



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Quantifizierung von Proteinen mittels Aminosäureanalytik

Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von

Juliane Schmidt

Matrikelnummer: 2023836

Hamburg

25. Februar 2014

Gutachter: Prof. Dr. Susanne Töpfke (HAW Hamburg)

Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Instrumentelle Analytik, der Fakultät Life Sciences, der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

**Für meinen Vater, Robert Schmidt
und meine Großmutter, Hannelore Schmidt.**

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Töpfke. Mit ihrer Kritik, Zeit und Geduld hat sie diese Bachelorarbeit maßgeblich zum Positiven beeinflusst. Vielen Dank, dass Sie immer ein „offenes Ohr“ für mich hatten.

Außerdem möchte ich mich bei den Laborantinnen und Laboranten des Labors für Instrumentelle Analytik bedanken. Auch sie haben mir mit so vielen Dingen das Leben erleichtert. Vielen Dank dafür.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Birger Anspach, der mir besonders bei der Auswahl der geeigneten Proteine eine große Hilfe war.

Meiner Familie und meinem Lebensgefährten danke ich dafür, dass ihr mich zu dem Menschen geformt habt, der in der Lage ist dieses Studium erfolgreich abzuschließen. Zusätzlich möchte ich mich für eure Geduld bedanken und für die vielen „Nein, dafür haben ich keine Zeit.“ entschuldigen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
2	Einleitung.....	7
3	Grundlagen.....	8
3.1	Proteine.....	8
3.1.1	Proteinbiosynthese.....	8
3.1.2	Proteinaufbau.....	10
3.1.3	Testproteine BSA und Lysozym.....	13
3.2	Hydrolyse von Proteinen.....	15
3.3	Aminosäuren.....	18
3.4	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	22
3.5	Quantifizierung.....	25
4	Material und Methoden.....	27
4.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
4.2	Proteinhydrolyse.....	30
4.3	OPA-Derivatisierung.....	37
4.4	Aminosäure-Bestimmung mittels HPLC.....	40
5	Ergebnisse der Proteinquantifizierung.....	52
5.1	Auswertung und Diskussion.....	52
5.2	Empfehlungen.....	61
6	Quellenverzeichnis.....	63
6.1	Literaturquellenverzeichnis.....	63
6.2	Abbildungsquellenverzeichnis.....	64
7	Anhang.....	65
7.1	Berechnung Proteinkonzentration H1.....	65
7.2	Ansatz 12 molarer Natronlauge.....	65
7.3	Berechnung Molarität 37 %iger Salzsäure.....	65
7.4	Chromatogramme.....	65
7.5	Einwaagen für Stammlösungen der Aminosäurestandards.....	66
7.6	Pipettenprüfung.....	66
7.7	Einwaagen Natriumacetatpuffer.....	67
7.8	Daten der Proteinquantifizierung.....	68
7.8.1	Proteineinwaagen.....	68
7.8.2	Auswertung von H2 und H3.....	68

7.8.3	Auswertung von H4 bis H6	70
7.8.4	Auswertung H7 bis H9	71
7.8.5	Auswertung H10 bis H12	72
7.8.6	Auswertung H13 bis H15	73
7.8.7	Auswertung HL1 bis HL3.....	74
7.8.8	Auswertung von HL4 bis HL6.....	75

1 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wird eine Methode entwickelt, um Proteine mittels Aminosäureanalytik zu quantifizieren. Die Austestung erfolgt mit Hilfe von zwei Testproteinen. Die Wahl fiel auf Bovines Serum Albumin (BSA), da es vielfach als Standard für Protein-Assays Verwendung findet sowie das Enzym Lysozym. Es ist wesentlich kleiner als BSA, aber ebenso gut erforscht. Zum Vergleich der Ergebnisse dieser Methode wurde der Bradford-Assay genutzt. Er ist einfach in der Durchführung, wird häufig verwendet und ist wenig störanfällig im Vergleich zu anderen Proteinassays. Um die Aminosäuren analysieren zu können, muss eine Proteinhydrolyse erfolgen. Dafür wird, nach gründlicher Literaturrecherche, eine saure Hydrolyse mit sechs molarer Salzsäure bei 110 °C für 24 h und 48 h gewählt. Die längere Hydrolysezeit erbrachte keine deutliche Verbesserung der Ergebnisse. Für die Aminosäureanalytik werden sechs Aminosäuren genutzt: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Phenylalanin, Leucin, Lysin. Sie erfahren keine Zerstörung oder Veränderung durch die Hydrolyse. Asparagin und Glutamin desaminieren aber zu Asparaginsäure und Glutaminsäure. Bei der Berechnung der Proteinkonzentration, aus der Aminosäureanalytik, muss dies Berücksichtigung finden. Mittels Anwendung eines internen Standards werden die gewonnenen Ergebnisse um Verluste bei der Probenaufbereitung sowie der Derivatisierung bereinigt. Zwei nichtproteinogene Aminosäuren werden zu diesem Zweck ausgetestet. Da eine chromatografische Trennung von Norleucin und Leucin nicht möglich ist, wird α -Aminobuttersäure verwendet. Die Neutralisation der Hydrolyseproben erfolgt mit Natronlauge, bevor sie mit Hilfe eines programmierbaren Autosamplers derivatisiert werden. Durch die genutzte Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) entstehen Isoindole, die hydrophob und fluoreszenzdetektierbar sind. Das OPA-Reagenz verliert ungekühlt an Reaktivität. Dies muss bedacht werden, da frisches Reagenz größere Peakflächen generiert. Die chromatografische Trennung erfolgt mit einer *Reversed Phase* Säule. Eine Gradientenelution erfolgt mit einem 50 mmol/L Natriumacetatpuffer sowie einem hydrophoben Lösemittelgemisch. Verwendet wird Methanol, Acetonitril und Reinstwasser in Anteilen von 45/45/10. Methanol ist als reines Lösemittel ungeeignet. Aufgrund der hohen Viskosität des Methanol-Puffer-Gemisches steigt der Säulendruck auf bis zu 350 bar. Zudem führt die Entspannung des Gemisches im Detektor zur Ausgasung und damit zu Luftpeaks im Chromatogramm. Reines Acetonitril bringt schmalere Peaks und ein sauberes Chromatogramm hervor, ist aber dreimal teurer als Methanol. Die ermittelten Proteinkonzentrationen zeigen, dass die Genauigkeit der entwickelten Methode durchaus mit der des Bradford-Assays vergleichbar ist. Eine vollständige Validierung der Proteinquantifizierung mittels Aminosäureanalytik steht jedoch noch aus.

2 Einleitung

Die Quantifizierung chromatografisch getrennter Aminosäuren wurde schon 1948 von S. Moore und W. H. Stein beschrieben (Moore, S.; Stein W. H.: *Photometric Ninhydrin Method For Use In The Chromatography Of Amino Acids*. S. 367-388). Die Aminosäureanalytik wurde seitdem zu verschiedenen Zwecken genutzt. Einerseits dient sie der Quantifizierung von freien Aminosäuren in biologischen Proben oder Lebensmitteln, andererseits der Identifizierung oder Quantifizierung von Proteinen.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit soll eine einfache, robuste und kostengünstige Methode entwickelt werden, um aufgereinigte Proteine mittels Aminosäureanalytik zu quantifizieren. Ihre Ergebnisse sollen mit gängigen Proteinassays vergleichbar sein. Vorteilhaft ist, dass kein Protein zur Kalibrierung genutzt wird. Im Vergleich zu einer Kalibrierung mit Bovine Serum Albumin (BSA) sind die Ergebnisse daher präziser. Zusätzlich ist die zu entwickelnde Methode keinen qualitativen Schwankungen aufgrund der Proteinstruktur und -größe unterlegen. Darüber hinaus bietet sich ein Kostenvorteil, denn die Aminosäurestandards sind durchschnittlich günstiger als Proteine in vergleichbarer Qualität und Reinheit.

Um eine solche Methode zu entwickeln, bedarf es verschiedener Teilschritte. Zunächst muss festgelegt werden, welche Proteine für die Aufgabe einer Methodenentwicklung geeignet sind. BSA und Lysozym werden verwendet, da ihre Aminosäurezusammensetzung sowie ihr struktureller Aufbau bekannt und sie preisgünstig zu beschaffen sind. Als Vergleichsmethode wird der häufig angewendete, robuste und ebenfalls preisgünstige Bradford-Assay genutzt. Für die Proteinhydrolyse die der Aminosäureanalytik vorangeht, steht eine große Auswahl an Methoden zur Verfügung. Sie muss mit den im Labor zur Verfügung stehenden Mitteln realisierbar sein. Ergänzend sollte herausgefunden werden, welche Aminosäuren mit Hilfe der gewählten Hydrolyse quantifizierbar bleiben. Des Weiteren müssen die Bedingungen der chromatografischen Trennung von Aminosäuren, mit der vorliegenden Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC)-Anlage optimiert werden. Dazu gehören die Art der Säule, die Beschaffenheit des Laufmittels, die Fließmittelgeschwindigkeit und der Einsatz einer Gradientenelution. Einen geeigneten Kontrollmechanismus zur Erfassung der Verluste während der Probenvorbereitung und der Analyse gilt es zu finden.

3 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Theorie und die Grundlagen in Bezug auf Proteine, Proteinhydrolyse, Aminosäuren, HPLC und Quantifizierung von Proteinen erläutert. Auf Grund des breiten Spektrums dieser Themenbereiche werden nur die für diese Arbeit benötigten Grundlagen näher erläutert.

3.1 Proteine

Proteine sind Makromoleküle mit einem vielfältigen Aufgabenbereich. Zu ihnen zählen auch die Enzyme. Ihre katalytische Wirkung ist für jegliche Stoffwechselprozesse unerlässlich. Nachfolgend wird auf die allgemein Entstehung eukaryotischer Proteine und Enzyme, von der DNA zum Protein, eingegangen. Der Aufbau und die daraus resultierenden Eigenschaften der entstandenen Proteine werden betrachtet. Im Anschluss folgt die Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Testproteine und ihres Aufbaus.

3.1.1 Proteinbiosynthese

Zu Beginn der Proteinbiosynthese wird ein *m-RNA-Template* benötigt. Diese m-RNA enthält die nötigen Informationen für das entsprechende Protein und die an der Biosynthese beteiligten Prozesse. Die m-RNA entsteht bei der Transkription, einem Prozess bei dem die DNA in m-RNA umgeschrieben wird. Zu den genauen Vorgängen der Transkription soll an dieser Stelle auf die gängige Fachliteratur verwiesen werden (Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger Biochemie*. S. 1349 ff.) Die Übersetzung der m-RNA in eine Aminosäureabfolge bzw. Polypeptidkette wird als Translation bezeichnet. Drei Basen kodieren jeweils für eine Aminosäure. Das Triplet wird auch Codon genannt. Besonders ist hierbei, dass ein Codon für eine Aminosäure steht, aber dieselbe Aminosäure von verschiedenen Codonen kodiert werden kann. Diese Degeneration des Codes hat zur Folge, dass falsch abgelesene Basen nicht zwangsläufig zu einer falschen Aminosäure an dieser Stelle führen müssen. Meistens variiert die letzte Base des Codons, dies wird als *wobble*-Effekt bezeichnet. Die letzte Base bindet weniger stark mit ihrem Anticodon an der t-RNA. Infolgedessen kann sich die t-RNA im weiteren Prozess leichter wieder ablösen, aber die Spezifität dieser Bindung lässt ebenfalls nach. Die beiden ersten Basen sind bestimmend für die einzubauende Aminosäure. Valin beispielsweise wird von vier, nur in der dritten Base variierenden, Triplets kodiert (Tabelle 3.1-1). Um die Aminosäuren mit der dazugehörigen t-RNA zu verbinden, müssen diese zuerst mit ATP aktiviert werden. Die Reaktion der Aminosäure mit dem Aminosäurearm der t-RNA wird durch Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen katalysiert. Für jede Aminosäure gibt es mindestens eine spezifische Synthetase. Sie kann ihre Aminosäure an die unterschiedlichen, für diese Aminosäure existenten t-

RNAs binden. Die Aktivierung dient im späteren Verlauf auch der Bildung der Peptidbindung. Die Translation findet, unter Energieaufwand in Form von GTP, in den Ribosomen statt und soll nachfolgend vereinfacht dargestellt werden. Daher wird auf Nennung der beteiligten Faktoren verzichtet und nochmals auf die Fachliteratur verwiesen (Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger Biochemie*. S. 1421 ff.).

Tabelle 3.1-1 Kodierung der Aminosäuren. Der genetische Code enthält die Informationen der Aminosäure-Reihenfolge innerhalb der Proteine. Ein Triplet codiert für eine Aminosäure. Eine Aminosäure kann aber von mehreren Codonen codiert werden. Man spricht von degeneriertem Code oder, da in der Regel nur das letzte Nukleotid variiert, vom *wobble*-Effekt. Da eine falsch eingebaute Aminosäure verheerende Folgen für die Funktion des Proteins haben kann, schützt sich der Organismus auf diese Weise. Eine falsch gelesene Base führt somit oftmals trotzdem zur richtigen Aminosäure.

