Modus, p-ABA, PteGlu2 – pos. Modus.

Retentionszeiten, Massenzahlen und intensivste Ionenübergänge wurden für jeden einzelnen Metaboliten bestimmt (HPLC-triplequadrupole):

- 5-MTHF: 8,99 min; 458,1/329,1
- THF: 7,67 min; 443,9/315,1
- DHF: 12,36 min; 441,9/176,0
- p-ABA: 8,76 min; 267,3/120,1
- PteGlu2: 14,16 min; 571,4/295,0

Um die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für HPLC-qTOF zu ermitteln, wurde folgender Gradient im positiven Modus zur Messung der fünf Metaboliten verwendet:

Multi-Step-Gradient:

Retention [min]	Fluss [ml/min]	% B
0	0,3	0,1
7	0,3	10
10	0,3	20
14	0,3	40
20	0,3	0,1

Tabelle 30: Gradient zur Messung der Verdünnungsreihe (HPLC-qTOF)

Weitere Einstellungen:

Temperatur des Säulenofens: 30 °C, Säulenfluss: 0,3 ml/min, Einspritzvolumen: 10 µl, Laufmittel A: 0,1% HCOOH, Laufmittel B: ACN + 0,1% HCOOH.

Die jeweiligen Retentionszeiten und Massenzahlen wurden auch für HPLC-qTOF für jeden einzelnen Metaboliten bestimmt:

- 5-MTHF: 7,9 min; 460,185
- THF: 7,1 min; 446,157
- DHF: 11,2 min; 444,157
- p-ABA: 7,9 min; 267,096
- PteGlu2: 12,8 min; 571,182

4.1. Standardgeraden (HPLC-triplequadrupole) und Ermittlung der Nachweisgrenzen

Eine Verdünnungsreihe beginnend mit der Konzentration von 1 mg/100 ml bis hin zu 0,025 mg/100 ml wurde für alle fünf Metaboliten erstellt, die anhand einer linearen Regression durch den Nullpunkt ausgewertet wurde. Verdünnt wurde jeweils von der Stammlösung ausgehend, um eine eventuelle Fehlerquelle innerhalb der Verdünnungsreihe auszuschließen.

Die Stammlösung wurde jeweils aus 1 mg des Metaboliten, gelöst in 100 ml des 50 mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffers hergestellt. 1 % Ascorbinsäure, 0,2 % 2-Mercaptoethanol sowie 1 % DTT wurden, wie in Tabelle 23 ersichtlich, dem K_2HPO_4 -Puffer zur Stabilisierung der Folate, zugefügt. Tabelle 31 zeigt das Pipettierschema für die Verdünnungsreihe. Das Endvolumen lag für alle Verdünnungsschritte bei 1000 μ l.

Für jeden Metaboliten wurden zwei Messungen, an unterschiedlichen Tagen, mit denselben Proben durchgeführt, welche stets nach der ersten Messung mit Argon begast, und im Tiefkühlschrank gelagert wurden, was der Überprüfung der Reproduzierbarkeit diente. Für die Analyse der Messstreuung innerhalb einer Verdünnungsstufe bzw. für die statistischen Auswertungen, wurden für jede Konzentration drei aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt.

Verdünnung	Konzentration		Stammlösung [μ l]	HPLC-Wasser [μ l]
	[mg/100 ml]	[mg/ml]		
1:2	0,5	0,005	500	500
1:10	0,1	0,001	100	900
1:20	0,05	0,0005	50	950
1:40	0,025	0,00025	25	975
1:80	0,0125	0,000125	12,5	987,5
1:100	0,01	0,0001	10	900

Tabelle 31: Pipettierschema für Verdünnungsreihen (HPLC-triplequadrupole)

Da nach den ersten Messungen von 5-MTHF, DHF, p-ABA und PteGlu2 deutlich zu sehen war, dass die Nachweisgrenze noch nicht erreicht war, wurde die Verdünnungsreihe für diese vier Substanzen um zwei weitere Verdünnungsschritte, 1:80 und 1:100, erweitert, um eine Nachweisgrenze für die erwähnten Metaboliten zu erhalten (siehe Tabelle 31 bzw. jeweils bei Punkt LOD/LOQ der entsprechenden Metaboliten).

4.1.1. 5-MTHF: Messergebnisse

In Tabelle 32 und 33, werden die Messergebnisse von 5 MTHF beginnend bei der Stammlösung bis zu einer Verdünnung von 1:40 dargestellt. 5 MTHF 1 zeigt die ersten Messungen der Proben, wohingegen 5 MTHF 2 die zweiten Messungen derselben Proben nach 48 Stunden Lagerung bei -18°C veranschaulicht. Bei Betrachtung der Messwerte von 5-MTHF 1 und 5-MTHF 2, scheint die Reproduzierbarkeit gegeben zu sein, wobei aber deutlich zu erkennen ist, dass die Konzentrationen bzw. Intensitäten der Metaboliten ab der Verdünnung von 1:10 abnehmen. Je niedriger konzentriert die Proben sind, desto ungenauer die Ergebnisse.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	5-MTHF 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,020	0,968	6,09E+05	94,9
2	Stammlösung	1,020	1,100	6,91E+05	108,0
3	Stammlösung	1,020	0,960	6,04E+05	94,1
4	1:2	0,510	0,503	3,17E+05	98,6
5	1:2	0,510	0,540	3,40E+05	106,0
6	1:2	0,510	0,536	3,37E+05	105,0
7	1:10	0,102	0,132	8,31E+04	129,0
8	1:10	0,102	0,138	8,68E+04	135,0
9	1:10	0,102	0,140	8,82E+04	137,0
10	1:20	0,051	0,0259	1,63E+04	50,7
11	1:20	0,051	0,0664	4,18E+04	130,0
12	1:20	0,051	0,0618	3,89E+04	121,0
13	1:40	0,0255	0,0321	2,02E+04	126,0
14	1:40	0,0255	0,0265	1,67E+04	104,0
15	1:40	0,0255	0,0283	1,78E+04	111,0

Tabelle 32: Auswertung 5-MTHF 1

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	5-MTHF 2		Genauigkeit [%]
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	
1	Stammlösung	1,020	1,010	5,29E+05	98,8
2	Stammlösung	1,020	1,090	5,73E+05	107,0
3	Stammlösung	1,020	1,040	5,46E+05	102,0
4	1:2	0,510	0,422	2,16E+05	82,8
5	1:2	0,510	0,431	2,20E+05	84,4
6	1:2	0,510	0,522	2,69E+05	102,0
7	1:10	0,102	0,0929	3,92E+04	91,1
8	1:10	0,102	0,105	4,58E+04	103,0
9	1:10	0,102	0,100	4,30E+04	98,0
10	1:20	0,051	0,0492	1,58E+04	96,5
11	1:20	0,051	0,052	1,73E+04	102,0
12	1:20	0,051	0,0527	1,76E+04	103,0
13	1:40	0,0255	0,0341	7,67E+03	134,0
14	1:40	0,0255	0,0318	6,42E+03	125,0
15	1:40	0,0255	0,034	7,61E+03	133,0

Tabelle 33: Auswertung 5-MTHF 2

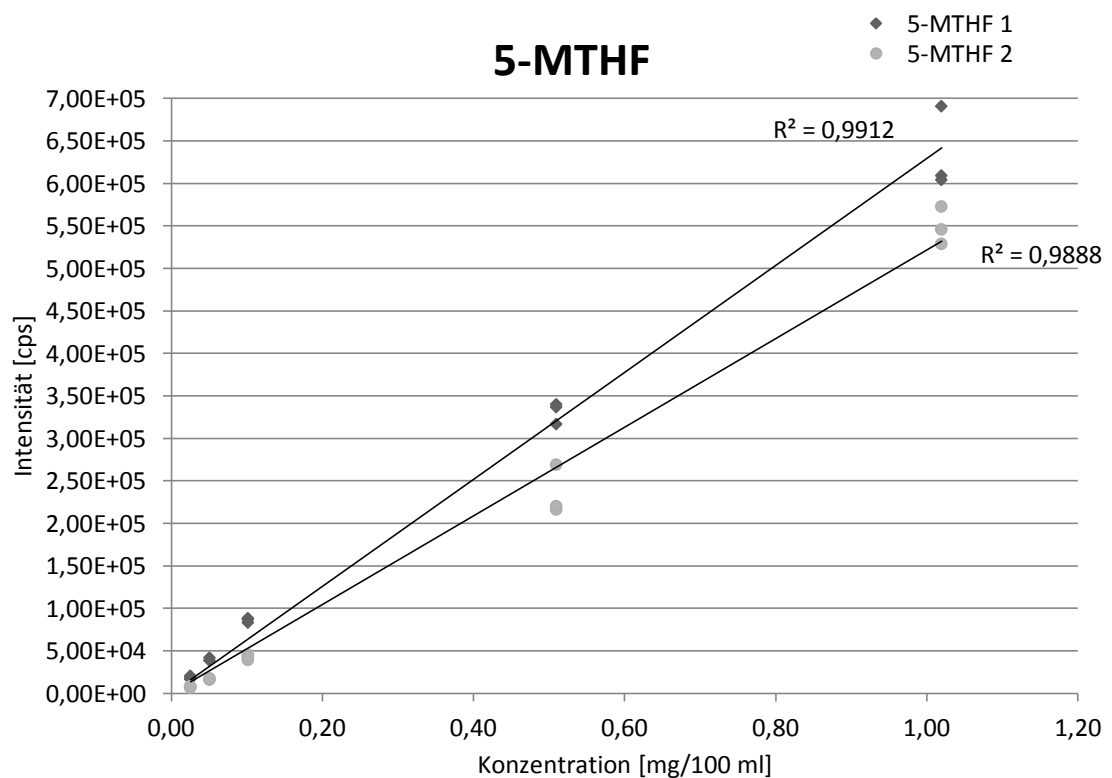


Abbildung 24: Standardgeraden 5-MTHF

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, liegt das Bestimmtheitsmaß (r^2) für 5-MTHF 1 bei 0,9912, für 5-MTHF 2 bei 0,9888, was eine annähernd lineare Verteilung der Messwerte bedeutet. Für r^2 können Werte von 0 bis 1 angenommen werden. Je näher r^2 bei 1 liegt, desto größer ist der lineare Zusammenhang zwischen den einzelnen Messwerten. Dies unterstreicht die aus Tabelle 32 und 33 ersichtlichen Ergebnisse.

4.1.2. 5-MTHF: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Wie bereits unter 4.1. erwähnt, lag die 1:40 Verdünnung weit über der Nachweisgrenze, weshalb weiter zwei weitere Verdünnungsschritte durchgeführt wurden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	5-MTHF		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
16	1:80	0,0127	0,0032	1,99E+04	24,8
17	1:80	0,0127	0,0027	1,72E+04	21,5
18	1:80	0,0127	0,0027	1,68E+04	21,1
19	1:100	0,0102	0,00003	1,75E+01	0,27
20	1:100	0,0102	0,0026	1,60E+03	24,9
21	1:100	0,0102	0,0022	1,38E+03	21,5

Tabelle 34: Auswertung 5-MTHF (1:80 bis 1:100)

Aus Tabelle 34 lässt sich eine sehr niedrige Wiederfindungsrate, von durchschnittlich 19,1 %, für die Messungen 16 – 21 erkennen. Der Grund dafür könnte in der Löslichkeit der Substanz, Fehler beim Einwiegen bzw. Herstellen der Lösungen oder aber auch beim Messgerät selbst liegen.

Bei einer Verdünnung von 1:100, was einer Konzentration von 0,00259 mg/100 ml entspricht, ergibt sich ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von ca. 10, wodurch ein LOQ von 10:1 angegeben werden kann. Somit kann auf ein LOD von etwa 3:1 geschlossen werden.

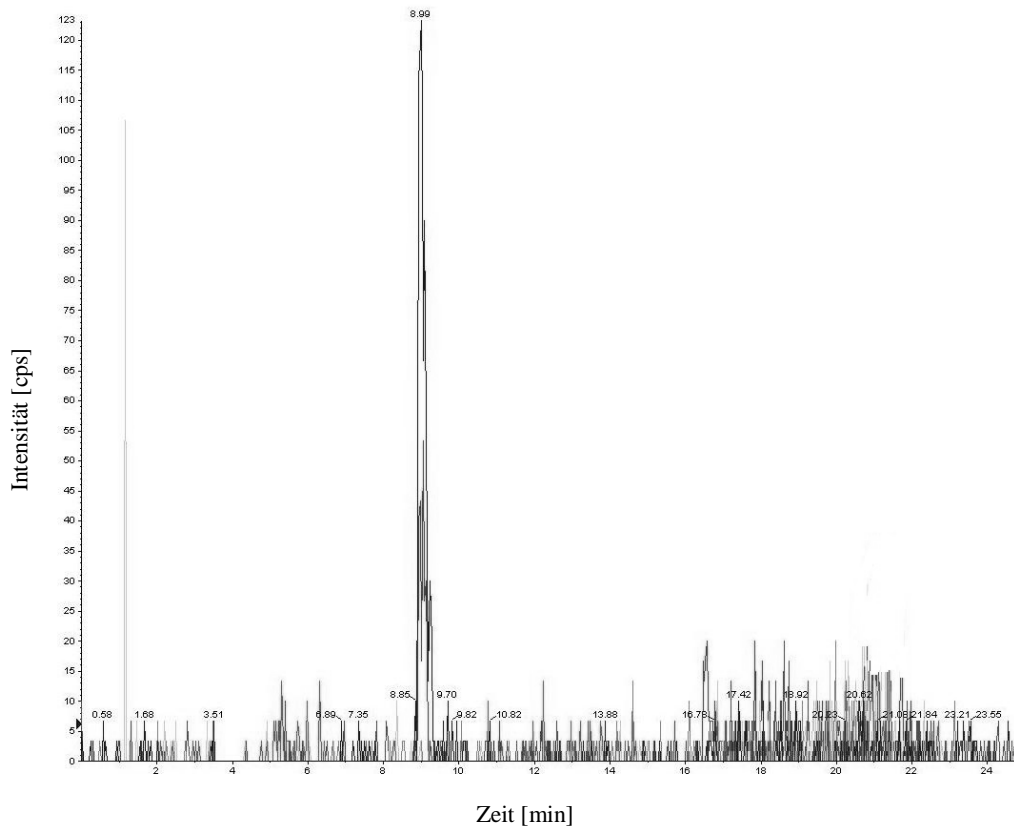


Abbildung 25: 5-MTHF (1:100)