		2. Base							
		U		C		A		G	
1. Base	U	UUU	Phenylalanin	UCU	Serin	UAU	Tyrosin	UGU	Cystein
		UUC	Phenylalanin	UCC	Serin	UAC	Tyrosin	UGC	Cystein
		UUA	Leucin	UCA	Serin	UAA	Stop	UGA	Stop
		UUG	Leucin	UCG	Serin	UAG	Stop	UGG	Tryptophan
	C	CUU	Leucin	CCU	Prolin	CAU	Histidin	CGU	Arginin
		CUC	Leucin	CCC	Prolin	CAC	Histidin	CGC	Arginin
		CUA	Leucin	CCA	Prolin	CAA	Glutamin	CGA	Arginin
		CUG	Leucin	CCG	Prolin	CAG	Glutamin	CGG	Arginin
	A	AUU	Isoleucin	ACU	Threonin	AAU	Asparagin	AGU	Serin
		AUC	Isoleucin	ACC	Threonin	AAC	Asparagin	AGC	Serin
		AUA	Isoleucin	ACA	Threonin	AAA	Lysin	AGA	Arginin
		AUG	Methionin/ Start	ACG	Threonin	AAG	Lysin	AGG	Arginin
	G	GUU	Valin	GCU	Alanin	GAU	Asparaginsäure	GGU	Glycin
		GUC	Valin	GCC	Alanin	GAC	Asparaginsäure	GGC	Glycin
		GUA	Valin	GCA	Alanin	GAA	Glutaminsäure	GGA	Glycin
		GUG	Valin	GCG	Alanin	GAG	Glutaminsäure	GGG	Glycin

In der Initialphase verbinden sich die kleine 40 S-Ribosomenuntereinheit beladen mit der Start-t-RNA und der m-RNA-Strang, den es zu übersetzen gilt. Nun lagert sich die große 60 S-Untereinheit an, sodass die Elongation beginnen kann. Die nächste zum Codon passende t-RNA lagert sich an den Strang an. Die an ihr gebundene Aminosäure greift das Carboxy-C-Atom der vorherigen Start-Aminosäure mit ihrer Aminogruppe an. Eine Peptidbindung ist entstanden und die erste Aminosäure wurde auf die zweite übertragen. Dieser Vorgang ist als Transpeptidierung bekannt. Um ein weiteres Codon zur Bindung von t-RNA im Ribosomen in die richtige Position zu bringen, folgt nun eine Translokation. Die nächste passende t-RNA kann am m-RNA-Strang binden und eine weitere Transpeptidierung findet statt. Dieser Vorgang wiederholt sich bis er durch ein Stop-Codon beendet wird. In diesem Fall wird die bis dahin entstandene Polypeptidkette auf ein Wassermolekül

übertragen und löst sich so vom Ribosomen ab (Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. S. 265 ff.). Die entstandene Polypeptidkette wird auf verschiedene Art und Weise prozessiert und transportiert, bis ein voll funktionsfähiges Protein entsteht. Nachfolgend werden der Proteinaufbau und die im Protein wirkenden Kräfte und Bindungen veranschaulicht.

3.1.2 Proteinaufbau

Der Proteinaufbau ist maßgeblich für die Funktionalität der Proteine. Auf Grund der Spezifität von Proteinen und Enzymen gibt es auf den vier Ebenen des Proteinaufbaus jeweils mehrere Konformationen. Im Ganzen betrachtet führt dies zu einem Entscheidungsbaum großen Ausmaßes, der für jedes Protein einen eigenen Weg aufzeigt. Schlussendlich ist in einem nativen Protein immer die thermodynamisch stabilste Konformation mit der niedrigsten freien Enthalpie anzutreffen. Sie wird durch Faltung des Proteins um die drehbaren Einfachbindungen erreicht. Bei diesem Prozess werden die hydrophoben Anteile ins Innere des Proteins verdrängt. So kann sich keine Solvathülle um sie bilden. Dadurch gewinnt die wässrige Lösung an Entropie, welche der freien Enthalpie des Proteins zu Gute kommt. Weitere wichtige Aspekte der Faltung sind die Wasserstoffbrücken und die ionischen Wechselwirkungen. Die Anzahl der Wasserstoffbrücken im Protein werden maximiert, da freie wasserstoffbrückenbildende Gruppen destabilisierend wirken. Sie werden kooperativ gebildet; fördern sich also selbst. Dadurch wird diese schwache Wechselwirkung zu einem der wichtigsten Strukturelemente der Proteine. Die ionischen Wechselwirkungen werden durch die hydrophoben Bedingungen im Inneren des Proteins begünstigt. Die dort entstehenden Salzbrücken sind besonders stark (Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger Biochemie*. S. 150 ff.).

Die Primärstruktur ist die erste der vier Ebenen. Sie wird durch die kovalente Bindung von Aminosäuren zu Peptiden gebildet (Abbildung 3.1-1).

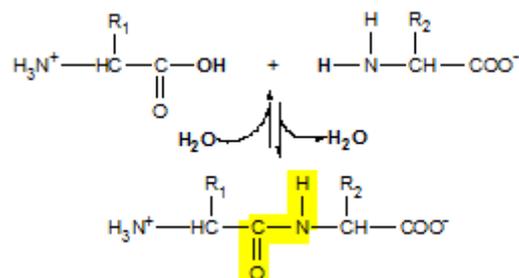


Abbildung 3.1-1 Entstehung einer Peptidbindung. Die Aminogruppe der rechten Aminosäure greift die Carboxygruppe der linken Aminosäure als Nukleophil an. Bei dieser Kondensationsreaktion wird Wasser abgespalten. Da die Hydroxygruppe sehr schwer abzuspalten ist, muss die Carboxygruppe unter Energieaufwand aktiviert werden. Dies geschieht unter ATP-Verbrauch bei der Bindung an die t-RNA. Die entstehende Peptidbindung ist gelb markiert.

Die Peptidbildung ist eine Kondensationsreaktion, die mit einer Dehydratation einhergeht. Dabei greift die α -Aminogruppe der einen Aminosäure die α -Carboxygruppe der anderen an. Die

Aminogruppe reagiert als Nukleophil, da sie eine hohe Elektronendichte besitzt. Das C-Atom der Carboxygruppe ist durch die beiden gebundenen Sauerstoffe mit höherer Elektronegativität positiviert. Thermodynamisch liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite der Edukte, da die Hydroxygruppe bekanntermaßen eine schwer abzuspaltende Gruppe ist. Die Kondensation ist gerade daher im Biologischen eine gesteuerte Reaktion, da immer eine Aktivierung der Aminosäure vorausgehen muss. Dies geschieht bei der Bindung der Aminosäure an die t-RNA unter ATP-Verbrauch, wie im vorherigen Kapitel erwähnt. Da die Peptidbindung maßgeblich für den Proteinaufbau ist, soll hier noch einmal näher darauf eingegangen werden. Sie ist äußerst stabil, da eine Auflösung dieser Bindung durch Hydrolyse sehr langsam verläuft. Unter gewöhnlichen Bedingungen ergibt sich eine Halbwertszeit von 7 Jahren (Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger Biochemie*. S. 109). Die Haltbarkeit dieser Bindung ist in der Mesomeriestabilisierung begründet. Sie ist durch die Doppelbindung zum Sauerstoff möglich. Diese kann zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffatom wandern. Der permanente Wechsel ergibt für die C-N-Bindung eine Bindungslänge zwischen Einzel- und Doppelbindung (Abbildung 3.1-2). Sie ist der Grund für die Stabilität dieser Bindung und trägt zur Strukturbildung bei, denn die entstehende Bindung ist nicht mehr rotationsfähig. Somit liegen die Peptidbindung und die daran gebundenen Aminosäurereste in einer Ebene. Diese Eigenschaft wird von den darüber liegenden Strukturelementen genutzt.

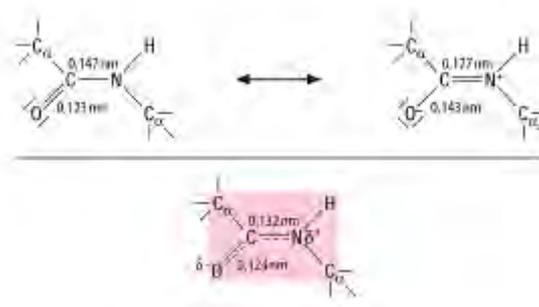


Abbildung 3.1-2 Mesomerie der Peptidbindung. Die entstehende Peptidbindung bei der Kondensation zweier Aminosäuren ist mesomeriestabilisiert. Sie hat einen partiellen Doppelbindungscharakter. Daher ist die C-N-Bindung nicht frei drehbar und somit liegen die Peptidbindung und die beiden α -C-Atome der Aminosäuren in einer Ebene (Löffler, Georg: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, S. 27).

Polypeptide haben in der Regel ein Molekulargewicht von unter 10.000 Dalton. Darüber hinaus spricht man von einem Protein, da Polypeptide ab dieser Größe zur Bildung einer räumlichen Struktur neigen (Christen, P.; Jaussi, R.: *Biochemie*. S. 23 f.).

Die sich anschließende Ebene ist die Sekundärstruktur. Hier wird die Polypeptidkette verdichtet. Bei der Sekundärstruktur sind zwei unterschiedliche Struktur motive bekannt: α -Helix und β -Faltblatt. Beide werden durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisiert (Abbildung 3.1-3) und sind in Proteinen zahlreich vorhanden.

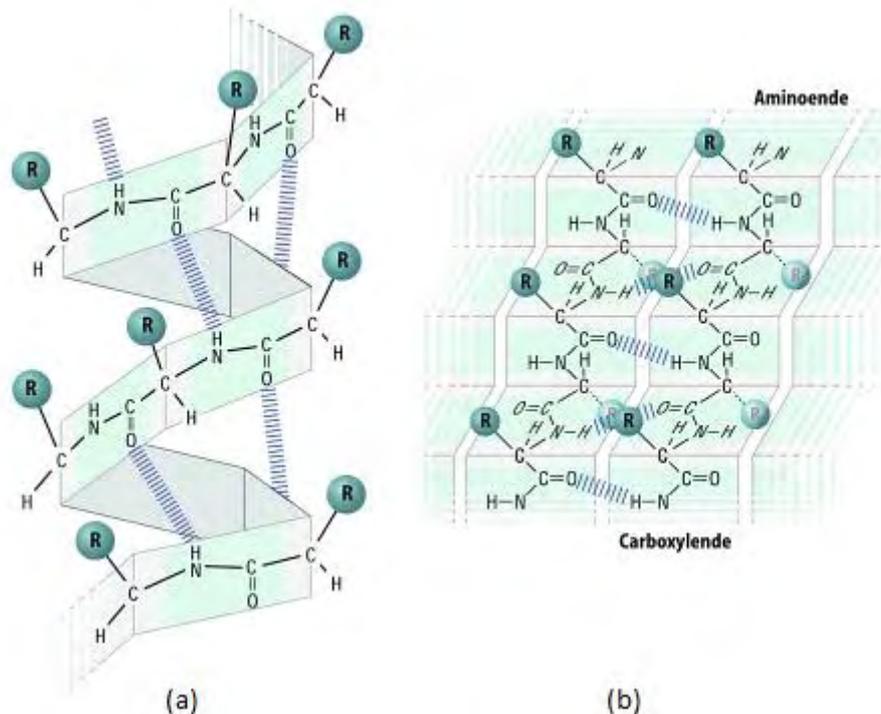


Abbildung 3.1-3 Sekundärstrukturen. Zwei Struktur motive sind möglich: α -Helix und β -Faltblatt. Beide werden durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. (a) zeigt die α -Helix, in ihrer üblichen rechtsgängigen Form. (b) wiederum zeigt das β -Faltblatt. In diesem Fall verlaufen die Peptidketten parallel zu einander, aber auch antiparallel. Zusammenschlüsse sind üblich. Die Struktur wurde nach der zickzackförmigen Anordnung der Peptidketten benannt (Abb. aus: Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, S. 28).

Die darauffolgende Tertiärstruktur verleiht dem Protein seine räumliche Gestalt. Hier wirken wie bei der Sekundärstruktur Wasserstoffbrückenbindungen, aber auch hydrophobe Wechselwirkungen, Ionen- und Disulfidbindungen. Hydrophobe Bereiche des Proteins lagern sich zusammen und verdrängen die ubiquitären Wassermoleküle. Auf diese Weise wird das Protein stabilisiert. Die Ionenbindungen entstehen durch die Zusammenlagerung von verschiedenen geladenen Seitenketten der Aminosäuren. Nach dieser Auffaltung des Proteins bilden sich noch zusätzlich die stabilisierenden Disulfidbrücken aus. Sie entstehen durch eine kovalente Bindung zweier Schwefelatome des Cysteins. Ist das betrachtete Protein oder Enzym ein Monomer, so ist die Tertiärstruktur die native Form. Sie kann verschiedene funktionelle Untereinheiten enthalten, die Domänen genannt werden. Viele Proteine bestehen aus Di- oder Tetrameren, können aber auch wesentlich mehr Untereinheiten beinhalten. Die Zusammenlagerung der Untereinheiten bildet die Quartärstruktur aus.

3.1.3 Testproteine BSA und Lysozym

In diesem Kapitel werden die verwendeten Proteine BSA und Lysozym vorgestellt. Das bovine Serumalbumin (BSA), auch Rinderserumalbumin genannt, zählt zu den bekanntesten Proteinen und wird in Proteinassays als Kalibrier- bzw. Referenzmaterial verwendet. Daher ist es sehr gut geeignet, eine Proteinquantifizierungsmethode auszutesten. BSA hat ein Molekulargewicht von 66.430 Da und besteht in seiner funktionsfähigen Form aus 583 Aminosäuren. Die exakte Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 3.1-2 zu finden. Die Sequenz wurde erst 1990 korrekt entschlüsselt und das Molekulargewicht bestimmt (vgl. Hirayama, K. et al.: *Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS*. S. 639 ff.). BSA zählt zu den Albuminen. Diese globulären Proteine sind in Blut, Gewebe, Milch und Eiern zu finden. Sie haben die Aufgabe den kolloidosmotischen Druck aufrechtzuerhalten und wasser-unlöslichen Stoffen, durch Bindung an das Albumin, Wasserlöslichkeit zu vermitteln. Da bei der Rinderschlachtung Blut als Abfallprodukt auftritt, ist die Gewinnung von BSA kostengünstig.

Tabelle 3.1-2: Aminosäurezusammensetzung von BSA und Lysozym. Mit Hilfe der ermittelten Aminosäuresequenzen lässt sich die Zusammensetzung der Proteine auszählen. In den linken zwei Spalten befinden sich die Werte für BSA, in den rechten die für Lysozym. Die grün hinterlegten Aminosäuren wurden zur Quantifizierung herangezogen. Zu beachten ist, dass Asparaginsäure und Glutaminsäure (grün markiert) die Anzahl an Asparagin und Glutamin enthalten.

BSA		Lysozym	
Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl
Asp (D)	40	Asp (D)	7
Asn (N)	14	Asn (N)	14
Glu (E)	59	Glu (E)	2
Gln (Q)	20	Gln (Q)	3
Asp (Asx)	54	Asp (Asx)	21
Glu (Glx)	79	Glu (Glx)	5
Ala (A)	46	Ala (A)	12
Phe (F)	27	Phe (F)	3
Leu (L)	61	Leu (L)	8
Lys (K)	59	Lys (K)	6
Arg (R)	23	Arg (R)	11
Cys (C)	35	Cys (C)	8
Gly (G)	16	Gly (G)	12
His (H)	17	His (H)	1
Ile (I)	14	Ile (I)	6
Met (M)	4	Met (M)	2
Pro (P)	28	Pro (P)	2
Ser (S)	28	Ser (S)	10
Thr (T)	34	Thr (T)	7
Trp (W)	2	Trp (W)	6
Tyr (Y)	20	Tyr (Y)	3
Val (V)	36	Val (V)	6
Gesamt:	583	Gesamt:	129

Als zweites Testprotein wird Lysozym genutzt. Auswahlkriterium hierfür ist zum einen der Größenunterschied von BSA und Lysozym. Mit einem Molekulargewicht von 14.307 Da (Canfield: *The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme*. S. 2706) und nur 129 Aminosäuren (Tabelle 3.1-2), ist Lysozym fast ein Fünftel kleiner als BSA. Zum anderen ist Lysozym ein seit Langem gut bekanntes Protein und günstig in seiner Herstellung. Die Aminosäuresequenz wurde bereits 1963 von Robert E. Canfield bis auf eine Aminosäure korrekt entschlüsselt (Abbildung 3.1-4). Dies hat einen großen Beitrag zum Verständnis des enzymatischen Wirkmechanismus geleistet. Lysozym gehört durch seine antibakterielle Wirkung zur angeborenen Immunabwehr vieler Lebewesen, z.B. bei Säugetieren und Vögeln. Das hier verwendete Lysozym vom Typ C wurde aus Hühnereiklar gewonnen. Bei Hühnern ist auch Lysozym vom Typ G anzufinden, jedoch in wesentlich niedrigeren Konzentrationen.

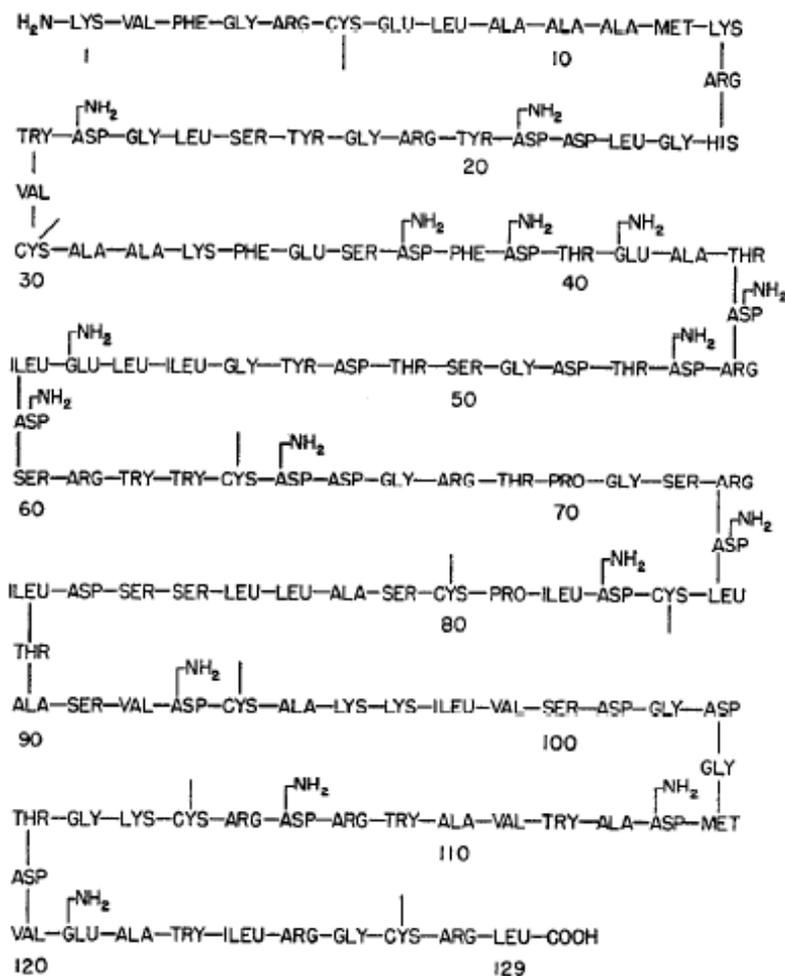


Abbildung 3.1-4 Aminosäuresequenz von Lysozym aus dem Jahre 1963. Diese Sequenz ist bis auf eine Aminosäure mit der nach heutigem Stand der Technik identisch. Bei der Aminosäure 103 handelt es sich nicht um Asparaginsäure, sondern um Asparagin. Besonders ist bei dieser älteren Schreibweise die Abkürzung von Tryptophan, hier als TRY. Heute wird einheitlich TRP verwendet. Bei den die Schreibweisen von Asparagin und Glutamin wird eine Aminogruppe an die jeweilige saure Form der Aminosäure gehängt, um den Unterschied zu verdeutlichen. Die heute üblichen Abkürzungen ASN und GLN sind damals nicht verwendet worden. (Abb. aus: Canfield: *The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme*, S. 2706)

3.2 Hydrolyse von Proteinen

Um die im vorherigen Kapitel vorgestellten Proteine zu quantifizieren, müssen alle Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren gespalten werden. Nur so ist die Proteinmengenbestimmung mittels Aminosäureanalytik möglich. Wie im Kapitel 3.1.2 bereits erwähnt, ist die natürliche Hydrolyse ein sehr langsamer Prozess. Dieser kann durch die Zugabe von sauren oder alkalischen Lösungen, durch Mikrowellenstrahlung oder mittels enzymatischen Verdaus beschleunigt werden. Daraus entsteht eine Vielfalt an Hydrolysemethoden mit ihren individuellen Vor- und Nachteilen. Um aus diesem Spektrum die richtige Methode zur Beantwortung der Fragestellung zu wählen, sollen zunächst die Anforderungen an die Hydrolyse definiert werden.

Zur Quantifizierung eines Proteins muss mindestens eine Aminosäure analysiert werden. Verlässlichere Ergebnisse werden mit der Analytik mehrerer Aminosäuren erzielt. Die genutzte Methode soll einfach in ihrer Anwendung und im apparativen Aufwand sein, da die Wiederholbarkeit auch bei wechselndem Analytiker gegeben sein muss. Die nötige Hydrolysezeit ist so gering wie möglich zu halten, da die Dauer der Hydrolyse in den meisten Fällen der beschränkende Faktor für die Anzahl der Proteinquantifizierungen ist. Das zukünftige Probenaufkommen ist als gering einzuschätzen. Zu erwarten sind zwei bis drei Proben aus einer vorherigen Proteinaufreinigung. Außerdem sollen die zu analysierenden Aminosäuren in gleichbleibender Qualität voneinander getrennt werden.

Auf Grund dieser Anforderungen lassen sich nach gründlichem Literaturstudium einige Methoden grundsätzlich ausschließen. Dazu zählt die enzymatische Spaltung. Sie findet in der Praxis nur selten Anwendung, da sie aufwendig und zeitintensiv ist. Verschiedene Proteasen müssen genutzt werden, da sie Aminosäureketten meist nur an spezifischen Stellen spalten. Vielfach wird daher ein Gemisch aus spezifischen und unspezifischen proteinspaltenden Enzymen eingesetzt. Da Enzyme jedoch unterschiedliche pH-Wert- und Temperaturoptima besitzen, ist bei dieser Methode eine langandauernde Optimierung der Zusammensetzung des Proteasegemisches sowie der Reaktionsbedingungen absehbar. Außerdem entstehen durch die Enzyme zusätzliche Kosten, die nicht zu vernachlässigen sind (Lösche, K.: *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie*. S. 271 ff.).

Die Mikrowellenhydrolyse ist die Methode mit dem geringsten Zeitaufwand. Bei dieser Methode wird die Ausbeute der Aminosäuren Threonin und Serin leicht verringert. Da sie sonst aber exakte Ergebnisse liefert und in nur vier Minuten durchführbar ist, ist sie die Methode der Wahl für einen hohen Durchsatz an Proteinquantifizierungen (Weiss, M. et al.: *Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of protein*. S. 265 ff.). Mit dieser Methode ist aber auch

die Anschaffung einer speziellen Mikrowelle verbunden. Im Vergleich zu üblichen Haushaltsmikrowellen lässt sich die Temperatur im Probengefäß exakt steuern. Daher sind die Anschaffungskosten für diese Labormikrowellen hoch. Eine für die Hydrolyse von Proteinen geeignete Mikrowelle z.B. der Firma CEM kostet 23.400 € (Fa. CEM, 2014).

Eine weitere Möglichkeit ist die alkalische Hydrolyse. Sie wird nahezu ausschließlich zur Bestimmung von Tryptophan genutzt. Tryptophan ist unter basischen Bedingungen stabil. Bei der sauren Hydrolyse zerfällt es. Dafür werden Serin, Threonin, Arginin und Cystein zerstört und die übrigen Aminosäuren racemisiert (Fountoulakis, M.; Lahm, H.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. S. 114 f.). Daher ist auch diese Methode ungeeignet.

Nach Ausschluss der oben genannten Methoden verbleibt die saure Hydrolyse mit Salzsäure oder mit Methansulfonsäure. Die Hydrolyse mit Methansulfonsäure erlaubt die Analyse von Tryptophan und Methionensulfoxid, einem sehr leicht herzustellenden Oxid des Methionins. Diese beiden Aminosäuren werden bei der sauren Hydrolyse mit Salzsäure zerstört. Die übrigen proteinogenen Aminosäuren sind ebenfalls mit der Methansulfonsäure-Methode quantifizierbar (Fountoulakis, M.; Lahm, H.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. S. 112 f.). Nachteil dieser Analyse sind die entstehenden Kosten. Methansulfonsäure ist nahezu 5-mal teurer als 37 %ige Salzsäure.