4.1.3. THF: Messergebnisse

Tabelle 35 und 36 zeigen die Messergebnisse von THF beginnend bei der Stammlösung bis zu einer Verdünnung von 1:40. THF 1 zeigt wiederum die erste Messung der Proben, wohingegen THF 2 die zweite Messung derselben Proben nach 24-stündiger Lagerung bei -18°C darstellt. Die Reproduzierbarkeit ist auch für THF gegeben, wobei eindeutig zu erkennen ist, dass die Konzentrationen bzw. Intensitäten der Metaboliten bis zur 1:2 Verdünnung, bis auf einen Ausreißer beim ersten Durchgang in Messung 6, relativ konstant sind.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	THF1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,070	1,000	2,70E+05	93,8
2	Stammlösung	1,070	1,090	2,95E+05	102,0
3	Stammlösung	1,070	1,120	3,02E+05	104,0
4	1:2	0,535	0,530	1,38E+05	99,1
5	1:2	0,535	0,544	1,42E+05	102,0
6	1:2	0,535	0,274	6,60E+04	51,3
7	1:10	0,107	0,0899	1,43E+04	84,0
8	1:10	0,107	0,0877	1,37E+04	82,0
9	1:10	0,107	0,0869	1,34E+04	81,2
10	1:20	0,0535	0,0568	5,00E+03	106,0
11	1:20	0,0535	0,0594	5,73E+03	111,0
12	1:20	0,0535	0,0577	5,27E+03	108,0
13	1:40	0,0267	0,0392	7,58E+01	147,0
14	1:40	0,0267	0,0390	7,17E+00	146,0
15	1:40	0,0267	0,0390	1,40E+01	146,0

Tabelle 35: Auswertung THF 1

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	THF 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,070	1,040	2,61E+05	96,9
2	Stammlösung	1,070	1,160	2,92E+05	108,0
3	Stammlösung	1,070	0,973	2,45E+05	91,0
4	1:2	0,535	0,543	1,35E+05	101,0
5	1:2	0,535	0,593	1,48E+05	111,0
6	1:2	0,535	0,558	1,40E+05	104,0
7	1:10	0,107	0,107	2,47E+04	100,0
8	1:10	0,107	0,109	2,50E+04	102,0
9	1:10	0,107	0,103	2,35E+04	96,0
10	1:20	0,0535	0,045	8,85E+03	84,2
11	1:20	0,0535	0,047	9,35E+03	87,8
12	1:20	0,0535	0,0488	9,81E+03	91,2
13	1:40	0,0267	0,0194	2,33E+03	72,7
14	1:40	0,0267	0,0189	2,19E+03	70,7
15	1:40	0,0267	0,0176	1,88E+03	66,1

Tabelle 36: Auswertung THF 2

Die Messungen 7 bis 9 (1:10 Verdünnung) zeigen für THF 2, genauere Messwerte als für THF 1. Bei der Verdünnung von 1:20 liegen zwar die Ergebnisse des ersten Messtages sehr nahe bei der Konzentration von 0,0535 mg/100 ml, jedoch zeigen die Ergebnisse für den zweiten Messtag, eine deutliche Abnahme der Konzentration. Je niedriger konzentriert die Proben sind, desto ungenauer wieder die Ergebnisse.

Das Bestimmtheitsmaß für THF 1 liegt bei 0,9616, was vermutlich an dem Ausreißer bei der Konzentration von 0,535 mg/100 ml und der ungenauen Werte in den niedrigen Konzentrationsbereichen liegt. Für THF 2 ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,9904. Die Ergebnisse für den zweiten Messtag von THF zeigen einen besseren linearen Zusammenhang, als die der ersten Messung.

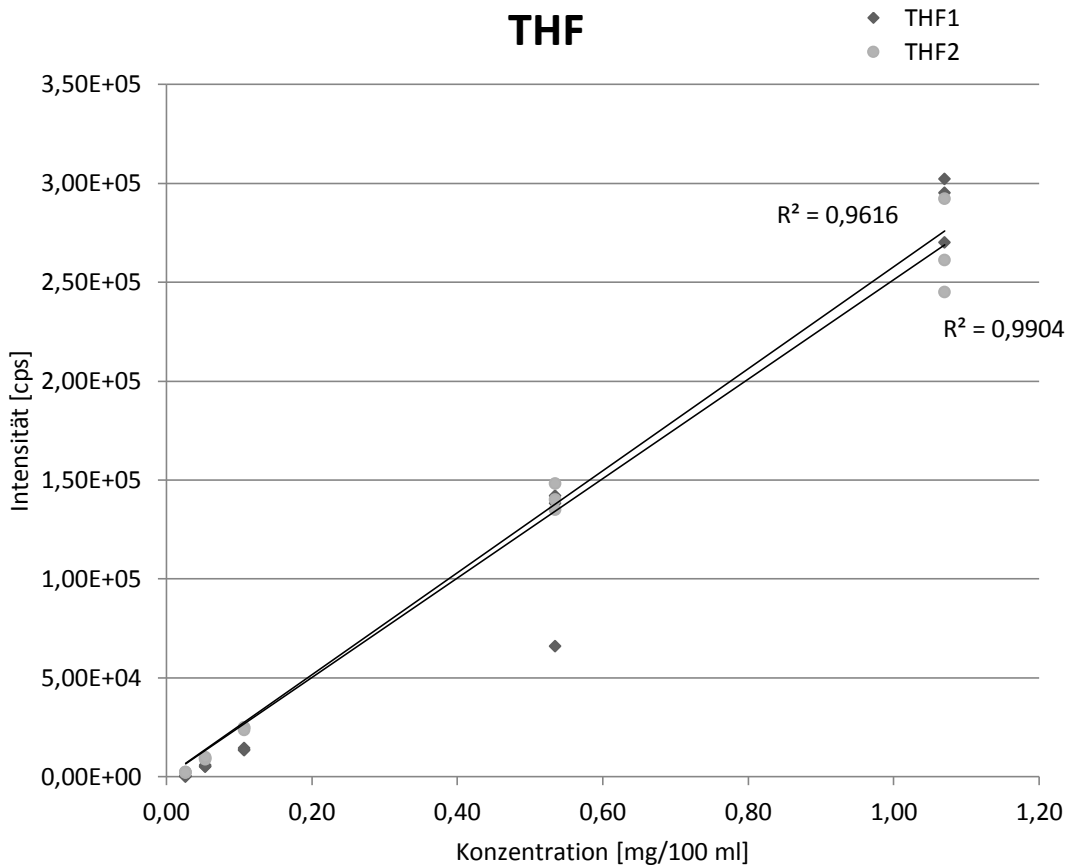


Abbildung 26: Standardgeraden THF

4.1.4. THF: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Auch für THF wurden die Verdünnungsschritte 1:80 und 1:100 gemessen, jedoch konnten keine Peaks mehr detektiert werden, weshalb bei THF nur die Ergebnisse für die Verdünnungen bis 1:40 angegeben sind.

Bei einer Verdünnung von 1:40 (Konzentration: 0,0189 mg/100 ml) ergibt sich ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 10, was einem Limit of Quantification (LOQ) von 10:1 entspricht. Aufgrund dieser Werte, könnte auf ein LOD von 3:1 geschlossen werden.

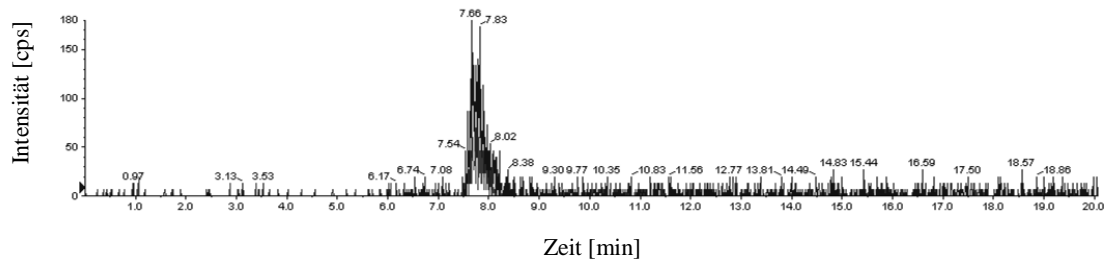


Abbildung 27: THF (1:40)

4.1.5. DHF: Messergebnisse

Tabelle 37 und 38 zeigen die Messergebnisse der Verdünnungsreihe von DHF. Die höchste Konzentration beträgt 1,00 mg/100 ml (Stammlösung), die niedrigste 0,025 mg/100 ml (1:40 Verdünnung). Zwischen dem ersten und zweiten Messdurchgang von DHF liegen 48 Stunden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	DHF 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,00	0,989	8,90E+05	98,9
2	Stammlösung	1,00	0,904	8,13E+05	90,4
3	Stammlösung	1,00	1,040	9,39E+05	104,0
4	1:2	0,50	0,467	4,18E+05	93,4
5	1:2	0,50	0,493	4,42E+05	98,7
6	1:2	0,50	0,469	4,20E+05	93,9
7	1:10	0,10	0,104	9,04E+04	104,0
8	1:10	0,10	0,0953	8,24E+04	95,3
9	1:10	0,10	0,111	9,67E+04	111,0
10	1:20	0,05	0,0541	4,52E+04	108,0
11	1:20	0,05	0,0585	4,92E+04	117,0
12	1:20	0,05	0,0566	4,75E+04	113,0
13	1:40	0,025	0,0277	2,14E+04	111,0
14	1:40	0,025	0,0270	2,07E+04	108,0
15	1:40	0,025	0,0278	2,14E+04	111,0

Tabelle 37: Auswertung DHF 1

Die Messungen und Werte sind auch für DHF im Großen und Ganzen reproduzierbar, wobei deutlich zu sehen ist, dass die Lagerung besonders nachteilige Auswirkungen auf DHF hat. Vergleicht man die Ergebnisse beider Messdurchgänge für die Stammlösung und die 1:2 Verdünnung, lässt sich eine niedrigere Konzentration der Substanzen für DHF 2 feststellen.

Die Werte für die 1:10 und 1:40 Verdünnung sind sowohl für DHF 1, als auch für DHF 2 annähernd gleich stabil. Bei der 1:20 Verdünnung von DHF 2 liegen zwei der drei gemessenen Werte deutlich über der tatsächlichen Konzentration, während für eine Messung keine Konzentration nachgewiesen werden konnte.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	DHF 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,00	0,875	3,34E+05	87,5
2	Stammlösung	1,00	1,080	4,10E+05	108,0
3	Stammlösung	1,00	1,170	4,46E+05	117,0
4	1:2	0,50	0,384	1,07E+04	76,9
5	1:2	0,50	0,406	1,10E+04	81,3
6	1:2	0,50	0,428	1,22E+04	85,7
7	1:10	0,10	0,158	6,57E+04	158,0
8	1:10	0,10	0,109	4,75E+04	109,0
9	1:10	0,10	0,114	4,94E+04	114,0
10	1:20	0,05	0,0737	3,42E+04	147,0
11	1:20	0,05	0,0882	3,96E+04	176,0
12	1:20	0,05	0,0000	0,00E+00	-
13	1:40	0,025	0,0267	1,66E+04	107,0
14	1:40	0,025	0,0264	1,65E+04	106,0
15	1:40	0,025	0,0303	1,80E+04	121,0

Tabelle 38: Auswertung DHF 2

Das Bestimmtheitsmaß für DHF 1 liegt mit 0,9944 sehr viel näher bei einer optimalen linearen Verteilung der Werte, als DHF 2, mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,7244. Anhand von Tabelle 38 lassen sich deutlich die Schwankungen der Messergebnisse mithilfe der Genauigkeit erkennen. Womöglich könnte ein Grund dafür in der schlechten Löslichkeit von DHF liegen, welches sich innerhalb der Lagerung von 48 Stunden, eventuell nachträglich noch gelöst hat.

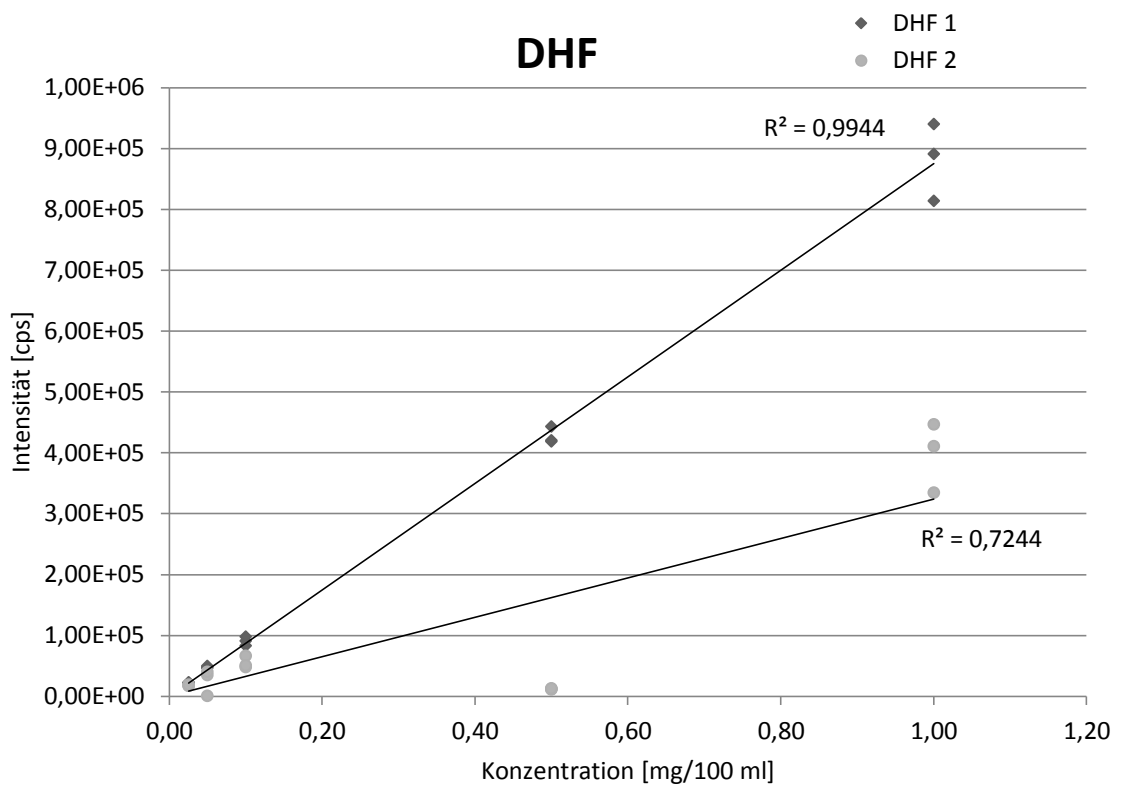


Abbildung 28: Standardgeraden DHF

4.1.6. DHF: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Da auch bei DHF, die Nachweisgrenze durch die 1:40 Verdünnung nicht erreicht war, wurde die Verdünnung bis 1:100 erweitert, wobei aber für DHF nur bis zur 1:80 Verdünnung Peaks detektiert wurden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	5-MTHF		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
16	1:80	0,0125	0,0098	7,20E+02	78,4
17	1:80	0,0125	0,0114	7,38E+02	91,2
18	1:80	0,0125	0,0116	7,38E+02	92,8

Tabelle 39: Auswertung DHF (1:80)

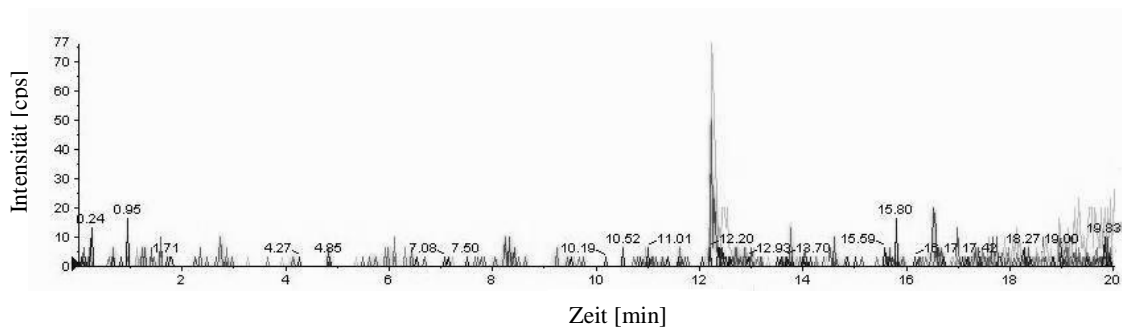


Abbildung 29: DHF (1:80)

Eine Verdünnung von 1:80, bei einer Konzentration von 0,016 mg/100 ml, ist ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 8 gegeben, was einem LOQ von 8:1 und einem LOD von etwa 3:1 entspricht.