Die am weitesten verbreitete Methode ist die Hydrolyse mit 6 mol/L Salzsäure bei 110 °C für 22 h bis 24 h (Hirs, C.H.W.; Stein, W.H.; Moore, S.: *The amino acid composition of ribonuclease*. S. 942). Dabei werden Asparagin und Glutamin vollständig zu Asparaginsäure und Glutaminsäure hydrolysiert. Diese Tatsache kann bei der Berechnung der Proteinkonzentration berücksichtigt werden. Während der Hydrolyse werden die Aminosäuren Tryptophan und Cystein vollständig und Tyrosin partiell zerstört. Sollen Cystein und Tyrosin quantifiziert werden, muss die Hydrolyse im Vakuum stattfinden, um die Ausbeute zu erhöhen. Das führt zu einem höheren apparativem und zeitlichem Aufwand (Moore, S.; Stein, W.H.: *Chromatographic Determination of Amino Acids by the Use of Automatic Recording Equipment*. S. 821). Serin, Threonin und Methionin werden teilweise hydrolysiert und bis zu 10 % zerstört. Um den Verlusten vorzubeugen, können Additive zur Salzsäure gegeben werden. Typischerweise sind hier Phenol und Mercaptoethanol zu nennen.

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass Bindungen zwischen Isoleucin und Valin besonders stabil sind und sich nach 24 h erst 50 % bis 70 % der Peptidbindungen lösen. Erst bei einer Hydrolysezeit von 92 h bis 120 h werden diese stabilen Verbindungen gespalten (Fountoulakis, M.; Lahm, H.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. S. 111 f.). Diese Dauer ist nicht erstrebenswert, denn die anderen Aminosäuren erfahren durch sie einen höheren Abbau und die gesamte Analysezeit verlängert sich. Eine Zusammenfassung aller Veränderungen durch die saure Hydrolyse mit 6 N HCl gewährt Tabelle 3.2-1.

Tabelle 3.2-1 Verhalten der proteinogenen Aminosäuren während der sauren Hydrolyse. Diese Tabelle zeigt die Veränderungen der einzelnen Aminosäuren während der Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110 °C. Zehn Aminosäuren gehen unverändert aus der Hydrolyse hervor und eignen sich somit zur Quantifizierung.

Aminosäure	Verhalten während der Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110 °C
Alanin	Keine Veränderung
Arginin	Keine Veränderung
Asparagin	Hydrolysiert zu Asparaginsäure
Asparaginsäure	Keine Veränderung
Cystein	Wird zerstört
Glutamin	Hydrolysiert zu Glutaminsäure
Glutaminsäure	Keine Veränderung
Glycin	Keine Veränderung
Histidin	Keine Veränderung
Isoleucin	Schwer von Valin & Isoleucin zu spalten
Leucin	Keine Veränderung
Lysin	Keine Veränderung
Methionin	Teilweise hydrolysiert & teilweise zerstört
Phenylalanin	Keine Veränderung
Prolin	Keine Veränderung (aber nicht mit OPA derivatisierbar, da sek. Aminosäure)
Serin	Teilweise hydrolysiert & teilweise zerstört
Threonin	Teilweise hydrolysiert & teilweise zerstört
Tryptophan	Wird zerstört
Tyrosin	Partiell zerstört
Valin	Schwer von Isoleucin & Valin zu spalten

Die obige Tabelle zeigt, dass zehn Aminosäuren unverändert aus der Hydrolyse mit HCl hervorgehen. Prolin kann, obwohl es sich während der Hydrolyse nicht verändert, nicht zur Quantifizierung verwendet werden. Da es sich bei Prolin um eine sekundäre Aminosäure handelt, ist eine Derivatisierung mit OPA, ohne zusätzlichen Aufwand, nicht möglich. Von den verbleibenden Aminosäuren wurden die folgenden sechs gewählt (Abbildung 3.2-1).

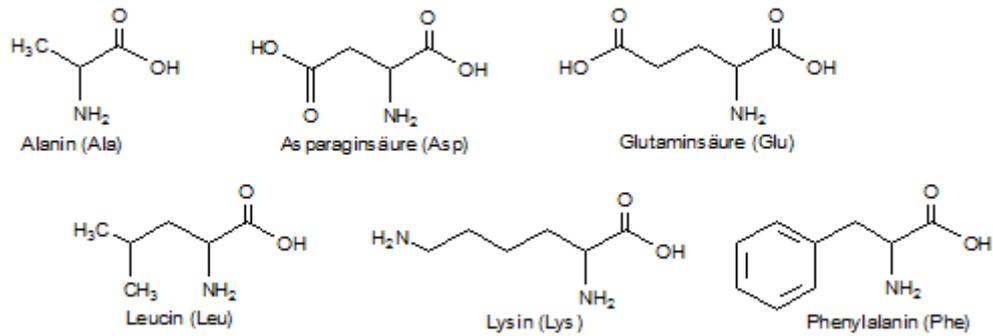


Abbildung 3.2-1: Die sechs Analyten. Die Abbildung zeigt die sechs Aminosäuren, denen während der Hydrolyse keine Veränderungen widerfahren. Sie können zur Quantifizierung eines Proteins genutzt werden. Rechnerisch zu berücksichtigen ist hierbei die Hydrolysierung von Asparagin und Glutamin zu Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Die Aminosäuren weisen aufgrund ihres Aufbaus unterschiedliche Eigenschaften auf und sind somit eine repräsentative Auswahl für alle Aminosäuren. Da die Aminosäuren den Analyten darstellen, sind ihre Eigenschaften und ihr Aufbau für diese Arbeit von besonderer Bedeutung. Daher werden diese Themen im folgenden Kapitel erläutert.

3.3 Aminosäuren

Aminosäuren bestehen mindestens aus einer primären Aminogruppe und einer Carboxygruppe. Aufgrund dieses Aufbaus sind Aminosäuren amphoter. Sie können sowohl als schwache Base infolge der Aminogruppe sowie als schwache Säure durch die Carboxygruppe reagieren. Die Ladungen der Gruppen sind abhängig vom pH-Wert und können sich gegenseitig ausgleichen. Äußerlich erscheint die Aminosäure ungeladen und wandert nicht mehr im elektrischen Feld, obwohl positive und negative Ladungen vorhanden sind. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet und das Molekül als Zwitterion.

Die Position der Aminogruppe ist bezeichnend für den allgemeinen Aufbau. Bindet sie am α -C-Atom, so ist es eine α -Aminosäure. Das gleiche gilt für die Bindung an β - und γ -C-Atomen (Abbildung 3.3-1). Alle 20 proteinogenen Aminosäuren sind α -Aminosäuren. Sie werden nach IUPAC als 2-Aminocarbonsäuren bezeichnet.

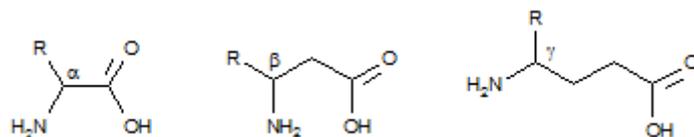


Abbildung 3.3-1 Aufbau von Aminosäuren. Sie bestehen aus mindestens einer primären Aminogruppe und einer Carboxygruppe. Betrachtet wird die Position der Amino- zur Carboxygruppe in α -, β - und γ -Stellung. Daher unterscheidet man α -, β - und γ -Aminosäuren. Laut IUPAC handelt es sich um 2-, 3- oder 4-Aminocarbonsäuren.

Der organische Rest am Aminosäuremolekül variiert. Dies führt zu basischen, sauren, unpolaren und verschieden stark polaren Aminosäuren (Abbildung 3.3-2). Die sechs Analyten stammen aus den genannten vier Gruppen. Mit dieser Auswahl sind die Eigenschaften der Aminosäuren breit gefächert. Chromatografisch lassen sie sich dadurch besser voneinander trennen, denn je ähnlicher

Moleküle sich sind, desto schwieriger ist eine gute Trennung der Peaks zu erreichen. Das ist in diesem Fall besonders wichtig aufgrund der verwendeten Derivatisierung. Erläuterungen dazu sind in Kapitel 3.4 zu finden. Anhand der Seitenketten lässt sich nun auch das Verhalten der Aminosäuren während der sauren Hydrolyse nachvollziehen (vgl. Tabelle 3.2-1). Asparagin und Glutamin werden desaminiert. Die Aminogruppe am Säureamid wird als Ammoniumion abgespalten. Durch die Anlagerung einer Hydroxygruppe entsteht eine Carboxygruppe. Somit wird Asparagin, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, zu Asparaginsäure und Glutamin zu Glutaminsäure. Durch die ringförmige Struktur des Prolins liegt hier eine sekundäre Aminosäure vor. Somit ist diese Aminosäure, wie bereits erwähnt, nicht zur Quantifizierung geeignet.

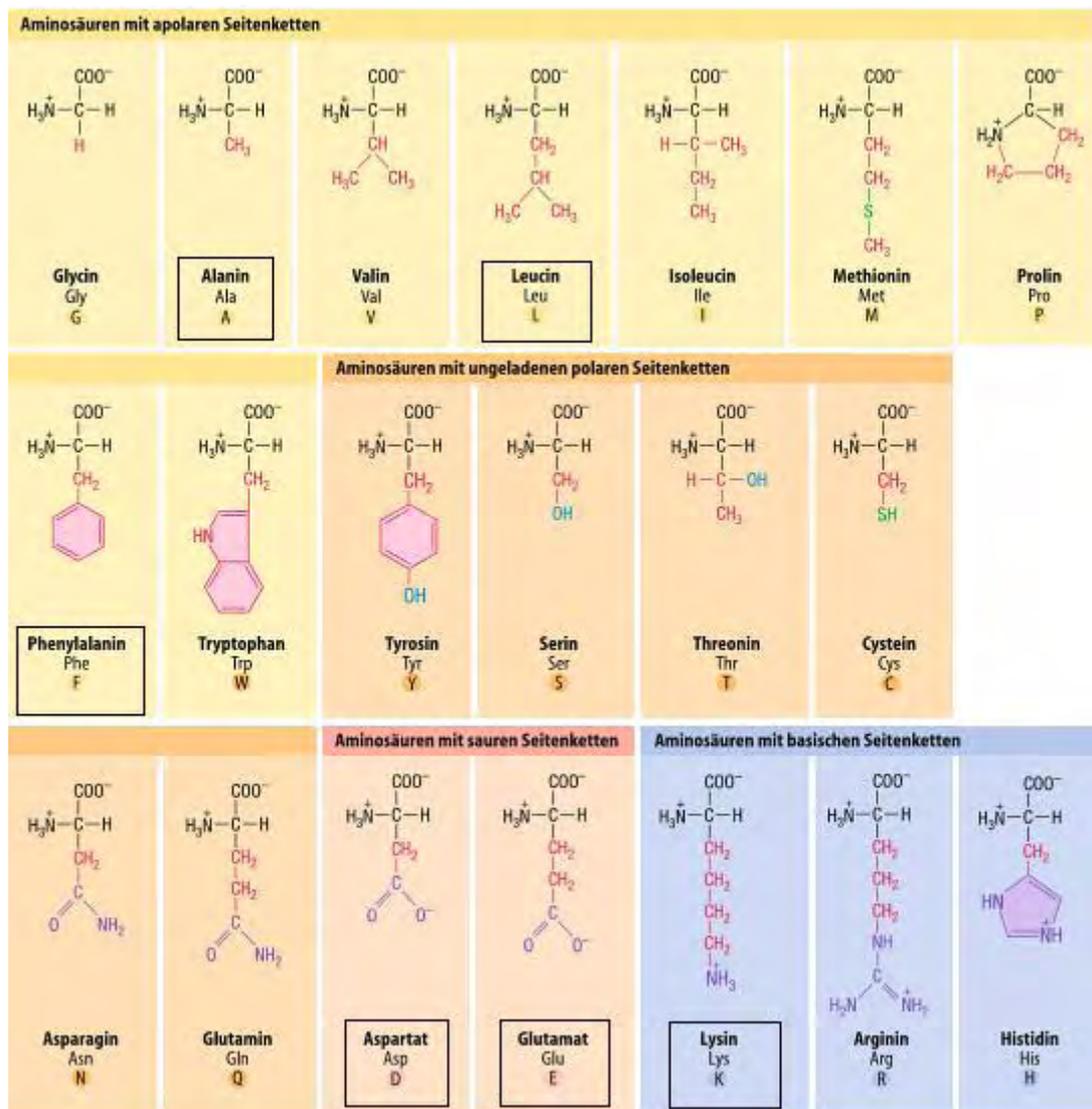


Abbildung 3.3-2 Proteinogene Aminosäuren. Alle proteinogenen Aminosäuren sind hier, geordnet nach den Eigenschaften ihrer Seitenketten, dargestellt. Die genutzten Analyten sind mit einem Rechteck markiert. Anhand der Struktur ist ersichtlich, dass Aminosäuren mit Hydroxy- oder Thiolgruppen besonders anfällig sind, bei der Hydrolyse mit Salzsäure Schaden zu nehmen. (Abb. modifiziert nach: Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. S. 14).