4.1.7. p-ABA: Messergebnisse

Tabelle 40 und 41 zeigen die Messergebnisse von p-ABA beginnend bei der Stammlösung bis zur Verdünnung von 1:40. Zwischen den beiden Messdurchgängen, p-ABA 1 und p-ABA 2, liegt ein Zeitunterschied von 48 Stunden. Die Reproduzierbarkeit für p-ABA scheint, wie auch für die vorangegangenen Metaboliten gegeben zu sein. Deutlich zu erkennen ist, dass die Ergebnisse der zweiten Messung für die Stammlösung und die 1:2 Verdünnung, den tatsächlichen Konzentrationen weitaus näher kommen, als die von p-ABA 1.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	p-ABA 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	1:1	1,0700	1,140	8,63E+06	106,00
2	1:1	1,0700	0,958	7,26E+06	89,50
3	1:1	1,0700	1,040	7,86E+06	97,00
4	1:2	0,5350	0,627	4,75E+06	117,00
5	1:2	0,5350	0,584	4,43E+06	109,00
6	1:2	0,5350	0,540	4,09E+06	101,00
7	1:10	0,1070	0,104	7,85E+05	96,80
8	1:10	0,1070	0,117	8,83E+05	109,00
9	1:10	0,1070	0,104	7,91E+05	97,60
10	1:20	0,0535	0,0567	4,30E+05	106,00
11	1:20	0,0535	0,0580	4,39E+05	108,00
12	1:20	0,0535	0,0585	4,43E+05	109,00
13	1:40	0,0267	0,0501	3,79E+05	188,00
14	1:40	0,0267	0,0342	2,59E+05	128,00
15	1:40	0,0267	0,0279	2,11E+05	105,00

Tabelle 40: Auswertung p-ABA 1

Bei der 1:40 Verdünnung (Tabelle 39) für die erste Messung, kommt lediglich einer der drei Werte (Nr. 15), an die Soll-Konzentration von 0,0267 mg/100 ml heran. Die beiden anderen Ergebnisse der 1:40 Verdünnung, liegen deutlich über der tatsächlichen Konzentration. Die erhaltenen Werte für die zweite Messung von p-ABA (Tabelle 41), 1:40 verdünnt, stimmen wie bereits zuvor, besser mit dem Soll-Wert überein.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	p-ABA 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	1:1	1,070	1,080	3,48E+06	101,00
2	1:1	1,070	1,090	3,53E+06	102,00
3	1:1	1,070	1,020	3,30E+06	95,40
4	1:2	0,535	0,590	1,91E+06	110,00
5	1:2	0,535	0,532	1,72E+06	99,50
6	1:2	0,535	0,521	1,68E+06	97,40
7	1:10	0,107	0,120	3,89E+05	113,00
8	1:10	0,107	0,111	3,60E+05	104,00
9	1:10	0,107	0,0993	3,21E+05	92,80
10	1:20	0,0535	0,0477	1,54E+05	89,20
11	1:20	0,0535	0,0483	1,56E+05	90,20
12	1:20	0,0535	0,0494	1,60E+05	92,30
13	1:40	0,0267	0,0301	9,73E+04	113,00
14	1:40	0,0267	0,0273	8,81E+04	102,00
15	1:40	0,0267	0,0245	7,93E+04	91,90

Tabelle 41: Auswertung p-ABA 2

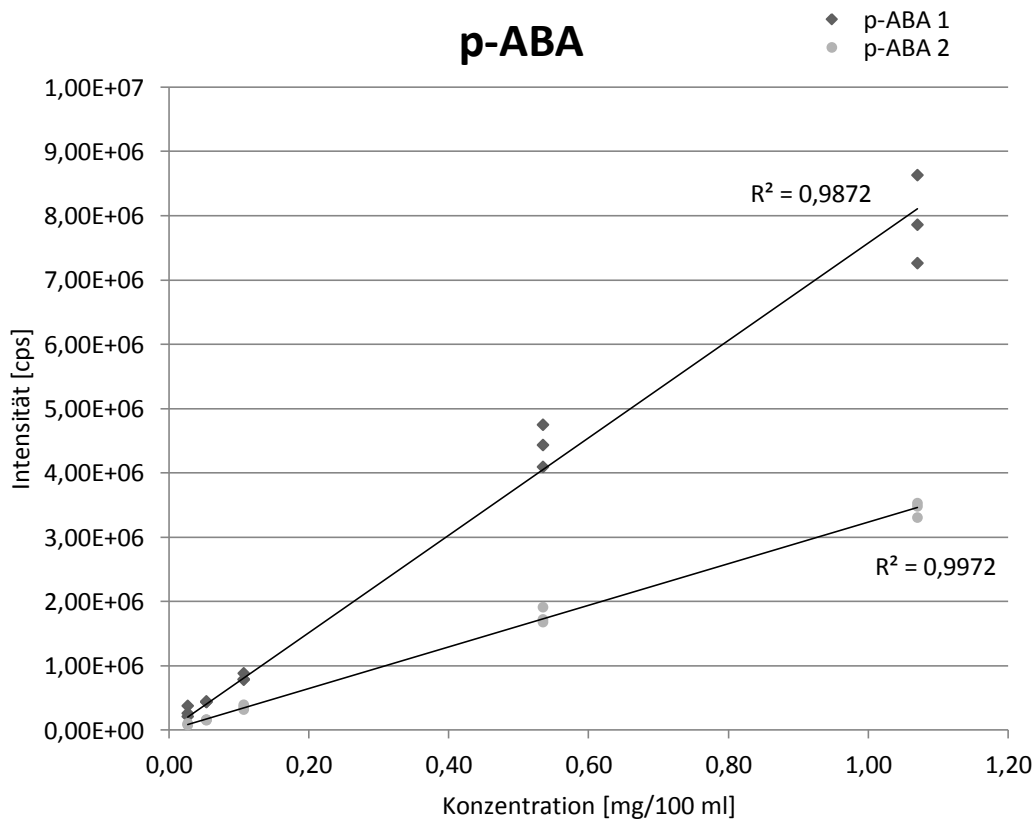


Abbildung 30: Standardgeraden p-ABA

Abbildung 30 zeigt die Standardgeraden von p-ABA 1 und p-ABA 2. Das Bestimmtheitsmaß für p-ABA 1 liegt bei 0,9872, für p-ABA 2 bei 0,9972. Wie bereits erwähnt, liegen die Ergebnisse für p-ABA 2 deutlich näher beim tatsächlichen Wert und weichen auch untereinander nicht so stark voneinander ab, wie die Werte von p-ABA 1, wodurch sich das Bestimmtheitsmaß von 0,9972 für p-ABA 2 erklären lässt.

4.1.8. p-ABA: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Bei den Ergebnissen für die 1:80 und 1:100 Verdünnungen von p-ABA, lassen sich erneut starke Schwankungen jeweils innerhalb der drei Messungen für jede Verdünnungsstufe, erkennen. Auch für p-ABA konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen Konzentrationen, ungenauere Ergebnisse erhalten wurden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	p-ABA		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
16	1:80	0,0133	0,0077	5,84E+04	58,00
17	1:80	0,0133	0,0073	5,55E+04	55,10
18	1:80	0,0133	0,000014	1,03E+02	0,10
19	1:100	0,0107	0,0124	9,42E+04	116,00
20	1:100	0,0107	0,0073	5,55E+04	68,50
21	1:100	0,0107	0,0045	3,39E+04	41,80

Tabelle 42: p-ABA (1:80 und 1:100)

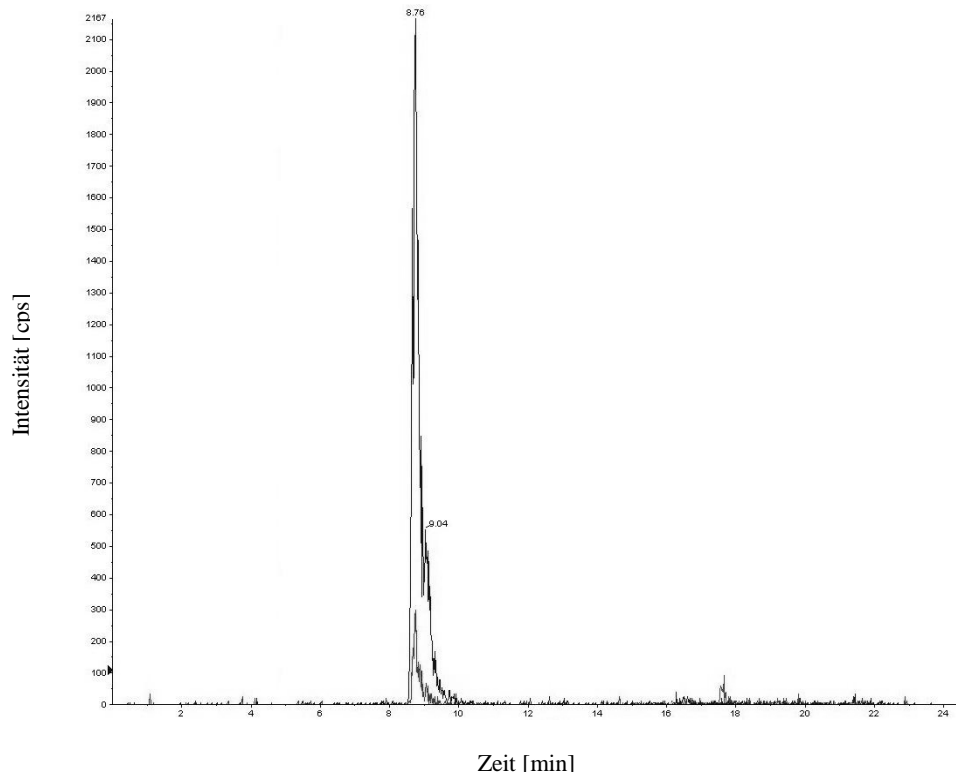


Abbildung 31: p-ABA (1:100)

Für p-ABA konnte selbst bei der 1:100 Verdünnung noch ein deutlich intensiver Peak mit einer Konzentration von 0,0124 mg/100 ml detektiert werden. LOQ und LOD liegen für p-ABA weit unter dieser Verdünnung und sind noch nicht erreicht. Da lediglich für 5-MTHF und PteGlu2 Peaks bis zur 1:100 Verdünnung erhalten wurden, wurde kein weiterer Verdünnungsschritt mehr durchgeführt, was in einer weiteren Arbeit ausgeführt werden muss.

4.1.9. PteGlu2: Messergebnisse

Tabelle 43 und 44 zeigen die Messergebnisse von PteGlu2 beginnend bei der Stammlösung bis zu einer Verdünnung von 1:40. Die erste Messung, PteGlu2 1, wurde 24 Stunden vor der zweiten Messung, PteGlu2 2, gemessen.

Anhand der erhaltenen Werte beider Messungen ist zu erkennen, dass PteGlu2 nach 24-stündiger Lagerung bei -18 °C kaum Intensitätseinbußen erlitten hat und eine Reproduzierbarkeit durchaus gegeben ist.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	PteGlu2 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	1:1	1,110	1,020	8,66E+05	92,20
2	1:1	1,110	1,160	9,85E+05	105,00
3	1:1	1,110	0,110	9,37E+05	99,60
4	1:2	0,555	0,548	4,62E+05	98,70
5	1:2	0,555	0,592	5,00E+05	107,00
6	1:2	0,555	0,613	5,17E+05	110,00
7	1:10	0,111	0,0957	7,73E+04	86,20
8	1:10	0,111	0,0960	7,76E+04	86,50
9	1:10	0,111	0,0952	7,69E+04	85,80
10	1:20	0,0555	0,0447	3,39E+04	80,50
11	1:20	0,0555	0,0496	3,81E+04	89,40
12	1:20	0,0555	0,0495	3,80E+04	89,20
13	1:40	0,0275	0,0376	2,79E+04	137,00
14	1:40	0,0275	0,0280	1,97E+04	102,00
15	1:40	0,0275	0,0266	1,85E+04	96,70

Tabelle 43: Auswertung PteGlu2 1

Selbst bei den niedrigen Konzentrationen der 1:80 und 1:100 Verdünnung, konnten im Vergleich zu 5-MTHF und p-ABA durchwegs passable und lineare Ergebnisse erzielt werden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	PteGlu2 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	1:1	1,110	1,090	9,68E+05	98,60
2	1:1	1,110	1,060	9,34E+05	95,10
3	1:1	1,110	1,120	9,92E+05	101,00
4	1:2	0,555	0,591	5,23E+05	107,00
5	1:2	0,555	0,608	5,38E+05	110,00
6	1:2	0,555	0,581	5,14E+05	105,00
7	1:10	0,111	0,108	9,54E+04	97,10
8	1:10	0,111	0,120	1,06E+05	108,00
9	1:10	0,111	0,117	1,04E+05	106,00
10	1:20	0,0555	0,052	4,60E+04	93,80
11	1:20	0,0555	0,052	4,60E+04	93,70
12	1:20	0,0555	0,0475	4,20E+04	85,60
13	1:40	0,0275	0,0273	2,42E+04	99,40
14	1:40	0,0275	0,0237	2,10E+04	86,20
15	1:40	0,0275	0,0239	2,11E+04	86,80

Tabelle 44: Auswertung PteGlu2 2

Das Bestimmtheitsmaß für PteGlu2 1 liegt mit 0,9937 nur sehr geringfügig unter dem von PteGlu2 2 mit 0,9967. Bei Betrachtung der linearen Regressionen in Abbildung 32, ist die Reproduzierbarkeit der Messung, durch die sehr nahe beieinander liegenden Standardgeraden, zu erkennen.