Aminosäuren mit einer Hydroxygruppe sind schwieriger zu hydrolysieren und werden unter den Hydrolysebedingungen leicht zerstört. Daher ist hier mit Verlusten von bis zu 10 % zu rechnen (Fountoulakis, M.; Lahm, H.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. S. 111). Ähnlich verhält es sich bei Aminosäuren mit Thiol- oder Thioethergruppe. Cystein und Methionin werden ebenfalls leichter während der Hydrolyse zerstört. Besonders Cystein ist hier betroffen, da das Schwefelatom in der Thiolgruppe leichter zugänglich ist als im Thioether. Valin und Isoleucin sind schwer voneinander trennbar, da die aliphatischen Seitenketten über Van-der-Waals-Kräfte miteinander reagieren. Außerdem kommt es zu einer sterischen Hinderung der Entfaltung der Tertiärstruktur bedingt durch diese zusätzlichen Wechselwirkungen. Leucin ist trotz seiner Struktur nicht von diesem Effekt betroffen.

Alle proteinogenen Aminosäuren, mit Ausnahme von Glycin, weisen mindestens ein Stereozentrum am α -C-Atom auf. Von ihnen existieren zwei Enantiomere; die D- und die L-Form. Isoleucin und Threonin besitzen zwei Stereozentren und somit vier Entantiomere. Von Bedeutung für die Proteinbildung ist nur die L-Form der jeweiligen Aminosäure. Bei allen im Folgenden genannten Aminosäuren handelt es sich um die L-Form, soweit nicht anders bezeichnet.

Aminosäuren werden oftmals zur besseren Übersicht und Datenverarbeitung abgekürzt. Zwei Systeme haben sich hierbei entwickelt; die drei- und die ein- Buchstaben-Schreibweise (Tabelle 3.3-1). Für biologische Moleküle hat sich die Angabe der einheitenlosen relativen Molekülmasse etabliert, die in ihrem Zahlenwert der molaren Masse entspricht. Zum besseren Verständnis der darauf basierenden Rechnungen wird in dieser Arbeit die einheitenbehaftete molare Masse der Aminosäuren verwendet.

Tabelle 3.3-1 Die 20 proteinogenen Aminosäuren. Hier aufgezeigt sind die Standardaminosäuren mit ihren drei- und einbuchstabigen Abkürzungen sowie ihrer molaren Masse in Gramm pro Mol. Diese Massen sind für alle darauf beruhenden Rechnungen genutzt worden. Die in Fettschrift formatierten Aminosäuren stellen die genutzten Analyten dar.

Aminosäure	Abkürzung 3 Buchstaben	Abkürzung 1 Buchstabe	Molare Masse [g/mol]
Alanin	Ala	A	89,094
Arginin	Arg	R	174,204
Asparagin	Asn	N	132,119
Asparaginsäure	Asp	D	133,103
Cystein	Cys	C	121,154
Glutaminsäure	Glu	E	147,130
Glutamin	Gln	Q	146,146
Glycin	Gly	G	75,067
Histidin	His	H	155,157
Isoleucin	Ile	I	131,175
Leucin	Leu	L	131,175
Lysin	Lys	K	146,190
Methionin	Met	M	149,208
Phenylalanin	Phe	F	165,192
Prolin	Pro	P	115,132
Serin	Ser	S	105,093
Threonin	Thr	T	119,120
Tryptophan	Trp	W	204,229
Tyrosin	Tyr	Y	181,191
Valin	Val	V	117,151

Neben den proteinogenen Aminosäuren gibt es auch Aminosäuren, die nicht dem Aufbau von Proteinen dienen. Beispielhaft seien hier einige der bekanntesten nichtproteinogenen Aminosäuren genannt: L-DOPA (ein Katecholamin), Gamma-Aminobuttersäure (GABA, ein Neurotransmitter), β -Alanin (Bestandteil von Coenzym A). Eine weitere nichtproteinogene Aminosäure ist die α -Aminobuttersäure (AABA, Abbildung 3.3-3). Sie wird in dieser Arbeit als interner Standard verwendet und bei der Hydrolyse mitgeführt. Durch sie ist es möglich Signalintensitätsschwankungen bedingt durch die Derivatisierung sowie Verluste bei der Hydrolyse rechnerisch auszugleichen.

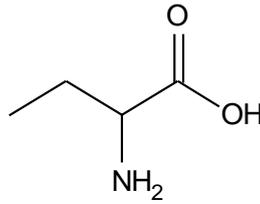


Abbildung 3.3-3 α -Aminobuttersäure. Diese nicht proteinogene Aminosäure wird als interner Standard verwendet, um Verluste, maßgeblich während der Hydrolyse, rechnerisch ausgleichen zu können. Sie ist strukturell der Buttersäure ähnlich und unterscheiden sich nur durch eine Substitution der Aminogruppe durch ein Wasserstoffatom voneinander. Der buttersäuretypische Geruch wird durch die Aminogruppe entfernt. AABA und der Neurotransmitter GABA sind Konstitutionsisomere.

In den bisherigen Kapiteln wurde zunächst das Probenmaterial beschrieben, die Proteine die es zu quantifizieren gilt. Darauf folgte die Probenvorbereitung die erforderlich ist, um die Analyten zu gewinnen, die durchzuführende Hydrolyse. Als letztes wurde die Auswahl der Analyten näher erläutert. Das nächste Kapitel wird sich der chromatografischen Analyse widmen.

3.4 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie oder *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ist ein chromatografisches Verfahren zur Analyse. Die HPLC ist eine Unterart der Flüssigchromatographie oder *Liquid Chromatography* (LC). Bei einer Flüssigchromatografie gibt es eine flüssige mobile Phase und eine feste stationäre Phase. Zwischen diesen Phasen findet die Trennung der zu analysierenden Substanzen statt. Die stationäre Phase besteht in dieser Arbeit aus Partikeln, die zu einer Säule, innerhalb einer Kartusche, gepackt werden. Somit gehört die HPLC zu den Säulenchromatografien. Die erste säulenchromatografische Methode wurde von Michail Tswett 1906 eingeführt (Tswett, M.: *Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls*. S. 385 ff.).

Die in dieser Arbeit genutzte RP-18-Säule ist eine *Reversed Phase*- oder Umkehrphasen-Säule. Das Säulenmaterial besteht aus 4 μm großen kugelförmigen Partikeln aus Silicagel, an dem die 18 C-Atome langen Kohlenwasserstoffketten gebunden sind. Das genutzte Säulenmaterial von Merck wird Superspher[®] genannt. Es ist besonders gut für die effiziente Trennung von komplexen Trennproblemen geeignet. Die theoretische Bodenzahl, die als ein Maß für die Trennleistung einer Säule gilt, liegt bei diesem Material bei 100.000 theoretischen Böden pro Meter. Im Vergleich dazu kommt eine Säule mit LiChrospher[®] gepackt nur auf 55.000 theoretische Böden pro Meter. LiChrospher[®] Partikel sind aber durchschnittlich auch 1 μm größer, dies verkleinert die zur Trennleistung beitragende Oberfläche. Die Porengrößen sind bei beiden Materialien gleich (Merck KGaA: *ChromBook*, S.222 ff.). Das genutzte Material ist also gut geeignet auch strukturell ähnliche Moleküle noch voneinander trennen zu können.

Mit dieser hydrophoben Oberfläche treten die Aminosäuren in Wechselwirkung. Die Zeiträume und die Häufigkeit dieser Wechselwirkungen werden von den Eigenschaften der Aminosäuren bestimmt. Durch die aliphatischen Kohlenwasserstoffketten entsteht auf der Oberfläche der festen Partikel ein Bereich, der sich ähnlich einer flüssigen Phase verhält. Dies geschieht durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Kohlenwasserstoffketten. Die Aminosäuren werden nicht nur an dem Säulenmaterial adsorbiert sondern sie können sich auch in der „flüssigen Phase“ der Partikel verteilen. Hydrophobe Aminosäuren verweilen dadurch länger in der Säule als hydrophilere.

Bei der Verteilung der Aminosäuren zwischen der stationären und der mobilen Phase wird immer wieder ein Gleichgewicht zwischen den Phasen hergestellt, vergleichbar mit der Gleichgewichtseinstellung einer Extraktion in einem Schütteltrichter. Diese vereinfachte Beschreibung der Retention berücksichtigt noch nicht die Veränderungen der Aminosäuren durch die Vorsäulenderivatisierung. Sie erhöht die Hydrophobizität der Aminosäure (Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.): *Bioanalytik*. S. 340). Dazu wird ein ortho-Phthaldialdehyd (OPA)-Reagenz verwendet. Der genaue Ablauf der Derivatisierung ist im Kapitel 4.3 zu finden. Durchgeführt wird die Methode von einem in der Anlage verbauten, programmierbaren Autosampler. Dies spart Arbeitsaufwand und erhöht die Präzision. Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass sich die Aminosäuren nach der Derivatisierung weniger stark voneinander unterscheiden. Das wird in der Wahl des Säulenmaterials und der Säulenlänge berücksichtigt. Mit einer Länge von 25 cm zählt die Säule zu den längeren in der HPLC. Nur mit dieser Kombination ist eine akzeptable Peaktrennung möglich.

Bei der HPLC werden Pumpen verwendet, um feinere Partikel für eine bessere Trennung nutzen zu können. Dabei entstehen im Falle der genutzten Anlage Drücke von bis zu 350 bar. Der schematische Aufbau einer modernen HPLC-Anlage ist auf Abbildung 3.4-1 zu sehen. Im Fall der verwendeten Anlage gibt es zwei Pumpen und es können maximal vier Laufmittel genutzt werden. Sie können einzeln, aber auch als Gemische Verwendung finden. Man unterscheidet außerdem die isokratische Trennung, hier bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während des gesamten Laufes konstant, von der Trennung mit Hilfe einer Gradientenelution. Bei letzterer verändert sich die mobile Phase über die Zeit der Analyse. Der Anteil einer oder mehrerer Komponenten kann zu- oder abnehmen. Dadurch ist es möglich, die Polarität des Fließmittels während des Laufes zu ändern und so noch präzisere Trennungen, aber auch eine kürzere Gesamtlaufzeit zu erreichen.

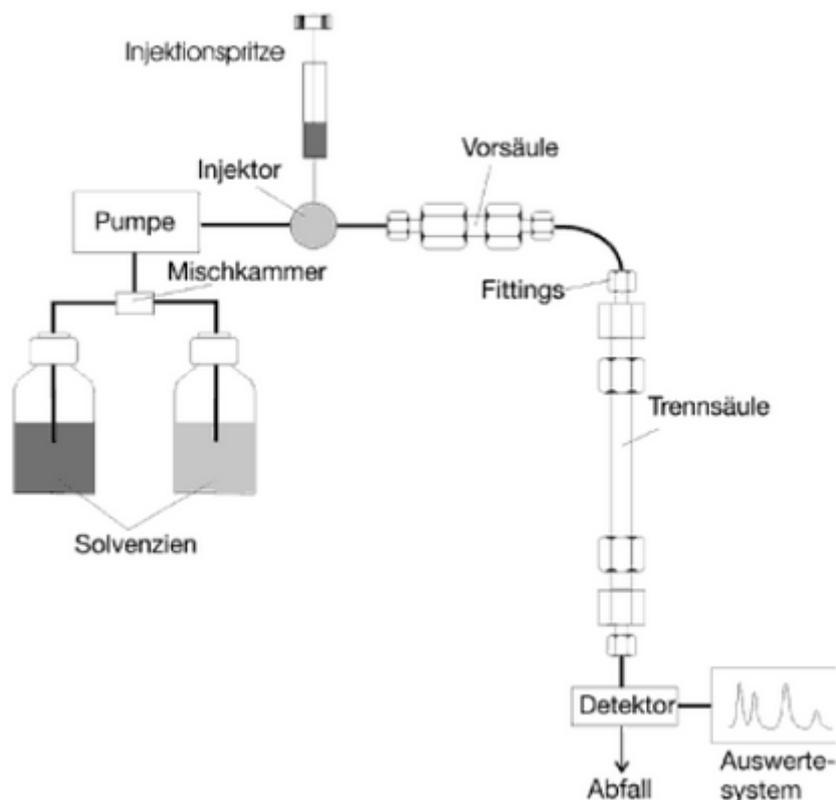


Abbildung 3.4-1 Aufbau einer HPLC-Anlage mit Vorsäule. Die Abbildung zeigt den grundsätzlichen Aufbau einer HPLC-Anlage. Die vorhandenen Laufmittel werden über eine Pumpe gefördert und können in verschiedenen großen Anteilen in der Mischkammer gemischt werden. Darauf folgt der Injektor. Hier wird die Probe in die mobile Phase aufgegeben. Die folgende Vorsäule soll die Hauptsäule vor Verunreinigungen oder dem Verlust von Silicagel schützen. In der Trennsäule findet die chromatografische Auftrennung der Substanzgemische durch Adsorption und Verteilung statt. Im nachfolgenden Detektor werden die Substanzen, je nach Bauart desselbigen, zu einem konzentrationsabhängigen Signal verarbeitet. Diese wird mit Hilfe von Software eines PCs aufgezeichnet. Diese Aufzeichnung stellt das Chromatogramm dar. (Abb. aus: Otto, M.: *Analytische Chemie*. S. 406)

Üblicherweise werden lineare, konvexe, konkave oder stufenförmige Gradienten oder Mischformen dieser eingesetzt. Die Auswahl des richtigen Gradienten und der geeigneten Lösemittel für ein bestimmtes Trennproblem können sehr aufwendig sein. Bei der genutzten Anlage handelt es sich bei der Vorsäule, um eine kurze Säule zum Schutz vor biologischen Verschmutzungen der Trennsäule. Der als Teil der mobilen Phase eingesetzte Puffer kann über mehrere Tage verwendet werden. Dadurch steigt aber auch die Wahrscheinlichkeit von mikrobiellen Verunreinigungen des Puffers. Sie sollen nicht auf die Säule gelangen, um sie nicht zu verstopfen und die Trennung zu verschlechtern.

Aufgrund der gewählten Derivatisierung wird eine Detektion mittels Fluoreszenzdetektor eingesetzt. Da OPA bei einer Anregung bei 330 nm zu einer Emission bei 450 nm führt (Merck: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. S. 6). Eine Detektion mittels UV-Detektor ist ebenfalls möglich, aber die Nachweisgrenze liegt um Faktor 50 höher als bei einer Fluoreszenz-Detektion (Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.): *Bioanalytik*. S. 341). Der vereinfachte Aufbau eines Fluoreszenz-Detektors ist in Abbildung 3.4-2 dargestellt. Benötigt wird eine Lampe, die in der Lage ist die richtige Wellenlänge zu produzieren, sowie eine Fotodiode, die die

Emission des zu detektierenden Stoffes aufnehmen kann. Zwischen Lampe und Probe, aber auch zwischen Probe und Fotodiode, befinden sich Filter, um nur die eingestellte Wellenlänge hindurchzulassen (Abbildung 3.4-2).

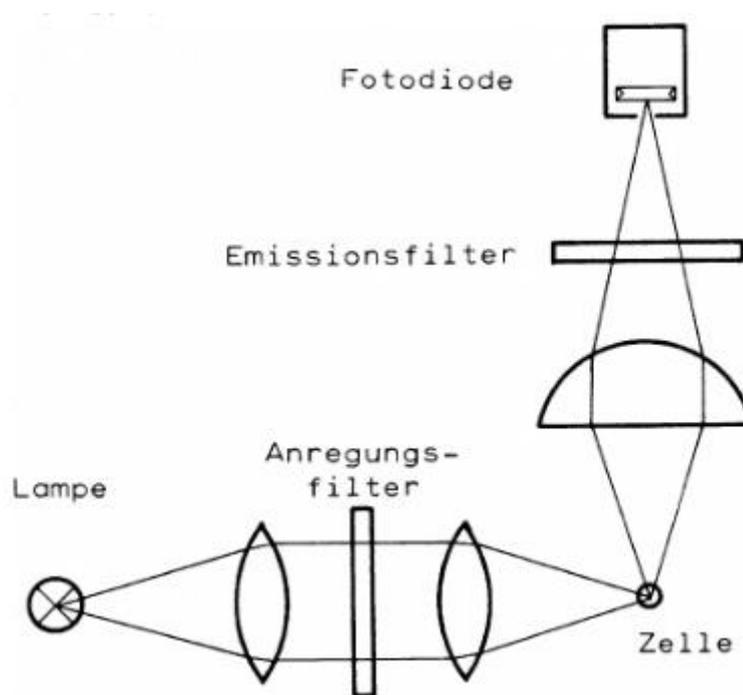


Abbildung 3.4-2 Aufbau eines Fluoreszenzdetektors. Der fluoreszierende Stoff wird bei einer bestimmten Wellenlänge zur Emission angeregt. Sie wird durch eine Lampe und einen Anregungsfilter bestimmt. Die Emissionswellenlänge wird ebenfalls gefiltert und gelangt so zu einer Fotodiode. Hier wird nun nur die gewählte Emissionswellenlänge detektiert. (Abb. aus: Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. S. 97)

Der Fluoreszenzdetektor misst nur die Stärke der Emission, unabhängig von der jeweiligen Aminosäure. Diese müssen über den Standard und die Retentionszeit identifiziert werden. Die Messdaten werden auf einen Computer übertragen und von geeigneter Software zu einem Chromatogramm umgewandelt. Oftmals bietet eine solche Software auch die Möglichkeit, die entstandenen Peaks auszuwerten und den entsprechenden Stoffen aus der Kalibrierung zuzuordnen. Die Auswertung der Proteinquantifizierung wird mit den ermittelten Aminosäurekonzentrationen in Excel vorgenommen.

3.5 Quantifizierung

Dieses Kapitel widmet sich der Frage, wie Proteine mittels Aminosäuren quantifiziert werden. Dafür muss die Aminosäuresequenz des Proteins bekannt sein. Sie ist für die folgenden Berechnungen unerlässlich. Das bekannte Protein soll eine größtmögliche Reinheit aufweisen. Nur so ist exakte Quantifizierung möglich. Verunreinigungen mit anderen Proteinen oder Aminosäuren verfälschen das Ergebnis. Das Protein wird unter kontrollierten Bedingungen hydrolysiert, wodurch die Aminosäuren frei vorliegen. Das neutralisierte Hydrolysat wird mittels OPA-Derivatisierung verändert

und auf die RP-Säule der HPLC aufgegeben. Hier erfolgt die Trennung der einzelnen Aminosäuren mittels eines Lösemittel-Puffer-Gradient. Die durch die Derivatisierung entstandene Fluoreszenz wird detektiert. Durch Messung verschieden konzentrierter Aminosäurestandards der zur Quantifizierung gewählten Aminosäuren, kann die Konzentration in der Probe bestimmt werden.

Mit der bekannten Aminosäuresequenz lässt sich die Anzahl der Aminosäuren innerhalb des Proteins ermitteln (Tabelle 3.1-2).

Für die Aminosäuren sind die molaren Massen bekannt oder mit Hilfe eines Periodensystems zu errechnen. Werden diese Werte in die folgende Gleichung eingesetzt, erhält man die Masse der Aminosäure in einem Proteinmolekül.

$$\text{Masse AS/Protein} = \frac{\text{molare Masse}}{\text{Avogadro— Konstante}} \cdot \text{Anzahl der AS im Protein}$$

Formel 1: Berechnung der Masse einer Aminosäure in einem Molekül des Proteins

Nun wird die gemessene Aminosäurekonzentration durch die Masse der Aminosäure am Protein geteilt. Daraus ergibt sich die Anzahl der in einem bestimmten Volumen, vorhandenen Proteinmoleküle. Durch Multiplikation mit der Proteinmasse lässt sich somit die Proteinkonzentration ermitteln.

$$\text{Proteinkonzentration} = \frac{\text{Aminosäurekonzentration}}{\text{Masse AS/Protein}} \cdot \text{Proteinmasse}$$

Formel 2: Ermittlung der Proteinkonzentration unter Verwendung des Ergebnisses der Formel 1, des Messergebnisses und der Proteinmasse

Nachdem bisher theoretisch gezeigt wurde wie von einer Proteinprobe über die Aminosäurequantifizierung auf die Proteinkonzentration geschlossen werden kann, soll nun der Schwerpunkt auf die praktische Durchführung, der dazu nötigen Methoden und der damit verbundenen Überlegungen, gelegt werden.

4 Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln wird zunächst das benötigte Material tabellarisch aufgeführt. Darauf folgt die Erläuterung der genutzten Methode und ihrer Durchführung. Außerdem soll im Falle der Hydrolyse und der Aminosäurebestimmung mittels HPLC die erfolgte Methodenentwicklung betrachtet werden. Besonders die Methodenentwicklung und Verfeinerung der HPLC-Methode hat einen nicht zu unterschätzenden Arbeitsaufwand generiert. Die Methodenentwicklung ist einer der wichtigsten Prozesse, die zur Erschließung einer neuen Methode Anwendung findet. Die Informationen verschiedenster Quellen, z.B. Paper, Betriebsanweisungen aber auch mündliche Quellen, müssen systematisch geprüft und an die vorliegenden Gegebenheiten angepasst werden. Die durchgeführten Methoden sollen in chronologischer Reihenfolge erläutert werden, um einen besseren Überblick über die gesamte Methodik der Proteinquantifizierung mittels der Aminosäureanalytik zu gewähren. Zunächst wird auf die Proteinbestimmung nach Bradford eingegangen. Sie erfolgte parallel zu den Messungen mittels Aminosäureanalytik, um eine Kontrolle der Ergebnisse zu ermöglichen. Darauf folgen die Hydrolyse der Proteine, die OPA-Derivatisierung und schließlich die Aminosäurebestimmung mittels HPLC.

4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Marion M. Bradford wird auch Bradford-Assay nach ihrem Entwickler genannt. 1976 wurde diese Methode publiziert und seither vielfach verwendet aufgrund der Robustheit der Ergebnisse.

Tabelle 4.1-1 Material und Chemikalienliste. In der nachfolgenden Tabelle sind die benötigten Materialien für die Durchführung des Bradford-Assays aufgeführt.

Material	Hersteller	Charge	Artikel-Nr.	Hinweise
Roti®Quant 5x konzentriert	Roth	22181661	K 015.1	Lagerung bei 4 °C
Küvetten, 1,5 mL halbmikro PMMA	Brand	KZ 217-8	7591 15	
Reinstwasser aus der laboreigenen Anlage				
1000 µL Pipette, Transferpette® S	Brand		704780	interne Nr. 8V
1000 µL Pipettenspitzen, Plastikbrand®	Brand	L-199-6	732032	
Fotometer UV-160	Shimadzu			interne Nr. IA 162

Im Unterschied zu anderen Proteinassays wird in diesem Fall ein Farbstoff genutzt, der mit dem Protein reagiert. Somit werden hier keine Kupferionen benötigt. Dieser Farbstoff ist das Coomassie-Brillantblau G 250 (Abbildung 4.1-1). Es reagiert in saurer Lösung unspezifisch mit den kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren im Protein (Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.): *Bioanalytik*. S. 40). Daher wird der Farbstoff in Phosphorsäure und Ethanol gelöst. Bei der Verbindung von Farbstoff und Protein verschiebt sich sowohl die Ladung des Farbstoffs vom kationischen in den anionischen Bereich, als auch das Absorptionsmaximum von einer Wellenlänge von 470 nm zu 595 nm (Carl Roth: *Gebrauchsanweisung. Roti®-Quant*. S. 1). Der Bradford-Assay eignet sich sowohl für Proteingemische als auch für aufgereinigte Proteinproben. Er ist einfach in der Durchführung und liefert schnell Ergebnisse. Im Unterschied zu anderen Proteinquantifizierungsmethoden wie dem BCA- und dem Lowry-Assay wird der Bradford-Assay

durch weniger Störeinflüsse beeinträchtigt. Durchgeführt wurde der Assay als Mikroansatz, wie in der Gebrauchsanweisung von Roth beschrieben. Kalibriert wurde von 2 mg/L bis 20 mg/L für die Quantifizierung von BSA und von 2 mg/L bis 40 mg/L für Lysozym. Dieser Unterschied ist nötig, da für die Quantifizierung von Lysozym eine größere Menge eingewogen werden muss. Warum das so ist wird Kapitel 4.2 näher beschrieben.