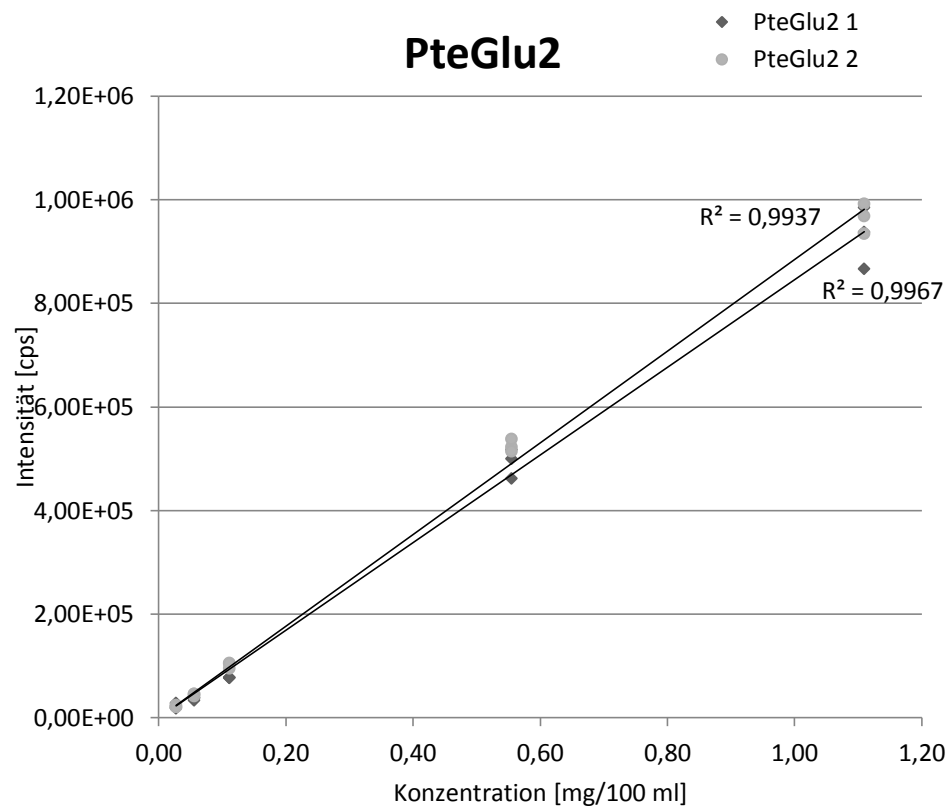


Abbildung 32: Standardgeraden PteGlu2

4.1.10. PteGlu2: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	PteGlu2 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
16	1:80	0,0138	0,0161	9,58E+03	117,00
17	1:80	0,0138	0,0146	8,34E+03	106,00
18	1:80	0,0138	0,0148	8,48E+03	108,00
19	1:100	0,0111	0,0129	6,85E+03	116,00
20	1:100	0,0111	0,0136	7,44E+02	122,00
21	1:100	0,0111	0,0126	6,60E+03	113,00

Tabelle 45: PteGlu2 1:100

Bei einer Konzentration von 0,0126 mg/100 ml (Verdünnung 1:100), ergibt sich ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 10, woraus ein LOQ von 10:1 resultiert. Aufgrund dieser Ergebnisse, kann auf ein LOD von 3:1 geschlossen werden.

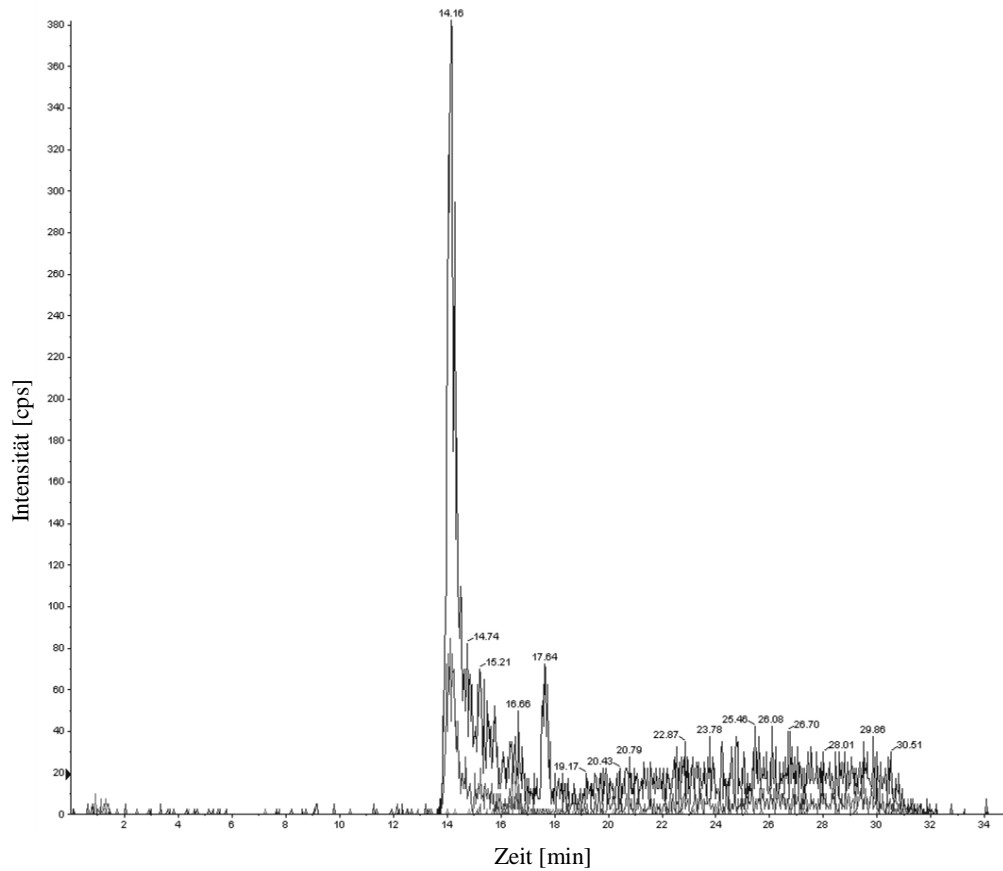


Abbildung 33: PteGlu2 (1:100)

4.2. Standardgeraden (HPLC-qTOF) und Ermittlung der Nachweisgrenzen

Auch für die Messungen mittels HPLC-qTOF wurde eine Verdünnungsreihe beginnend mit der Konzentration von 1 mg/100 ml bis hin zu 0,025 mg/100 ml für alle fünf Metaboliten erstellt, die anhand einer linearen Regression durch den Nullpunkt ausgewertet wurde.

Die weitere Vorgehensweise entspricht demselben Schema, welches bereits für die Messung der Metaboliten mittels HPLC-triplequadrupole, angewendet wurde. Verdünnt wurde wie zuvor aus der Stammlösung (50 mM K₂HPO₄-Puffer, siehe 4.1.), das Endvolumen mit 1000 µl, blieb auch für die Messungen mittels HPLC-qTOF bestehen.

Verdünnung	Konzentration		Stammlösung [µl]	HPLC-Wasser [µl]
	[mg/100 ml]	[mg/ml]		
1:2	0,5	0,005	500	500
1:10	0,1	0,001	100	900
1:20	0,05	0,0005	50	950
1:40	0,025	0,00025	25	975

Tabelle 46: Pipettierschema für Verdünnungsreihen (HPLC-qTOF)

4.2.1. 5-MTHF: Messergebnisse

Tabelle 47 und 48 veranschaulichen die Messergebnisse von 5 MTHF beginnend bei der Stammlösung bis zu einer Verdünnung von 1:40. 5 MTHF 1 stellt die erste Messung der Proben dar, wohingegen 5 MTHF 2 die zweite Messung der selben Proben nach 48 Stunden Lagerung bei -18°C zeigt.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	5-MTHF 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,07	0,9201	5,77E+05	86,0
2	Stammlösung	1,07	1,1729	7,38E+05	109,6
3	Stammlösung	1,07	1,1896	7,49E+05	111,2
4	1:2	0,535	0,5307	3,29E+05	99,2
5	1:2	0,535	0,5413	3,36E+05	101,2
6	1:2	0,535	0,4655	2,87E+05	97,0
7	1:10	0,107	0,1166	6,50E+04	109,0
8	1:10	0,107	0,1016	5,55E+04	94,9
9	1:10	0,107	0,0910	4,88E+04	85,1
10	1:20	0,0535	0,0538	2,51E+04	100,6
11	1:20	0,0535	0,0570	2,71E+04	106,5
12	1:20	0,0535	0,0535	2,48E+04	100,0
13	1:40	0,02675	0,0318	1,11E+04	119,2
14	1:40	0,02675	0,0308	1,04E+04	115,2
15	1:40	0,02675	0,0314	1,08E+04	117,5

Tabelle 47: Auswertung 5-MTHF 1 (HPLC-qTOF)

Bei Betrachtung der Messwerte von 5-MTHF 1 ist zu erkennen, dass von der Stammlösung bis zur 1:10 Verdünnung, starke Schwankungen innerhalb der drei Messungen jeder Verdünnungsstufe aufgetreten sind. Die Ergebnisse für die 1:20 Verdünnung liegen sehr nahe an der tatsächlichen Konzentration, wohingegen beim letzten und kleinsten Verdünnungsschritt (1:40) wieder deutliche Schwankungen sichtbar werden.

Die Messergebnisse für 5-MTHF 2 zeigen eine bessere lineare Verteilung (siehe Abbildung 34), als die der ersten Messung von 5-MTHF. Ab der Verdünnung von 1:20 wurden aber auch für 5-MTHF 2 sehr ungenaue Werte mit starken Schwankungen erhalten.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	5-MTHF 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,07	0,9826	5,28E+05	91,8
2	Stammlösung	1,07	1,0641	5,71E+05	99,5
3	Stammlösung	1,07	1,0906	5,86E+05	101,9
4	1:2	0,535	0,5825	3,13E+05	108,9
5	1:2	0,535	0,5714	3,07E+05	106,8
6	1:2	0,535	0,6027	3,23E+05	112,7
7	1:10	0,107	0,1037	5,50E+04	96,9
8	1:10	0,107	0,1051	5,57E+04	98,2
9	1:10	0,107	0,1044	5,54E+04	97,6
10	1:20	0,0535	0,0489	2,56E+04	91,6
11	1:20	0,0535	0,0485	2,53E+04	90,6
12	1:20	0,0535	0,0370	1,91E+04	69,2
13	1:40	0,02675	0,0188	9,36E+03	70,4
14	1:40	0,02675	0,0113	5,30E+03	42,1
15	1:40	0,02675	0,0122	5,83E+03	45,8

Tabelle 48: Auswertung 5-MTHF 2 (HPLC-qTOF)

Abbildung 34 veranschaulicht die Messergebnisse für 5-MTHF 1 und 5-MTHF 2. Wie bereits erwähnt, zeigen die Werte für 5-MTHF 2 eine bessere lineare Verteilung, mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9929, als die für 5-MTHF 1 ($r^2 = 0,9782$).

Es ist auch hier deutlich zu erkennen, dass bei niedrigeren Konzentrationen, ungenauere Messwerte erzielt werden. Dass für 5-MTHF 2 ab der 1:20 Verdünnung deutlich niedrigere Werte als noch für 5-MTHF 1 erreicht wurden, liegt vermutlich am Zerfall bzw. Abbau der Substanzen.

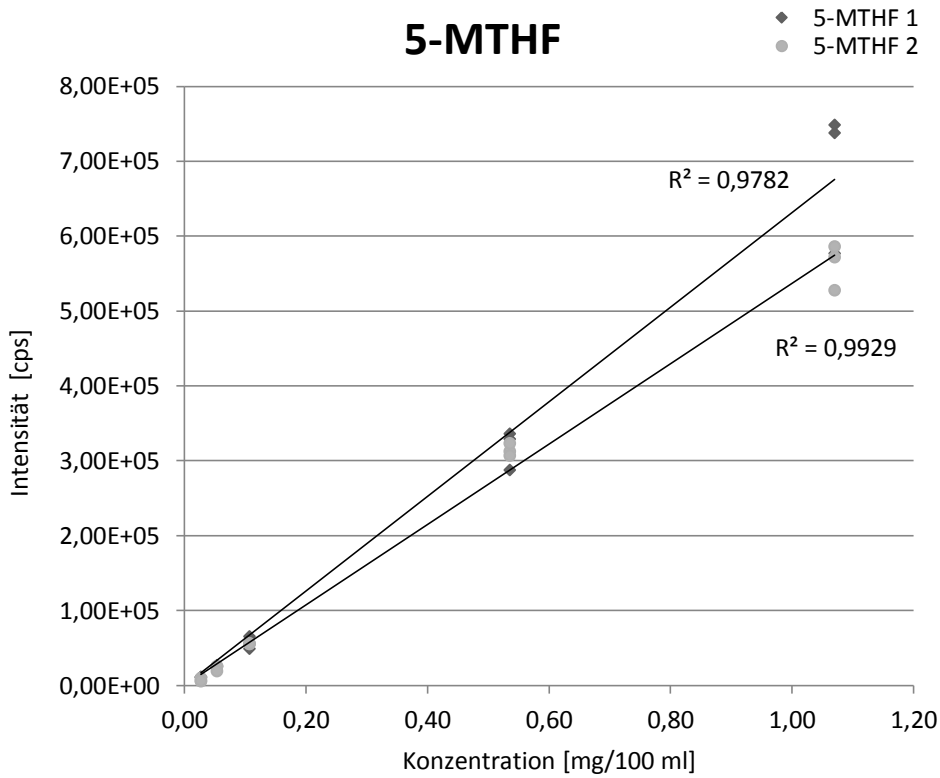


Abbildung 34: Standardgeraden 5-MTHF (HPLC-qTOF)

4.2.2. 5-MTHF: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Bei einer Konzentration von 0,0308 mg/100 ml (Verdünnung 1:40), ergibt sich ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 10, woraus ein LOQ von 10:1 resultiert. Aufgrund dieser Ergebnisse, kann auf ein LOD von 3:1 geschlossen werden.

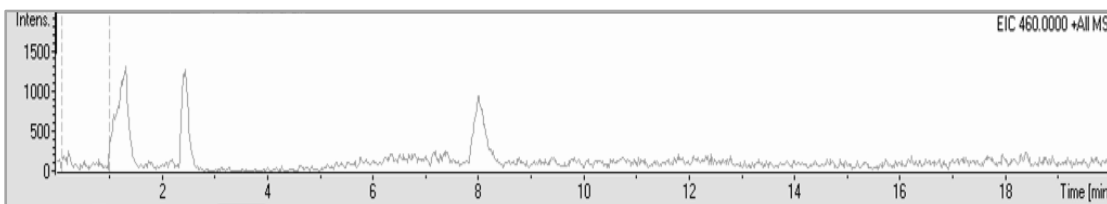


Abbildung 35: 5-MTHF (1:40; HPLC-qTOF)

4.2.3. THF: Messergebnisse

Die Messergebnisse für THF 1 sind in Tabelle 49, die für THF 2 in Tabelle 50 dargestellt. Zwischen den beiden Messungen von THF 1 und THF 2 liegt ein Zeitraum von fünf Tagen, was vermutlich auch der Grund dafür ist, dass für THF 2 für die 1:40 Verdünnung keine Konzentrationen bestimmt werden konnten.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	THF 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,09	1,1657	1,33E+05	106,9
2	Stammlösung	1,09	1,0510	1,20E+05	96,4
3	Stammlösung	1,09	1,0972	1,25E+05	100,7
4	1:2	0,545	0,5433	6,02E+04	99,7
5	1:2	0,545	0,5334	5,90E+04	97,9
6	1:2	0,545	0,4652	5,11E+04	85,4
7	1:10	0,109	0,1131	9,84E+03	103,7
8	1:10	0,109	0,1077	9,21E+03	98,8
9	1:10	0,109	0,1221	1,09E+04	112,0
10	1:20	0,0545	0,0635	4,03E+03	116,6
11	1:20	0,0545	0,0520	2,68E+03	95,4
12	1:20	0,0545	0,0532	2,83E+03	97,7
13	1:40	0,02725	0,0399	1,27E+03	146,5
14	1:40	0,02725	0,0401	1,29E+03	147,0
15	1:40	0,02725	0,0297	8,00E+01	109,2

Tabelle 49: Auswertung THF 1 (HPLC-qTOF)

Ein Vergleich der Auswertungen von THF 1 und THF 2 zeigt ähnliche Ergebnisse für die Stammlösung und 1:20 Verdünnung, höhere Konzentrationen für die 1:2 Verdünnung von THF 2 und niedrigere Konzentrationen für die 1:10 Verdünnung von THF 2. Am Schwierigsten stellt sich jedoch die Interpretation der drei erhaltenen Messwerte der 1:40 Verdünnung von THF 1 dar, da für zwei Werte um fast 50 % mehr detektiert wurde, als die tatsächliche Konzentration beträgt.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	THF 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,09	0,9951	2,61E+05	91,3
2	Stammlösung	1,09	1,1214	2,96E+05	102,9
3	Stammlösung	1,09	1,1303	2,98E+05	103,7
4	1:2	0,545	0,5576	1,42E+05	102,3
5	1:2	0,545	0,5563	1,41E+05	102,0
6	1:2	0,545	0,5737	1,46E+05	105,3
7	1:10	0,109	0,0949	1,51E+04	87,1
8	1:10	0,109	0,0993	1,63E+04	91,1
9	1:10	0,109	0,1017	1,70E+04	93,3
10	1:20	0,0545	0,0597	5,49E+03	109,6
11	1:20	0,0545	0,0539	3,90E+03	98,9
12	1:20	0,0545	0,0515	3,26E+03	94,7
13	1:40	0,02725	-	-	-
14	1:40	0,02725	-	-	-
15	1:40	0,02725	-	-	-

Tabelle 50: Auswertung THF 2 (HPLC-qTOF)

Das Bestimmtheitsmaß für THF 1 liegt bei 0,9896, für THF 2 bei 0,9915. Die Ergebnisse für den zweiten Messtag von THF zeigen einen besseren linearen Zusammenhang, als die der ersten Messung. Bis auf die 1:10 Verdünnung, wurden für THF 2 genauere Messwerte erzielt als für THF 1, was in Tabelle 49 und 50 ersichtlich ist.

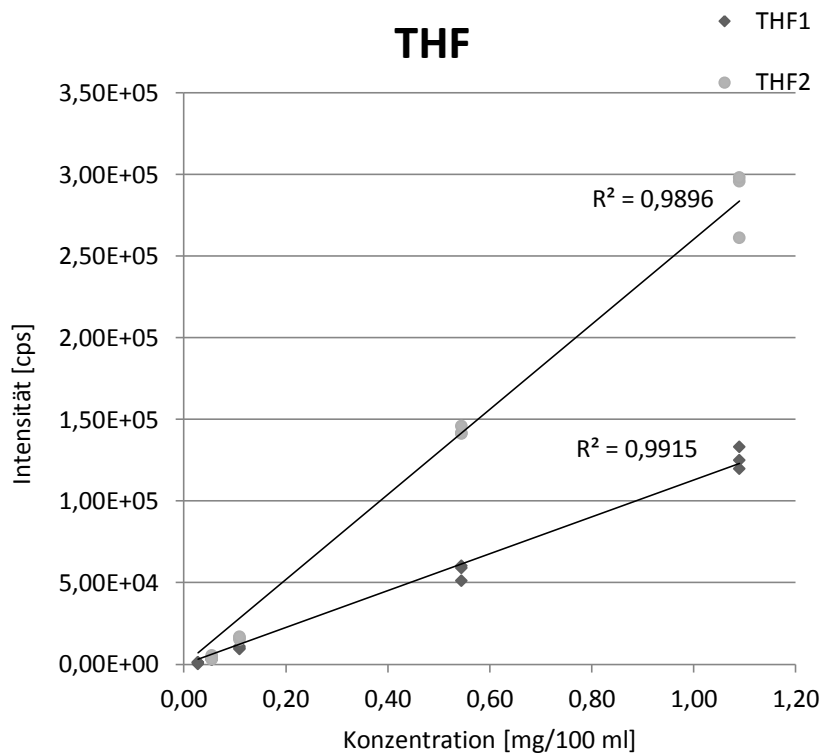


Abbildung 36: Standardgeraden THF (HPLC-qTOF)

4.2.4. THF: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Bei einer Verdünnung von 1:20 (Konzentration: 0,0635 mg/100 ml) ergibt sich ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 3, was einem Limit of Detection (LOD) von 3:1 entspricht. Das LOQ von 10:1 befindet sich vermutlich im Bereich zwischen der 1:10 und 1:2 Verdünnung.

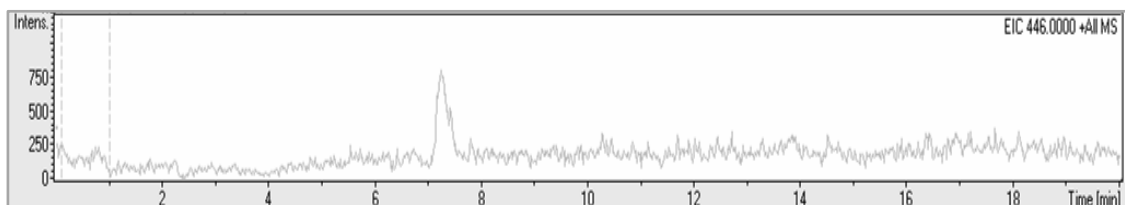


Abbildung 37: THF (1:20; HPLC-qTOF)

4.2.5. DHF: Messergebnisse

Die Messergebnisse der Verdünnungsreihe von DHF sind in Tabelle 51 und 52 dargestellt. Die höchste Konzentration beträgt 1,00 mg/100 ml (Stammlösung), die niedrigste 0,025 mg/100 ml (1:40 Verdünnung). Zwischen dem ersten und zweiten Messdurchgang von DHF liegen 48 Stunden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	DHF 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,04	0,9814	1,36E+05	94,4
2	Stammlösung	1,04	1,0661	1,47E+05	102,5
3	Stammlösung	1,04	1,0495	1,45E+05	100,9
4	1:2	0,52	0,5549	7,56E+04	106,7
5	1:2	0,52	0,5587	7,62E+04	107,4
6	1:2	0,52	0,4972	6,75E+04	95,6
7	1:10	0,104	0,0932	1,08E+04	89,6
8	1:10	0,104	0,1035	1,22E+04	99,5
9	1:10	0,104	0,0843	9,50E+03	81,0
10	1:20	0,052	0,0533	5,15E+03	102,5
11	1:20	0,052	0,0451	3,99E+03	86,7
12	1:20	0,052	0,0526	5,06E+03	101,2
13	1:40	0,026	0,0289	1,73E+03	111,3
14	1:40	0,026	0,0308	1,99E+03	118,4
15	1:40	0,026	0,0266	1,39E+03	102,1

Tabelle 51: Auswertung DHF 1 (HPLC-qTOF)

Bei Betrachtung der Messergebnisse für DHF 1 kann festgestellt werden, dass ausgehend von den Messungen der Stammlösung bis hin zur 1:40 Verdünnung, meist nur einer von drei Werten je Verdünnungsstufe, dem tatsächlichen Wert sehr nahe kommt. Vor allem die Ergebnisse der 1:10 und 1:40 Verdünnung zeigen starke Schwankungen.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	DHF 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,04	1,1849	5,97E+04	113,9
2	Stammlösung	1,04	0,9612	4,82E+04	92,4
3	Stammlösung	1,04	1,0859	5,46E+04	104,4
4	1:2	0,52	0,5005	2,45E+04	96,3
5	1:2	0,52	0,4686	2,29E+04	90,1
6	1:2	0,52	0,4932	2,41E+04	94,8
7	1:10	0,104	0,1058	4,23E+03	101,7
8	1:10	0,104	0,0863	3,22E+03	82,9
9	1:10	0,104	0,0939	3,62E+03	90,3
10	1:20	0,052	0,0546	1,60E+03	104,9
11	1:20	0,052	0,0524	1,48E+03	100,7
12	1:20	0,052	0,0552	1,63E+03	106,1
13	1:40	0,026	0,0275	2,05E+02	105,8
14	1:40	0,026	0,0298	3,26E+02	114,8
15	1:40	0,026	0,0262	1,38E+02	100,7

Tabelle 52: Auswertung DHF 2 (HPLC-qTOF)

Die Werte für DHF 2 zeigen ein ähnliches Muster, wie zuvor für DHF 1 beschrieben. Auch im Fall von DHF 2 liegt meist nur ein Wert nahe der tatsächlichen Konzentration. Die 1:10 Verdünnung stellt die Ergebnisse mit den größten Schwankungen dar.

Wie aus Abbildung 38 ersichtlich, beträgt das Bestimmtheitsmaß für DHF 1 0,9955, für DHF 2 0,9832. Somit zeigt sich für DHF 1 eine bessere Linearität der Messergebnisse als für DHF 2.

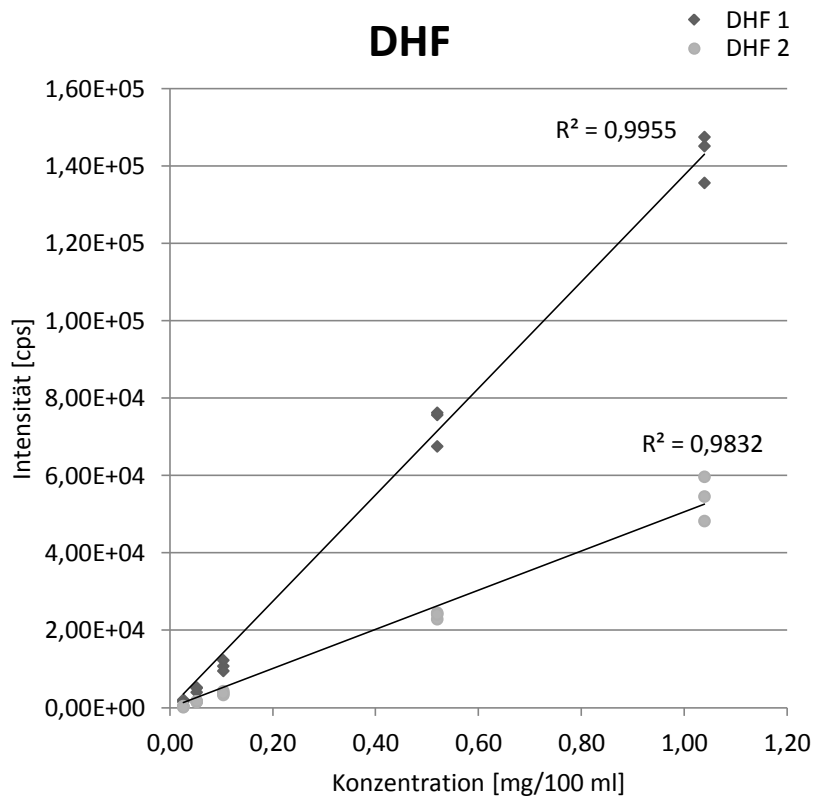


Abbildung 38: Standardgeraden DHF (HPLC-qTOF)

4.2.6. DHF: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Für DHF zeigt sich, dass bereits bei der 1:20 Verdünnung (Konzentration 0,0532 mg/100 ml) ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 3 erreicht wurde. Somit kann ein LOD von 3:1 angenommen werden. Das LOQ von 10:1 müsste darausfolgend zwischen den Verdünnungen 1:10 und 1:2 liegen.

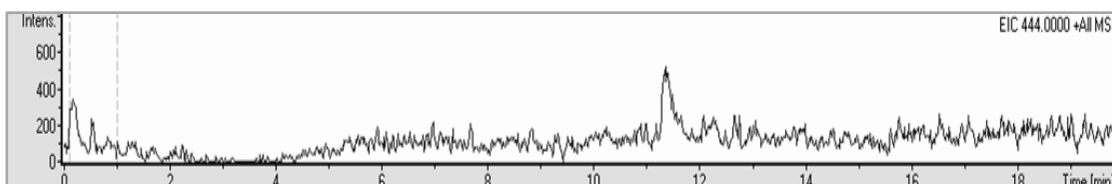


Abbildung 39: DHF (1:20; HPLC-qTOF)

4.2.7. p-ABA: Messergebnisse

Tabelle 53 und 54 stellen die Messergebnisse von p-ABA beginnend bei der Stammlösung bis zur Verdünnung von 1:40 dar. Zwischen den beiden Messdurchgängen, p-ABA 1 und p-ABA 2, liegt ein Zeitunterschied von 3 Tagen. Die Reproduzierbarkeit für p-ABA scheint, wie auch für die vorangegangenen Metaboliten gegeben zu sein.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	p-ABA 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,06	0,9783	6,52E+04	92,3
2	Stammlösung	1,06	1,1351	7,58E+04	107,1
3	Stammlösung	1,06	1,0967	7,32E+04	103,5
4	1:2	0,53	0,5163	3,39E+04	97,4
5	1:2	0,53	0,5245	3,45E+04	99,0
6	1:2	0,53	0,5116	3,36E+04	96,5
7	1:10	0,106	0,1026	5,95E+03	96,8
8	1:10	0,106	0,1161	6,87E+03	109,6
9	1:10	0,106	0,1046	6,09E+03	98,7
10	1:20	0,053	0,0583	2,95E+03	110,1
11	1:20	0,053	0,0578	2,92E+03	109,0
12	1:20	0,053	0,0476	2,23E+03	89,9
13	1:40	0,0265	0,0264	7,94E+02	99,6
14	1:40	0,0265	0,0284	9,29E+02	107,2
15	1:40	0,0265	0,0221	5,03E+02	83,4

Tabelle 53: Auswertung p-ABA 1 (HPLC-qTOF)

Bei der 1:40 Verdünnung (Tabelle 53) für die erste Messung, kommt lediglich einer der drei Werte (Nr. 15), an die Soll-Konzentration von 0,0265 mg/100 ml heran. Zwei Ergebnisse der 1:20 Verdünnung, liegen deutlich über der tatsächlichen Konzentration, wohingegen der dritte Wert deutlich darunter liegt. Die Konzentrationen der 1:10, 1:2 Verdünnung, sowie der Stammlösung, zeigen geringere Abweichungen innerhalb der drei gemessenen Proben je Verdünnungsstufe, obwohl auch hier meist nur einer der drei Werte nahe der tatsächlichen Konzentration liegt.