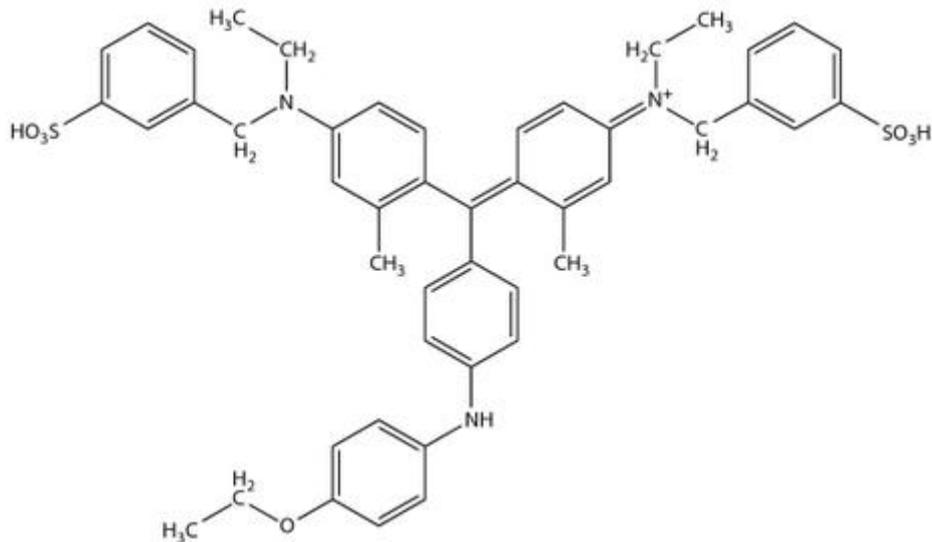


Abbildung 4.1-1 Coomassie-Brillantblau G 250. Der Farbstoff bindet an die zu quantifizierenden Proteine. Dieser Vorgang ist relativ unspezifisch, hauptsächlich beruhend auf Wechselwirkungen mit der Aminosäure Arginin, aber auch mit anderen kationische oder hydrophoben Seitenketten. (Abb. aus: Lundblad R. L.; Macdonald F.M (Hrsg): *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. S.765)

Als Stammlösung für die Kalibrierung werden 40 mg/L BSA hergestellt. Dies gilt sowohl für die Quantifizierung von BSA als auch für Lysozym. Die Konzentrationen der zu quantifizierenden Proteinlösungen betragen 400 mg/L für BSA und 800 mg/L für Lysozym, es werden jeweils 10 mL hergestellt. Um die Vergleichbarkeit der Quantifizierung von BSA und Lysozym zu erhalten, werden beide Probenlösungen gleich behandelt und für den Bradford-Assay 1:40 verdünnt. Das geschieht in zwei Schritten. Zunächst werden 250 µL der Probenlösung mit 750 µL Reinstwasser verdünnt. Danach werden 200 µL der 1:4 Verdünnung mit 1800 µL Reinstwasser versetzt. So entsteht für BSA eine Konzentration von 10 mg/L, während für Lysozym 20 mg/L mittels Bradford-Assay quantifiziert werden sollen. Außerdem wurde getestet, ob der interne Standard, mit dem die Proteinprobe versetzt wird, nicht mit dem Coomassie-Brillantblau G 250 reagiert. Die zu quantifizierende Proteinlösung wird mit 800 µL AABA versetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 80 mg/L. Durch die Verdünnungen bei der Neutralisierung führt das zu einer Konzentration von 20 mg/L für die Analyse mittels HPLC. Beim Bradford-Assay wird die Probe 1:40 verdünnt. Das führt dann zu einer Konzentration von 2 mg/L Alpha-Aminobuttersäure. Um sicherzustellen, dass keine Wechselwirkungen von AABA und dem Bradford-Assay zu befürchten sind, wurde eine zehnfach höhere

Konzentration getestet. Die Extinktion bei OD₅₉₅ beträgt 0,007 und liegt damit außerhalb der Kalibrierung und des auswertbaren Bereichs (Tabelle 4.1-2).

Tabelle 4.1-2 Ergebnisse des Tests auf Wechselwirkungen des Bradford-Assays mit dem internen Standard. In der Tabelle ist sowohl die Einwaage für die Proteinlösung als auch die Einwaage für die vom Bradford-Assay genutzte Stammlösung zu finden. In der Spalte „errechnete Konzentration“ können die Ergebnisse des Assays für die jeweiligen Proben abgelesen werden. In der Spalte „Rückrechnung“ rechts daneben befinden sich die, nach Berücksichtigung der Verdünnung und der Einheit, errechneten Werte. In den beiden letzten Spalten sind die, aus der Einwaage des Proteins, ermittelten Sollwerte. Wie die niedrige Extinktion von AABA zeigt, ist eine Beeinflussung des Bradford-Assays durch AABA nicht zu erwarten.

Standardreihe [mg/L]	OD ₅₉₅	Proben	OD ₅₉₅	errechnete Konzentration [mg/L]	Rückrechnung [g/L]	Soll-Konzentration [mg/L]	Rückrechnung Soll [g/L]
0	0	Hydrol. 2 & 3	0,334	11,776	0,471	10	0,4
2	0,074	AABA 20 mg/L	0,007	0,247	(außerhalb der Kalibrierung)		
5	0,164						
10	0,299						
15	0,468						
20	0,559						
Steigung:	0,028						

Rein rechnerisch steht dieser Wert für eine Proteinkonzentration von 0,247 mg/L, hier müsste aber noch Faktor 10 berücksichtigt werden. Das führt zu einer Konzentration von 0,0247 mg/L, wobei die Messgenauigkeit des Fotometers in diesem niedrigen Bereich nicht mit einbezogen wird. Somit ist das Ergebnis als negativ zu werten, der gewählte interne Standard kann ohne Beeinflussung genutzt werden. Nachdem nun die Referenzmethode und ihre Durchführung festgelegt sind. Werden im Folgenden die Methoden zur Quantifizierung mittels Aminosäureanalytik erläutert.

4.2 Proteinhydrolyse

In diesem Kapitel werden die Proteinhydrolyse und ihre Entwicklung beschrieben. Zunächst werden die Materialien genannt und darauffolgend die Methode erläutert. Die Methodenentwicklung geht, dem Ablauf der Hydrolyse folgend, auf die vorhandenen Problemstellungen und ihrer Lösung ein. Zusammenfassend wird eine Übersicht der schrittweisen Durchführung der Hydrolyse das Kapitel abschließen.

Tabelle 4.2-1 Material und Chemikalienliste der Proteinhydrolyse. In der unten stehenden Tabelle sind die benötigten Chemikalien und das Material zur Durchführung der Proteinhydrolyse zu finden.

Material	Hersteller	Charge	Artikel-Nr.	Hinweis
Bovines Serum Albumin, Roth IgG frei > 98 %	Roth	103194436	3737.2	Lagerung 4 °C
Lysozym aus Hühnereiweiß, Roth 3x kris. lyophilisiert	Roth	120154730	8259.2	Lagerung -21 °C EG-Nr.: 2357473
Salzsäure rauchend 37 % für die Analyse	Merck	K43320786215	1.13386.2500	Ätzend
Natriumhydroxid Plätzchen für die Analyse	Merck	B0752198204	1.06498.1000	Ätzend
Vials, 2 mL, Bördelrand	Supelco	171560H	27058	
Kappen, 11 mm, Red Teflon® Silikon Septum	Supelco	P380984	27360-U	
Bördelzange	Synopac		Fermpress H 207	
Decapper	unbekannt			
Trockenschrank	Heraeus Instruments			interne Nr. IA 122

Wie bereits im Kapitel 3.2 erläutert, eignet sich bei den gegebenen Anforderungen die Methode der sauren Hydrolyse mit 6 mol/L Salzsäure bei 110 °C über 24 h am besten. Da die Einwaage der gewünschten Proteinmenge in ein Probengefäß umständlich ist und die Einwaagen immer leicht variieren würden, wird eine Proteinlösung hergestellt. Dadurch ergeben sich vergleichbarere Proben und eine zusätzliche Quantifizierung der Stammlösung mittels Bradford-Assay ist möglich. Zunächst muss berechnet werden, wie hoch die Proteinkonzentration zur Quantifizierung zu sein hat. Dazu wurde Formel 2 aus Kapitel 3.5 herangezogen und nach der Aminosäurekonzentration umgestellt. So ist es möglich, eine Proteinkonzentration vorzugeben und die daraus resultierenden Aminosäurekonzentrationen abzulesen (Tabelle 4.2-2).

Tabelle 4.2-2 Ausschnitt der Excel-Tabelle zur Errechnung der benötigten BSA-Konzentration. Die Proteinkonzentration muss so gewählt sein, dass die resultierende Aminosäurekonzentration innerhalb der angestrebten Kalibrierung liegt. Außerdem sollte die Proteinkonzentration so niedrig wie möglich sein, um eine Proteinverschwendung zu vermeiden. Verwendet wird Formel 2 aus Kapitel 3.5, indem sie nach der Aminosäurekonzentration umgestellt und Faktor 1000 für die Proteinkonzentration in g/L berücksichtigt wird.

Berechnung der nötigen BSA-Konzentration			Masse BSA [mg]	1,1031E-16	
			Avogadro-Konstante	6,02214E+23	
Aminosäure	Anzahl AS / Protein	Molare Masse der AS [mg/mol]	Masse AS/ Protein [mg]	Protein-konzentration [g/L]	Aminosäure-konzentration [mg/L]
Asp (Asx)	54	133103	1,194E-17	0,1	10,820
Glu (Glx)	79	147130	1,930E-17	0,1	17,497
Ala (a)	46	89094	6,805E-18	0,1	6,169
Phe (f)	27	165192	7,406E-18	0,1	6,714
Leu (l)	61	131175	1,329E-17	0,1	12,045
Lys (k)	59	146190	1,432E-17	0,1	12,984

Es wird eine möglichst niedrige Konzentration genutzt, um einem unnötigen Proteinmehrverbrauch vorzubeugen. Die resultierende Aminosäurekonzentration muss detektierbar bleiben. Für BSA hat sich eine Konzentration von 0,1 g/L rechnerisch als gut erwiesen, denn die Aminosäurestandards werden von 3 mg/L bis 20 mg/L kalibriert. Dieser Bereich hat sich als sinnvoller Mittelweg zwischen optimaler Detektierbarkeit und niedriger Proteineinwaage herausgestellt. Auf die Standardherstellung und den gewählten Bereich wird im Kapitel 4.4 näher eingegangen. Für Lysozym musste die Proteinkonzentration angepasst werden. Da die reale Aminosäurekonzentration meist unterhalb der rechnerischen zu finden ist, wäre bei einer Lysozymkonzentration von 0,1 g/L, die Konzentration von Phenylalanin mit 3,646 mg/L gefährdet nicht detektierbar zu sein (Tabelle 4.2-3). Daher wird die Proteinkonzentration zugunsten von Phenylalanin verdoppelt. Asparaginsäure liegt mit einer Konzentration von 39,074 mg/L außerhalb der ursprünglichen Kalibrierung. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Proteine beizubehalten, wurden die Konzentrationen der Standards nicht verschoben. Eine Erhöhung der Anzahl der Standards hätte eine Verzögerung der Messungen der Hydrolyseproben nach sich gezogen und daher ebenfalls nicht in Erwägung gezogen. Alternativ wurde am Ende der Probenmessung noch der 40 mg/L Standard vermessen.

Tabelle 4.2-3 Tabelle zur Berechnung der benötigten Lysozymkonzentration. Die Berechnung erfolgt auch hier, wie in Tabelle 4.2-2 beschrieben, mit Formel 2 aus Kapitel 3.5. Die Einwaage von Lysozym ist im Vergleich zu BSA doppelt so groß. Phenylalanin hätte sonst rechnerisch eine Konzentration von 3,464 mg/L, da durch die Erfahrungen mit BSA zu diesem Zeitpunkt bekannt ist, dass die detektierten Aminosäurekonzentrationen im Regelfall niedriger ausfallen, musste die Einwaage erhöht werden. Damit liegt Asparaginsäure oberhalb der für BSA gültigen Kalibrierung. Die restlichen Aminosäuren liegen aber weiter im mittleren Bereich, dadurch sollen sie bessere Ergebnisse liefern.

Berechnung der nötigen Lysozym-Konzentration				Masse Lysozym [mg]	2,37573E-17
				Avogadro-Konstante	6,02214E+23
Aminosäure	Anzahl AS / Protein	Molare Masse der AS [mg/mol]	Masse AS/ Protein [mg]	Protein-konzentration [g/L]	Aminosäure-konzentration [mg/L]
Asp (Asx)	21	133103	4,64148E-18	0,2	39,074
Glu (Glx)	5	147130	1,22158E-18	0,2	10,284
Ala (a)	12	89094	1,77533E-18	0,2	14,946
Phe (f)	3	165192	8,22923E-19	0,2	6,928
Leu (l)	8	131175	1,74257E-18	0,2	14,670
Lys (k)	6	146190	1,45653E-18	0,2	12,262

Um zu bestätigen, ob die rechnerisch ermittelte Proteinkonzentration gut gewählt ist, mussten zunächst die geeigneten Bedingungen getestet werden. Dafür wurde erst einmal das Protein BSA genutzt. Für die Temperierung bei 110 °C wurde ein Trockenschrank gewählt. Dieser ist einfach zu bedienen und leichte Temperaturschwankungen über 24 h sind vernachlässigbar, da alle Proben gleich behandelt werden. Das zu wählende Hydrolysegefäß muss der Salzsäure und dem entstehenden Druck über 24 h standhalten. Die gewählten Aminosäuren sind oxidationsunempfindlich. Trotzdem sollte ein größeres Luftreservoir vermieden werden. Daher fiel die Entscheidung auf 2 mL Vials mit Bördelrand und entsprechenden Kappen. Bei der ersten Hydrolyse wurden drei verschiedene Kappen getestet, da nicht auszuschließen war, dass die Salzsäure mit dem Material der Septen reagieren könnte. Für alle weiteren Hydrolysen wurde dann die Red Teflon® Kappe mit Silikonseptum von Supelco verwendet. Sie hielt als einzige den Bedingungen stand (Abbildung 4.2-1).