Die erhaltenen Werte für die zweite Messung von p-ABA (Tabelle 54), zeigen größere Abweichungen als die der ersten Messung. Für die Proben der 1:40 und 1:20 Verdünnungen wurden keine Konzentrationen detektiert, was vermutlich an der 3-tägigen Lagerung bei -18 °C und dem damit verbundenen Intensitätsverlust zusammenhängt.

Die Schwankungen jeweils innerhalb einer Verdünnungsstufe, sind am Deutlichsten für die 1:2 Verdünnung und Stammlösung zu erkennen, was sich auch im Bestimmtheitsmaß für p-ABA 2 bemerkbar macht.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	p-ABA 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,06	1,2465	9,57E+04	117,6
2	Stammlösung	1,06	1,0800	8,18E+04	101,9
3	Stammlösung	1,06	1,0021	7,53E+04	94,5
4	1:2	0,53	0,4717	3,09E+04	89,0
5	1:2	0,53	0,4715	3,09E+04	89,0
6	1:2	0,53	0,4798	3,16E+04	90,5
7	1:10	0,106	0,1124	9,05E+02	106,0
8	1:10	0,106	0,1129	9,05E+02	106,5
9	1:10	0,106	0,1113	8,14E+02	105,0
10	1:20	0,053	-	-	-
11	1:20	0,053	-	-	-
12	1:20	0,053	-	-	-
13	1:40	0,0265	-	-	-
14	1:40	0,0265	-	-	-
15	1:40	0,0265	-	-	-

Tabelle 54: Auswertung p-ABA 2 (HPLC-qTOF)

Das Bestimmtheitsmaß für p-ABA 1 beträgt 0,9931, für p-ABA 2 0,9397 (siehe Abbildung 40). Die Ursachen für die schlechte lineare Verteilung der Werte und damit verbunden das Bestimmtheitsmaß von 0,9397 für p-ABA 2, wurden bereits erläutert.

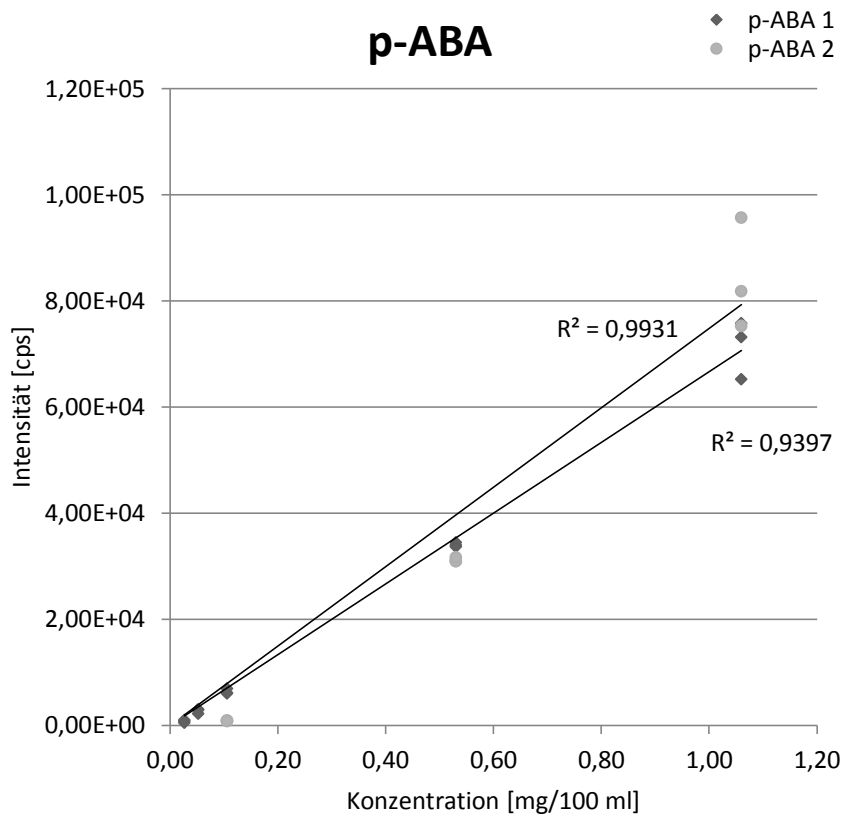


Abbildung 40: Standardgeraden p-ABA (HPLC-qTOF)

4.2.8. p-ABA: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Bei der Stammlösung und der Verdünnung von 1:2 (Konzentration von 0,5163 mg/100 ml) ist noch ein deutlicher Peak zu erkennen. Die Bestimmung von LOD und LOQ stellt sich in diesem Fall als schwierig dar, weil die Basislinie sehr starke unregelmäßige Schwankungen aufweist.

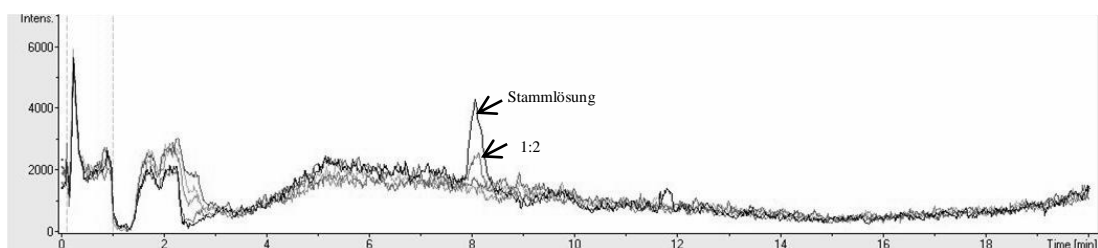


Abbildung 41: p-ABA Verdünnungsreihe (HPLC-qTOF)

4.2.9. PteGlu2: Messergebnisse

In den zwei nachfolgenden Tabellen sind die Messergebnisse von PteGlu2 beginnend bei der Stammlösung bis zu einer Verdünnung von 1:40 dargestellt. Die erste Messung, PteGlu2 1, wurde 24 Stunden vor der zweiten Messung, PteGlu2 2, gemessen.

Anhand der erhaltenen Werte beider Messungen ist zu erkennen, dass PteGlu2 nach 24-stündiger Lagerung bei -18 °C keine Intensitätseinbußen erlitten hat und eine Reproduzierbarkeit durchaus gegeben ist.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	PteGlu2 1		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,08	1,0832	2,94E+05	103,0
2	Stammlösung	1,08	1,0576	2,87E+05	97,9
3	Stammlösung	1,08	1,0352	2,80E+05	95,8
4	1:2	0,54	0,5313	1,42E+05	98,4
5	1:2	0,54	0,5947	1,59E+05	110,1
6	1:2	0,54	0,5480	1,47E+05	101,5
7	1:10	0,108	0,1101	2,62E+04	101,9
8	1:10	0,108	0,1253	3,04E+04	116,0
9	1:10	0,108	0,1133	2,71E+04	104,9
10	1:20	0,054	0,0506	9,82E+03	93,6
11	1:20	0,054	0,0537	1,07E+04	99,4
12	1:20	0,054	0,0429	7,71E+03	79,4
13	1:40	0,027	0,0267	3,27E+03	99,0
14	1:40	0,027	0,0300	4,17E+03	111,2
15	1:40	0,027	0,0244	2,63E+03	90,4

Tabelle 55: Auswertung PteGlu2 1(HPLC-qTOF)

Selbst bei den niedrigen Konzentrationen der 1:40 Verdünnung von PteGlu2 1 und PteGlu2 2, konnten im Vergleich zu den Messungen von 5-MTHF, THF und p-ABA noch hohe Konzentrationen des Metaboliten nachgewiesen werden.

Nr.	Verdünnung	tatsächliche Konzentration [mg/100ml]	PteGlu2 2		
			errechnete Konzentration [mg/100 ml]	Peakfläche [cps]	Genauigkeit [%]
1	Stammlösung	1,08	1,1195	2,99E+05	103,7
2	Stammlösung	1,08	1,0980	2,93E+05	101,7
3	Stammlösung	1,08	1,1040	2,95E+05	102,2
4	1:2	0,54	0,5260	1,37E+05	97,4
5	1:2	0,54	0,5127	1,33E+05	95,0
6	1:2	0,54	0,5070	1,32E+05	93,9
7	1:10	0,108	0,1062	2,24E+04	98,3
8	1:10	0,108	0,1029	2,15E+04	95,2
9	1:10	0,108	0,1099	2,34E+04	101,7
10	1:20	0,054	0,0594	9,65E+03	110,0
11	1:20	0,054	0,0430	5,19E+03	79,7
12	1:20	0,054	0,0494	6,92E+03	91,4
13	1:40	0,027	0,0324	2,30E+03	120,1
14	1:40	0,027	0,0251	3,02E+02	93,0
15	1:40	0,027	0,0315	2,05E+03	116,7

Tabelle 56: Auswertung PteGlu2 2 (HPLC-qTOF)

Auffallend ist jedoch auch für PteGlu2, dass sowohl im ersten als auch im zweiten Messdurchgang, innerhalb der jeweils drei Messungen einer Verdünnungsstufe, zum Teil doch deutliche Schwankungen erkennbar sind.

Das Bestimmtheitsmaß für PteGlu2 1 liegt mit 0,9974 nahe dem von PteGlu2 2 mit 0,9954. Bei Betrachtung der linearen Regressionen in Abbildung 42, ist die Reproduzierbarkeit der Messung, durch die sehr nahe beieinander liegenden Standardgeraden, zu erkennen.

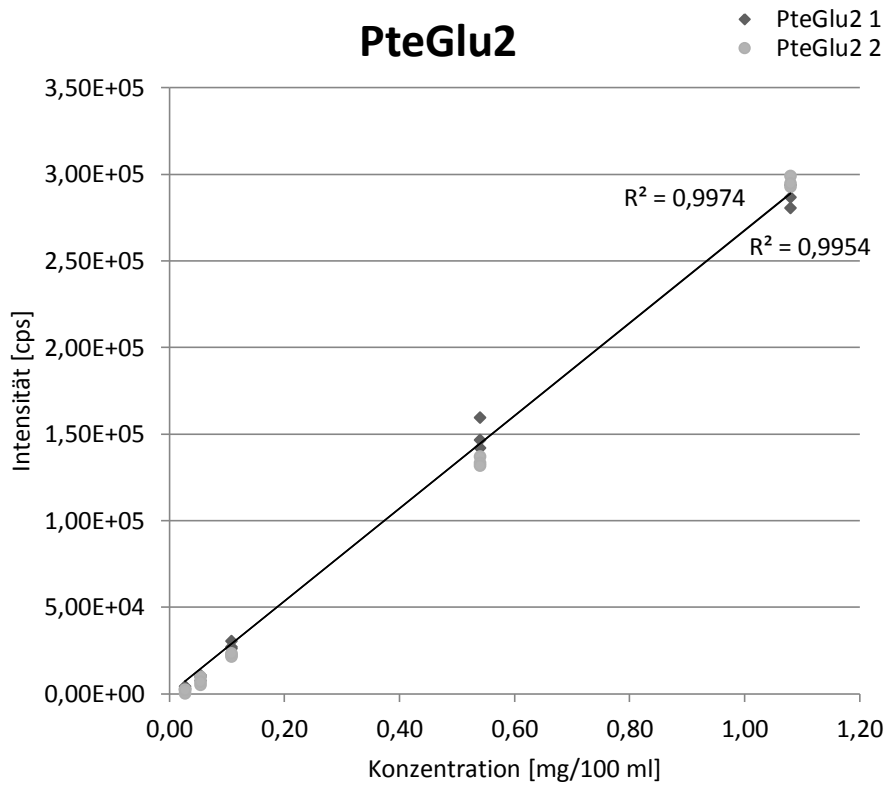


Abbildung 42: Standardgeraden PteGlu2 (HPLC-qTOF)

4.2.10. PteGlu2: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD/LOQ)

Bei einer Konzentration von 0,1133 mg/100 ml (Verdünnung 1:10), ergibt sich ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N) von etwa 3, woraus ein LOD von 3:1 resultiert. Aufgrund dieser Ergebnisse, kann auf ein LOQ von 10:1 bei einer Verdünnung von etwa 1:2 geschlossen werden.

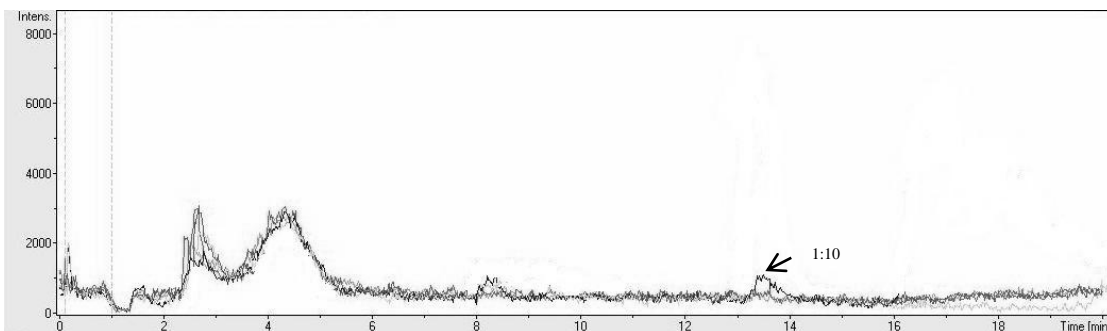


Abbildung 43: PteGlu2 (1:10; HPLC-qTOF)

5. DISKUSSION UND SCHLUSSBETRACHTUNG

Folatkonzentrationen im Serum oder Plasma werden häufig für die Bewertung des Folatstatus herangezogen. Der Erythrozytenfolatstatus gibt Auskunft über eine längerfristige Folataufnahme und korreliert mit dem Leberfolatspiegel, wohingegen Serum und Plasma die aktuelle Nahrungsaufnahme reflektieren [OWENS et al, 2007a; OWENS et al, 2005; CLIFFORD et al, 2004].

Unter Punkt 2.8. wurde bereits ausgeführt, dass für klinische Forschungsstudien von Folaten, immer häufiger GC und HPLC – gekoppelt mit einem MS-Detektor, zum Einsatz kommen. Die Verbindung von HPLC mit Massenspektrometrie ermöglicht es, die Folate in ihrem natürlichen Zustand zu analysieren und quantifizieren, während gleichzeitig die Schwierigkeiten, die durch Kopplung von HPLC mit anderen Detektoren einhergehen, umgangen werden.

Für die Detektion der empfindlichen Folate wurden ein MS-triplequadrupole, welches durch Kopplung von mehreren Detektoren eine bessere Quantifizierung der Analyten ermöglicht, sowie ein MS-qTOF. Letzterer misst die Flugzeit der Ionen und bestimmt deren Masse zu Ladungsverhältnis (m/z).

Bei MS-triplequadrupole wurde mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) einzelne Fragmentationen ausgewählt, wodurch die Quantifizierung, im Vergleich zu MS-qTOF – wo nur ein Totalionenstrom-Chromatogramm geliefert werden kann, viel sensitiver und selektiver verlaufen kann.

Die Tatsache, dass in Erythrozyten, die bereits vom Vollblut getrennt gelagert wurden, nach Dekonjugation (siehe PFEIFFER und GREGORY 1998) keine 5-MTHF-Monoglutamate mehr nachgewiesen werden konnten, führten zum Entschluss, dass zukünftige Methoden zur Untersuchung der Erythrozyten zuerst an Vollblutproben durchgeführt und erst danach die Zentrifugation zum Erhalten der Erythrozyten stattfinden sollte.

Mit dem in Tabelle 27 angeführten Aufarbeitungsschema, das nach ZHANG et. al. 2008 weiterentwickelt wurde, konnten zwar keine Monoglutamate in den Erythrozyten detek-

tiert werden, jedoch gelang es aufzuzeigen, dass durch die Aufarbeitungsschritte kaum Quantitätseinbußen erlitten wurden, und sich die Methode für Folatmetaboliten eignet.

Die Problematik der Folatstabilität, auf die bereits unter Punkt 2.7. eingegangen wurde, stellte von Beginn an die größte Herausforderung dar. Durch Kombination von drei verschiedenen Stabilisatoren – Ascorbinsäure (AA), 2-Mercaptoethanol (2-MCE) und Dithiothreitol (DTT) – konnte die Stabilität der Metaboliten in den wässrigen Lösungen im Vergleich zur Verwendung von 2-MCE und Citronensäure bzw. 2-MCE und AA, verbessert werden.

Der Zusatz von DTT führte zwar zu einer Steigerung der Stabilität, möglicherweise kam es aber auch zwischen den unterschiedlichen Stabilisatoren zu Wechselwirkungen, die, für alle gemessenen Metaboliten, ausgenommen 5-MTHF und p-ABA, eine gute Stabilität nach mehrtägiger Lagerung nicht möglich machten.

Da Folate besonders empfindlich gegenüber Sauerstoff, Licht, Hitze, Säuren und Basen sind, konnte durch Begasung der HPLC-Vials mit Argon oder Stickstoff, eine bessere Stabilität der Metaboliten erreicht werden. Durch Begasung wird Sauerstoff aus den Gefäßen verdrängt, wodurch eine Oxidation nicht oder nur verlangsamt ablaufen kann.

Die Begasung, sowie das Verwenden von dunklen Gefäßen, konnten den Folatabbau zusätzlich, zu den bereits verwendeten Stabilisatoren, entschleunigen.

Auch die Art der Lagerung zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität der Folatmetaboliten auf, wobei p-ABA, 5-MTHF, THF grundsätzlich stabiler als DHF, PteGlu2 und PteGlu3 sind. Eine Lagerung bei 4 °C wirkte sich auf die Stabilität von p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 negativer aus, als eine Lagerung bei -18 °C, wohingegen die Intensitäten für 5-MTHF und DHF annähernd gleiche Werte zeigten. Für THF stellte sich die Lagerung bei -18 °C als nachteilig heraus, da im Vergleich zur Lagerung im Autosampler bei 4 °C, die Intensität um das 6-fache verringert wurde (siehe 3.7.9).

Nicht nur die Art sondern auch die Dauer der Lagerung beeinflusste die Stabilität der Metaboliten deutlich. Bereits nach 2-tägiger Lagerung, sowohl bei 4 °C als auch bei -18 °C, konnten DHF, PteGlu2 und PteGlu3 nicht mehr in den wässrigen Lösungen

nachgewiesen werden. Lediglich 5-MTHF und p-ABA waren auch nach 7-tägiger Lagerung noch relativ stabil, THF nur bei Lagerung im Autosampler.

Eine weitere Herausforderung stellte die Löslichkeit der Metaboliten in den Puffern, sowie die unterschiedliche Ionisierung der einzelnen Folate dar. Daher wurden zahlreiche Puffer, Laufmittel, Gradienten und Einstellungen getestet, um eine optimale Analysemethode für die Folatmetaboliten zu entwickeln. Dass die Löslichkeit und Ionisierung einen enormen Einfluss auf die Intensität der gemessenen Metaboliten hat, zeigt der Vergleich von Ammoniumacetat und K_2HPO_4 als Puffer (3.8.4). Zur Verbesserung der Ionisierung wurde den Laufmitteln jeweils 0,1 % Ameisensäure (HCOOH) zugefügt.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD und LOQ) der Metaboliten - für HPLC-triplequadrupole und HPLC-qTOF, wurde eine Verdünnungsreihe (1mg/100 ml bis 0,025 mg/100 ml) für alle fünf Metaboliten erstellt, die anhand einer linearen Regression durch den Nullpunkt ausgewertet wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Metaboliten zu überprüfen, wurden je zwei Messungen derselben Proben, an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Für 5-MTHF, DHF, p-ABA und PteGlu2 wurde die Verdünnungsreihe für die Messungen mittels HPLC-triplequadrupole erweitert (bis 0,01 mg/100 ml), da die Nachweisgrenze mit den vorangegangenen Verdünnungsschritten noch nicht erreicht wurde.

Im Allgemeinen ist für die Auswertung der gesamten Ergebnisse festzustellen, je niedriger konzentriert die Proben, desto ungenauer die Ergebnisse. Anhand der Standardgeraden sowie dem jeweiligen Bestimmtheitsmaß konnte gezeigt werden, dass die Messwerte im Großen und Ganzen reproduzierbar und linear verteilt sind. Die Abweichungen, die innerhalb einer Verdünnungsstufe auftreten, liegen beim Großteil der gemessenen Metaboliten bei +/- 10 % und somit innerhalb der Messgenauigkeit.

Bei einigen der Folatmetaboliten, wie etwa für DHF – analysiert mittels HPLC-triplequadrupole, ist deutlich zu erkennen, dass die Werte des zweiten Messtages erhebliche Schwankungen aufweisen. Der Grund dafür könnte in der Lagerung bzw. in der schlechten Löslichkeit von DHF liegen, dass sich vermutlich nach dem Einfrieren wieder anreichert bzw. besser löst (siehe 4.1.5).

Tabelle 57 und 58 veranschaulichen die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der gemessenen Folatmetaboliten:

	HPLC-triplequadrupole				
	5-MTHF	THF	DHF	p-ABA	PteGlu2
Konzentration [mg/100ml]	0,0026	0,0189	0,0160	0,0124	0,0126
Konzentration [ng/ml]	2,59	18,90	16,00	12,40	12,60
Verdünnung	1:100	1:40	1:80	1:100	1:100
LOD	3:1	3:1	3:1	-	3:1
LOQ	10:1	10:1	8:1	-	10:1

Tabelle 57: LOD/LOQ: HPLC-triplequadrupole

Für 5-MTHF, THF, DHF und PteGlu2 konnte aufgrund der Analysenergebnisse ein LOQ von 10:1 bis 8:1 ermittelt und auf ein LOD von 3:1 geschlossen werden.

LOD und LOQ konnte für p-ABA (HPLC-triplequadrupole) nicht festgestellt werden, da selbst bei der 1:100 Verdünnung die Nachweisgrenze noch deutlich nicht erreicht war (siehe Abbildung 31).

	HPLC-qTOF				
	5-MTHF	THF	DHF	p-ABA	PteGlu2
Konzentration [mg/100ml]	0,0308	0,0635	0,0532	0,5163	0,1133
Konzentration [ng/ml]	30,80	63,50	53,20	516,30	113,30
Verdünnung	1:40	1:20	1:20	1:2	1:10
LOD	3:1	3:1	3:1	-	3:1
LOQ	10:1	-	-	-	-

Tabelle 58: LOD/LOQ - HPLC-qTOF

Auch mittels HPLC-qTOF waren LOD und LOQ für p-ABA nicht bestimmbar, da die Basislinie sehr starke unregelmäßige Schwankungen aufwies (siehe Abbildung 41) und ab der 1:2 Verdünnung kein Unterschied zwischen Signal und Rauschen festgestellt werden konnte.

Lediglich für 5-MTHF konnte ein LOQ bestimmt werden – THF, DHF und PteGlu2 zeigten in der jeweils angegebenen Verdünnungsstufe, dass bereits das Limit of Detection (LOD) erreicht wurde.

Anhand von Tabelle 57 und 58 lässt sich sehr deutlich eine bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Messungen mittels HPLC-triplequadrupole erkennen.

Die noch detektierbaren Konzentrationen liegen für HPLC-triplequadrupole teilweise um mehr als das 10-fache höher als für HPLC-qTOF, was aufgrund der besseren Selektivität und Sensitivität des Tandem-MS auch erwartet wurde.

Die Grundlage zur Bestimmung der Folate in wässrigen Lösungen, sowie in Erythrozyten, konnte anhand der umfangreichen Methodenentwicklung geschaffen werden. Bezüglich der Stabilität und der Lagerung der Metaboliten, sowie der Analyse der Folate in Erythrozyten müssen noch weitere Methoden bzw. Untersuchungen durchgeführt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Eine ausreichende Folataufnahme ist wichtig, um das Risiko für Neuralrohrdefekte, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, einige Krebserkrankungen sowie Bluthochdruck bei Frauen zu reduzieren. Eine gesteigerte Zufuhr von Nahrungsfolaten, mit Folsäure angereicherten Lebensmitteln oder Folsäuresupplementen, kann zu höheren Erythrozytenfolatspiegeln führen und das Risiko für Neuralrohrdefekte minimieren.

Studien über die Bestimmung der Folatkonzentrationen in den roten Blutkörperchen sind wesentlich seltener anzufinden, als über die Plasma- bzw. Serumfolatanalyse, da die Aufbereitung der Erythrozytenfolate viel komplexer ist.

In dieser Arbeit wurde versucht, eine sensitive und aussagekräftige Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Methode (LC-MS), zur Bestimmung der empfindlichen Folate in wässrigen Standardlösungen und Erythrozyten, zu entwickeln. Die Folate wurden durch negative und positive Elektrosprayionisierung (ESI), an zwei unterschiedlichen MS-Typen – time of flight (TOF) und tandem/triplequadrupole, detektiert und quantifiziert. Zum Vergleich der Methoden, wurde zusätzlich versucht, die gerätespezifischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, LOD (Limit of Detection) und LOQ (Limit of Quantification) zu ermitteln.

Um die Stabilität der Folate zu ermitteln, wurden Lagerversuche bei 4 °C und -18 °C durchgeführt. Beide Experimente zeigten deutliche Intensitätsrückgänge, sowohl bei Lagerung im Autosampler (4 °C) als auch bei Lagerung im Tiefkühlschrank (-18 °C). Die Konditionen bei -18 °C waren für p-ABA, PteGlu2 und PteGlu3 vorteilhafter als bei 4 °C. Auf 5-MTHF und DHF zeigte die Art der Lagerung keinen signifikanten Einfluss, während sich die Lagerung bei -18 °C für THF als nachteilig herausstellte.

7. SUMMARY

An adequate folate intake is indispensable in lowering the risk of neural tube defects, cardiovascular disease, some cancers, and hypertension in women. Increased intakes of food folates, folic acid enriched food or folic acid supplements can reduce the risk of neural tube defects and enhance the folate concentrations in red blood cells (RBC).

Methods for determination of folate levels in plasma or serum are still more common than methods for analyzing folate concentrations in red blood cells as the sample preparation is considerably more complex.

In this master thesis a sensitive and meaningful liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method to analyse and determine the sensitive folates - in aqueous buffer and red blood cells – was developed. HPLC triplequadrupole and HPLC-qTOF (time of flight) in positive and negative electrospray ionization (ESI) were used to detect and quantify the folate metabolites. Method validation was carried out by defining the device-specific limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD).

Since the stability of folates is known to be unstable, the influence of storage at 4 °C and -18 °C was tested. Both experiments showed a significant decrease in intensity. The results for the metabolites were fairly different: p-ABA, PteGlu2 and PteGlu3 indicated better stability within storage at -18°C, 5-MTHF and DHF showed similar results when stored at -18 °C pointed out adverse effects for THF.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ B, PRIEGO-CAPOTE F, MATA-GRANADOS J M, LUQUE DE CASTRO M D. Automated determination of folate catabolites in human biofluids (urine, breast milk and serum) by on-line SPE-HILIC-MS/MS. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217: 4688-4695.

ARCOT J, SHRESTHA A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology* 2005; 16: 253-266.

APPLIED BIOSYSTEMS Inc. and MDS Analytical Technologies Inc. Joint Owners. API 4000™ LC/MS/MS System - Basis-Trainingskurs, 2009.

BALTES W, KROH L W. Kopplung von Gas- und Flüssigchromatographie. In: *Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen* (Kroh L W, Hrsg). Behr's Verlag, Hamburg, 2004; 191-193.

BAUMANN E, STOYA G, VÖLKNER A, RICHTER W, LEMKE C, LINSS W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica* 2000; 102: 21-35.

BELZ S, NAU H. Determination of Folate Patterns in Mouse Plasma, Erythrocytes, and Embryos by HPLC Coupled with a Microbiological Assay. *Analytical Biochemistry* 1998; 265: 157-166.

BROUWER I A, VAN DUSSELDORP M, WEST C E, STEEGERS-THEUNISSEN R P M. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutrition Research Reviews* 2001; 14: 267-293.

BUDZIKIEWICZ H, SCHÄFER M. Grundlagen. In: *Massenspektrometrie*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005; 7-39.

CLIFFORD A J, NOCETI E M, BLOCK-JOY A, BLOCK T, BLOCK G. Erythrocyte Folate and Its Response to Folic Acid Supplementation Is Assay Dependent in Women. *Journal of Nutrition* 2005; 135: 137-143.

CZEIZEL A E. Folic acid in the prevention of neural tube defects. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1995; 20: 4-16.

CZEIZEL A E, DUDAS I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New English Journal of Medicine* 1992; 327: 1832-1835.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE), Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE). Nutritive Aspekte von Nährstoffen. In: D_A_CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau/Braus, Frankfurt/Main, 2008; 117-123.

DE BROUWER V, STOROZHENKO S, VAN DE STEENE J C, WILLE S M R, STOVE C P, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT W E. Optimisation and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for folates in rice. *Journal of Chromatography A* 2008; 1215: 125-132.

DUEKER S R, LIN Y, JONES A D, MERCER R, FABBRO E, MILER J W, GREEN R, CLIFFORD A J. Determination of Blood Folate Using Acid Extraction and Internally Standardized Gas Chromatography-Mass Spectrometry Detection. *Analytical Biochemistry* 2000; 283: 266-275.

EFSA meeting summary report. Folic acid: an update on scientific developments. 21-22 January 2009; Uppsala, Sweden.

ELMADFA I, LEITZMANN C. Folsäure. In: Ernährung des Menschen. Eugen Ulmer, Stuttgart, 2004; 381-390.

FAZILI Z, PFEIFFER C M, ZHANG M, JAIN R. Erythrocyte Folate Extraction and Quantitative Determination by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Comparison of Results with Microbiological Assay. *Clinical chemistry* 2005; 51:12 2318-2325.

FERRER I, THURMANN I M. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22:750-756.

FREISLEBEN A, SCHIEBERLE P, RYCHLIK M. Specific and sensitive quantification of folate vitamins in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003a; 376: 149-156.

FREISLEBEN A, SCHIEBERLE P, RYCHLIK M. Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2003b; 315: 247-255.

GARBIS S D, MELSE-BOONSTRA A, WEST C E, VAN BREEMEN R B. Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2001; 73: 5358-5364.

GARRAT L C, ORTORI C A, TUCKER G A, SABLITZKY F, BENNETT M, BARRETT D A. Comprehensive metabolic profiling of mono- and polyglutamated folates and their precursors in plant and animal tissue using liquid chromatography/negative ion electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2005; 19: 2390-2398.

GEY M H. Chromatographie. In: *Instrumentelle Analytik Und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2008; 97-112.

GIBSON R S. Assessment of folate and vitamin B₁₂ status. In: *Principles of Nutritional Assessment*. Oxford University Press, New York, 2005; 604-605.

GREGORY J F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, method of analysis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Advances in Food Nutrition Research* 1989; 33: 1-101.

GRONINGEN PROTEOMICS FACILITY. Quadrupole-TOF Mass Spectrometer (MS/MS); 2010. <http://www.medicalproteomics.com/instrumentation.html> (abgerufen am 17.04.2012)

GUNTER E W, BOWMAN B A, CAUDILL S P, TWITE D B, ADAMS M J, SAMPSON E J. Results of an international round robin for serum and whole-blood folate. *Clinical Chemistry* 1996; 42: 1689-1694.

HANNISDAL R, SVARDAL A, UELAND P M. Measurement of Folate in Fresh and Archival Serum Samples as p-Aminobenzoylglutamate Equivalents. *Clinical Chemistry* 2008; 54: 665-672.

HANNISDAL R, UELAND P M, SVARDAL A. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Folate and Folate Catabolites in Human Serum. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 1147-1154.

HART D J, FINGLAS P M, WOLFE C A, MELLON F, WRIGHT A J A, SOUTHON S. Determination of 5-Methyltetrahydrofolate (¹³C-Labeled and Unlabeled) in Human Plasma and Urine by Combined Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2002; 305: 206-213.

HONEIN M A, PAULOZZI L J, MATHEWS T J, ERICKSON J D, WONG L C. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *The Journal of the American Medical Association* 2001; 285: 2981-2986.

IWAI K, LUTTNER M, TOENNIES G. Blood Folic Acid Studies – purification and properties of the folic acid precursors of human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964; 239: 2365-2369.

KEAGY P M. Folic acid-microbiological and animal assay. *Methods of vitamin assay* 1985; 4: 445-463.

KHAN K, BLAAK E, ELLA M. Quantifying Intermediary Metabolites in Whole Blood after a Simple Deproteinization Step with Sulfosalicylic Acid. *Clinical Chemistry* 1991; 37: 728-733.

KOHASHI M, INOUE K, SOTOBAYASHI H, IWAI K. Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 1986; 382: 303-307.

KOK R M, SMITH D E C, DAINTY J R, VAN DEN AKKER J T, FINGLAS P M, SMULDERS Y M, JAKOBS C, DE MEER K. 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to folate absorption and metabolism. *Analytical Biochemistry* 2004; 326: 129-138.

KOUFOPANTELIS P, GEORGAKAKOU S, KAZANIS M, GIAGINIS C, MARGELI A, PAPARGIRI S, PANDERI I. Direct injection liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometric quantification of methotrexate, folinic acid, folic acid and ondansetron in human serum. *Journal of Chromatography B* 2009; 877: 3850-3856.

KROMIDAS S, KUSS H J. Das Chromatogramm. In: *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*. Wiley-VCH, Weinheim, 2008; 1-14.

LIANG X P, LIANG Q L, XIA J F, WANG Y, HU P, WANG Y M, ZHENG X Y, ZHANG T, LUO G A. Simultaneous determination of sixteen metabolites related to neural tube defects in maternal serum by liquid chromatography coupling with electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* 2009; 78: 1246-1252.

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

MATHEWS T J, HONEIN M A, ERICKSON J D. Spina bifida and anencephaly prevalence – United States, 1991-2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports* 2002; 51: 9-11.

MATISSEK R, STEINER G, FISCHER M. Basisinformation zu instrumentellen Analyseverfahren. In: *Lebensmittelanalytik*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2009; 370-378.

MORTENSEN E. Determination of Erythrocyte Folate by Competitive Protein Binding Assay Preceded by Extraction. *Clinical Chemistry*, 1976; 22: 982-992.

MÖNCH S, NETZEL M, NETZEL G, RYCHLIK M. Quantitation of folates and their catabolites in blood plasma, erythrocytes, and urine by stable isotope dilution assays. *Analytical Biochemistry* 2010; 398: 150-160.

MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects; results of the Medical Research Council Vitamin Study. *The Lancet* 1991; 338: 131-137.

NELSON B C, PFEIFFER C M, MARGOLIS S A, NELSON C P. Solid-phase extraction-electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum. *Analytical Biochemistry* 2004; 325: 41-51.

NELSON B C, SATTERFIELD M B, SNIEGOSKI L T, WELCH M J. Simultaneous Quantification of Homocysteine and Folate in Human Serum or Plasma Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry Division* 2005; 77: 3586-3593.

OTTO M. Flüssigchromatographie. In: *Analytische Chemie*. Wiley-VCH, Germany, 2011; 418-420.

OWENS J E, HOLSTEGE D M, CLIFFORD A J. Quantitation of Total Folate in Whole Blood Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 7390-7394.

OWENS J E, HOLSTEGE D M, CLIFFORD A J. Comparison of Two Dietary Folate Intake Instruments and Their Validation by RBC Folate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007a; 55: 3737-3740.

OWENS J E, HOLSTEGE D M, CLIFFORD A J. High-Troughput Method for the Quantification of Total Folate in Whole Blood Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007b; 55: 3292-3297.

OWEN W E, ROBERTS W L. Comparison of Five Automated Serum and Whole Blood Folate Assays. *American Journal of Clinical Pathology* 2003; 120: 121-126.

PATRING J D, JASTREBOVA J A. Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity. *Journal of Chromatography A* 2007; 1143: 72-82.

PAWLOSKY R J, FLANAGAN V P, PFEIFFER C M. Determination of 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Human Serum by Stable-Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2001; 298: 299-305.

PERSAD V L, VAN DEN HOF M C, DUBÉ J M, ZIMMER P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *Canadian Medical Association Journal* 2002; 167: 241-245.

PFEIFFER C M, FAZILI Z, MC COY L, ZHANG M, GUNTER E W. Determination of Folate Vitamers in Human Serum by Stable-Isotope-Dilution Tandem Mass Spectrometry and Comparison with Radioassay and Microbiologic Assay. *Clinical Chemistry* 2004; 50:2 423-432.

PFEIFFER C M, GREGORY J F. Enzymatic deconjugation of erythrocyte polyglutamyl folates during preparation for folate assay: investigation with reversed-phase liquid chromatography. *Clinical Chemistry* 1996; 42:11 1847-1854.

PIETRZIK K, BAILEY L, SHANE B. Folic acid and L-5-Methyltetrahydrofolate. *Clinical Pharmacokinetics* 2010; 49 (8): 535-548.

QUINLIVAN E P, HANSON A D, GREGORY J F. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical Biochemistry* 2006; 348: 163-184.

RIEDER M J. Prevention of neural tube defects with periconceptual folic acid. *Clinics in Perinatology* 1994; 21: 483-503.

SANA T R, WADDELL K, FISCHER S M. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome. *Journal of Chromatography B* 2008; 871: 314-321.

SMITH D E C, KOK R M, TEERLINK T, JAKOBS C, SMULDERS Y M. Quantitative determination of erythrocyte folate vitamers distribution by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006; 44: 450-459.

SMITHELLS R W, SHEPPARD S, SCHORAH C J, SELLER M J, NEVIN N C, HARRIS R, READ A P, FIELDING D W. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptual vitamin supplementation. *Archives of Disease in Childhood* 1981; 56: 911-918.

SNYDER L R, KIRKLAND J J, DOLAN J W. Introduction. In: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2010; 3-4.

STOKES P, WEBB K. Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid-chromatography-mass spectrometry I. *Journal of Chromatography A* 1999; 864: 59-67.

THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P. Blut. In: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999; 109-115.

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

VAN DER PUT N M, STEEGERS-THEUNISSEN R P, FROSST P, TRIJBELS F J, ESKES T K, VAN DEN HEUVEL L P, MARIMAN E C, DEN HEYER M, ROZEN R, BLOM H J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346: 1070-1071.

VAN HAANDEL L, BECKER M L, LEEDER J S, WILLIAMS T D, STOBAUGH J F. A novel high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for improved selective and sensitive measurement of methotrexate polyglutamation status in human red blood cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009; 23: 3693-3702.

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

VISHNUOMOHAN S, ARCOT J. Naturally-occurring folates in foods: Method development and analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Chemistry* 2011; 125: 736-742.

WANG C, RIEDL K M, SCHWARTZ S J. A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables. *Journal of Chromatography B* 2010; 878: 2949-2958.

WATERS. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919> (abgerufen am 18.04.2012)

WIDHALM K, MIKLAUTSCH M. Vitamine – Grundlage und Empfehlungen. In: *Ernährungsmedizin* (Widhalm K, Hrsg). Deutscher Ärzte-Verlag, Wien, 2009; 202-203.

WISELL K T, KAHLMETER G, GISKE C G. Trimethoprim and enterococci in urinary tract infections: new perspectives on an old issue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62: 35-40.

WRIGHT A J A, FINGLAS P M, SOUTHON S. Erythrocyte folate analysis: a cause for concern? *Clinical Chemistry* 1998; 44: 1886-1891.

WRIGHT A J A, FINGLAS P M, SOUTHON S. Erythrocyte Folate Analysis: Saponin Added During Lysis of Whole Blood Can Increase Apparent Folate Concentrations, Depending on Hemolysate pH. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 1978-1986.

YOUNG J E, MATYSKA M T, PESEK J J. Liquid chromatography/mass spectrometry compatible approaches for the quantitation of folic acid in fortified juices and cereals using aqueous normal phase conditions. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218: 2121-2126.

ZHANG G F, STOROZHENKO S, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT W E. Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2005; 1078: 59-66.

ZHANG Y, JIYE A, WANG G, HUANG Q, YAN B, ZHA W, GU S, LIU L, REN R, REN M, SHENG L. Organic solvent extraction and metabonomic profiling of the metabolites in erythrocytes. *Journal of Chromatography B* 2009; 877: 1751-1757.

ZWIAUER K. Prophylaxe von Neuralrohrdefekten mit Folsäure. *Gynäkologie* 2005; 38: 46-52.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name: Beate Teuschler
Adresse: Theresianumgasse 8/1/3, 1040 Wien
Geburtsdaten: 27.Mai 1983
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig

Schulische Bildung:

seit 03/2005 **Diplomstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien**
09/2004 - 02/2005 **Diplomstudium für das Lehramt an Volksschulen, PH Eisenstadt**
1997 – 2002 **Höhere Bundeslehranstalt für wirtschaftliche Berufe (HBLA), Eisenstadt**
Abgeschlossen mit der Reife- und Diplomprüfung
1993 - 1997 **Bundesgymnasium Mattersburg**
1989 - 1993 **Volksschule Wiesen**

Auslandsaufenthalt:

08/2002 – 08/2003 **Aupair in Chessington (England)**
(Kinderbetreuung und Besuch eines Cambridge Englisch Proficiency Kurses,
abgeschlossen mit dem Cambridge Certificate for Proficiency)

Beruflicher Werdegang:

WS 2011, SS 2012 **wissenschaftliche Universitätsmitarbeiterin, Universität Wien**
(Tutorin für die Lehrveranstaltung „Übungen zu Methoden der experimentellen Ernährungsforschung“)

02/2011 **Praktikantin am Institut für Ernährungswissenschaften – Emerging Focus Nutrigenomics, Universität Wien**
(Vorbereitung von Urinproben für metabolic profiling, Standardisierung von ernährungsphysiologischen Parametern in Hinblick auf eine Interventionsstudie und Probenvorbereitung für die LC/MS Analytik)

11/2010 **Praktikantin bei der MA 38 – Lebensmitteluntersuchungsanstalt Wien**
(Mitarbeit in der Bakteriologie: Probenevidenz, Probenansatz, Verdünnungsreihen, Auswerten, Keimdiagnostik, Arbeit mit pathogenen Keimen)

10/2010 **Praktikantin am Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien**
(Auswertung von oxidativen DNA-Schäden in Lymphozyten mittels Fluoreszenzmikroskop im Rahmen der DIAPLANT Studie)

- 07/2010 – 09/2010 **Praktikantin bei forum.ernährung heute, Wien**
(Administrative Tätigkeiten, Literaturrecherche, Content-Management (Website), Erstellung von Buchrezensionen, Verfassen von Web-Artikeln, Erarbeitung eines Vermarktungskonzeptes)
- 11/2007 - 08/2009 **Nachhilfelehrkraft Englisch und Mathematik (Teilzeit) im Lernquadrat Eisenstadt**
(Stoffgebiet Englisch: komplette Unterstufe und Oberstufe bis zur Matura; Stoffgebiet Mathematik: Unterstufe)
- 06/2009 **Praktikantin bei Diätologin Edith Kubiena, Neufeld**
(Qualitätssicherung und Essensverteilung im Zuge einer Großküchenbetreuung, Mitarbeit bei der Erstellung von Rezeptbüchern, Assistenz bei Vorträgen und Kochkursen)
- 09/2003 - 08/2004 **Angestellte bei HTP High Tech Plastics AG, Neudörfel**
(Assistenz des Abteilungsleiters für Qualität: Wartung des QM-Handbuches, Mitarbeit bei Reklamationsstatistiken, Publizierung der Kundenbewertung, administrative Tätigkeiten)