Abbildung 4.2-1 Austestung verschiedener Kappen für die Hydrolyse. Dieses Bild zeigt die Vials nach einer 24 h langen Hydrolyse im Trockenschrank. Zur Sicherheit wurden sie in einem Becherglas verwahrt. Deutlich ist zu erkennen, dass zwei von drei Kappen bzw. Septen mit der Salzsäure reagiert haben. Nur die Kappe des Vials hinten rechts ist gänzlich unversehrt. Sie besteht aus Red Teflon® mit einem Silikonseptum.

Da das Protein als Lösung angesetzt wird, muss die Salzsäure doppelt so hoch konzentriert sein; also 12 mol/L enthalten. Dazu wurde die 37 %ige Salzsäure verwendet. Sie enthält 12,08 mol/L HCl (siehe Anhang, 7.3). Durch ihren Einsatz verdünnt sich die Proteinkonzentration um die Hälfte. Nach der Hydrolyse folgte dann ein Neutralisationsschritt, da der in der Derivatisierung verwendete Borat-Puffer mit pH 9,5 diese hohe Ionenkonzentration nicht ausgleichen kann. Um die Probe möglichst wenig zu verdünnen, wurde eine 12 molare Natriumhydroxidlösung (NaOH-Lösung) angesetzt (siehe Anhang, 7.2). Durch diesen Schritt verdünnt sich die Protein- bzw. Aminosäurekonzentration nochmal um die Hälfte. Bei so hohen Konzentrationen und kleinen Volumina sind schon wenige Mikroliter ausreichend, um den pH-Wert von pH 1 zu pH 14 zu verschieben. Daher wurde ein Neutralisationsversuch durchgeführt. 500 μ L Reinstwasser wurden mit 500 μ L 12 molarer Salzsäure versetzt, um den realen Bedingungen von 1 mL Probe mit 6 molarer Salzsäure zu entsprechen. Anschließend wurden verschiedene Mengen der konzentrierten Natriumhydroxidlösung dazugegeben. 501 μ L der 12 molaren Natriumhydroxidlösung führten zu einem pH-Wert von 8 bis 9 (Abbildung 4.2-2). Daher wurden in allen folgenden Versuchen 501 μ L NaOH verwendet und in einem 2 mL Messkolben mit Reinstwasser aufgefüllt.

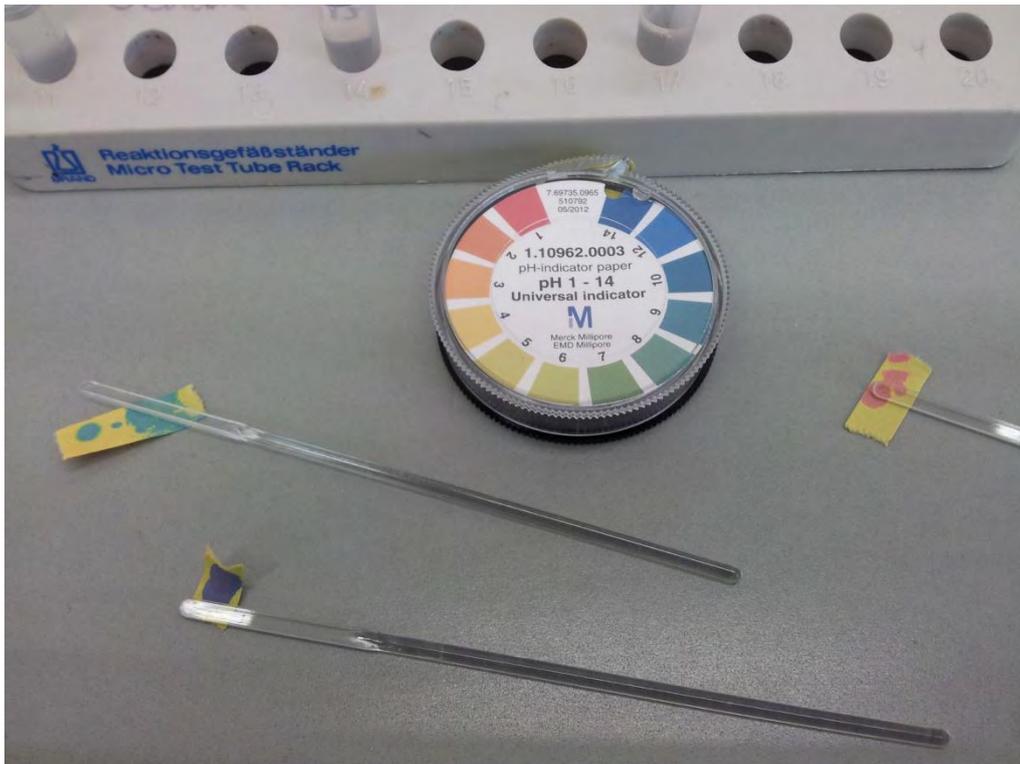


Abbildung 4.2-2 Neutralisationsversuch. Die Kontrolle des Versuchs wurde mit pH-Papier durchgeführt. Rechts im Bild ist das Resultat bei Zugabe von 500 μL NaOH zu sehen. Die Lösung ist weiterhin stark sauer. Dies wird durch die rote Farbe des pH-Papiers angezeigt. Nach der Zugabe von 510 μL ist die Färbung des Papiers, unten im Bild, tiefblau. Laut Verpackung des pH-Indikators ist die Lösung stark alkalisch. 501 μL NaOH führen zu dem Ergebnis auf der linken Seite. Es entspricht ungefähr einem pH-Wert von 8 bis 9. Da der in der Derivatisierung verwendete Borat-Puffer einen pH-Wert von 9,5 hat, ist diese Menge NaOH als gut anzusehen.

Durch die Neutralisation von Salzsäure und Natronlauge entstehen Wärme, Wasser und Natriumchlorid. Die erste Hydrolyse sollte zeigen, ob diese hohe Salzkonzentration von 6 mol NaCl/L einen Einfluss auf die Derivatisierung hat. Die molare Masse von NaCl beträgt 58,44 g/mol. Daraus ergibt sich eine Salzmenge von 350,64 g/L. Diese liegt nur etwas unter der Löslichkeitsgrenze von 359 g/L bei 20 °C (Grombach, P. et al.: *Handbuch der Wasserversorgungstechnik*. S. 23). In der Praxis haben sich die oben genannten Entscheidungen bewährt. Der Mittelwert der Proteinkonzentrationen aus den einzelnen Aminosäuren liegt bei 0,108 g/L (Tabelle 4.2-4). Unter Berücksichtigung der Einwaage von 0,0041 g/10 ml, der Verdünnungen und dem Endvolumen von 1,8 mL ergibt sich ein Sollwert von 0,114 g/L (Tabelle 7.1-1 im Anhang,).

Tabelle 4.2-4 Auswertung der ersten Proteinhydrolyse. In der nachfolgenden Tabelle ist kurz dargestellt, welche Aminosäurekonzentrationen für die einzelnen Aminosäuren detektiert wurden und die sich daraus ergebende Proteinkonzentration. Diese Werte wurden nicht mittels internen Standards bereinigt und dienen hauptsächlich der ersten Kontrolle der gesamten Methode.

Hydrolyse- datum	Probe	Aminosäure	Aminosäure- konz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]
04.09.2013	H1	Asp	13,084	0,121
04.09.2013	H1	Glu	18,749	0,107
04.09.2013	H1	Ala	9,037	0,147
04.09.2013	H1	Phe	6,117	0,091
04.09.2013	H1	Leu	11,564	0,096
04.09.2013	H1	Lys	11,530	0,089
Mittelwert:				0,108

Da der Ist-Wert 95 % des Sollwertes erreicht, wurde für die folgenden Hydrolysen eine zusätzliche, längere Hydrolysezeit von 48 h hinzugefügt. Damit wird eine bessere Vereinzelung der Aminosäuren bei längerer Hydrolysezeit ausgetestet.

Zusammenfassend wird ein Hydrolyseablauf gezeigt.

1. Proteineinwaage 0,004 g (BSA) oder 0,008 g (Lysozym) + je 800 µL AABA mit $\beta_{(AABA)} = 1 \text{ g/L}$ in 10 mL Reinstwasser
2. 6 mal jeweils 1 mL Proteinlösung + 1 mL 6 molarer HCl in ein 2 mL Vial pipettieren
3. Vial mittels Kappe verschließen
4. Trockenschrank auf 110 °C vorheizen, Vials in zwei Bechergläsern aufteilen (24 h, 48 h)
5. Bei 110 °C Bechergläser in den Trockenschrank stellen und 24 h inkubieren
6. Das entsprechende Becherglas aus dem Trockenschrank entnehmen und abkühlen lassen
7. Abgekühlte Vials öffnen und 1 mL Hydrolyselösung in einen 2 mL Messkolben pipettieren
8. 501 µL 12 molarer NaOH dazugeben und abkühlen lassen
9. Nun den Kolben auf 2 mL mit Reinstwasser auffüllen
10. Kolben mehrmals invertieren

Diese Hydrolyseprobe kann in ein HPLC Vial überführt und in den Autosampler gestellt werden. Die so hergestellte Aminosäurelösung wird im Autosampler einer OPA-Derivatisierung unterzogen. Die Derivatisierungsmethode wird im folgenden Kapitel erläutert.

4.3 OPA-Derivatisierung

Dieses Kapitel widmet sich der ortho-Phthaldialdehyd-Derivatisierung. Sie erfolgt in dieser Arbeit als Vorsäulenderivatisierung. Das dazu benötigte Material wird nachfolgend aufgezeigt und die Methode sowie ihre Durchführung erläutert.

Tabelle 4.3-1 Material und Chemikalienliste der OPA-Derivatisierung. Die unten stehende Tabelle beinhaltet die benötigten Materialien für die Durchführung der OPA-Derivatisierung. Die Dilution Solution entspricht der Zusammensetzung der mobilen Phase zu Beginn des chromatografischen Verfahrens.

Material	Hersteller	Charge	Artikel-Nr.	Hinweise
β -Mercaptoethanol	Calbiochem	B28372	444203	Ätzend, giftig, umweltgefährlich
Salzsäure 32 % Molecular Biology Grade	Merck	Z216018050	1.00318.0250	Ätzend
di-Sodium tetraborate für die Analyse	Merck	A0143008146	1.06308.0500	Giftig
OPA	Sigma Aldrich	SLBD6292V	P0532-50 mL	Ätzend, giftig, umweltgefährlich
Dilution Solution (88 % Natriumacetat-Puffer 12 % Lösemittel: Acetonitril/Methanol/ Reinstwasser (45/45/10))				Herstellung der Einzelkomponenten Siehe Kapitel 4.4

Die OPA-Derivatisierung findet mit Hilfe eines Autosamplers, vor der Auftrennung der Aminosäuren auf der RP-Säule, statt. Der Autosampler ist nötig, da dieser Prozess zeitkritisch ist. Die entstehenden Isoindole sind nur kurze Zeit stabil und müssen daher zügig analysiert werden (Gey, M. H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. S. 382). Die Derivatisierung verläuft im Alkalischen bei pH 9,5 und benötigt für die Reaktion mit den Aminosäuren zusätzlich ein Thiol (Abbildung 4.3-1).

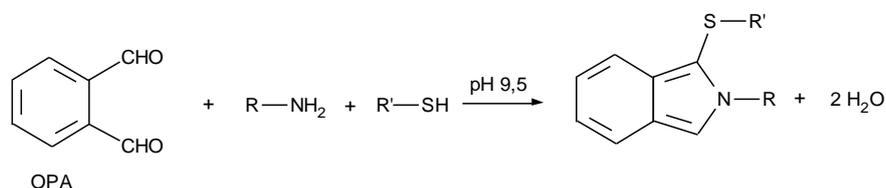


Abbildung 4.3-1 Die Vorsäulenderivatisierung. Das OPA-Reagenz reagiert mit der primären Aminogruppe und dem Thiol zu einem fluoreszierenden 1-Alkylthio-2-alkyl-substituierten Isoindol. Als Thiol wird 2-Mercaptoethanol genutzt.

Dieses Thiol ist in dem verwendeten OPA-Reagenz schon enthalten. Hierbei handelt es sich um 2-Mercaptoethanol. Wird das Reagenz nicht im Kühlschrank gelagert, ist es instabil. Um die Reaktivität wiederherzustellen, werden 2 µL 2-Mercaptoethanol pro Milliliter zum Reagenz gegeben (Sigma Aldrich: *Product Information, Phthaldialdehyde Reagent, Complete Solution*. S. 1). Mit dieser Methode lässt sich das Reagenz noch ein weiteres Mal nutzen. Dies führt zu Kosteneinsparungen (Abbildung 4.3-2).

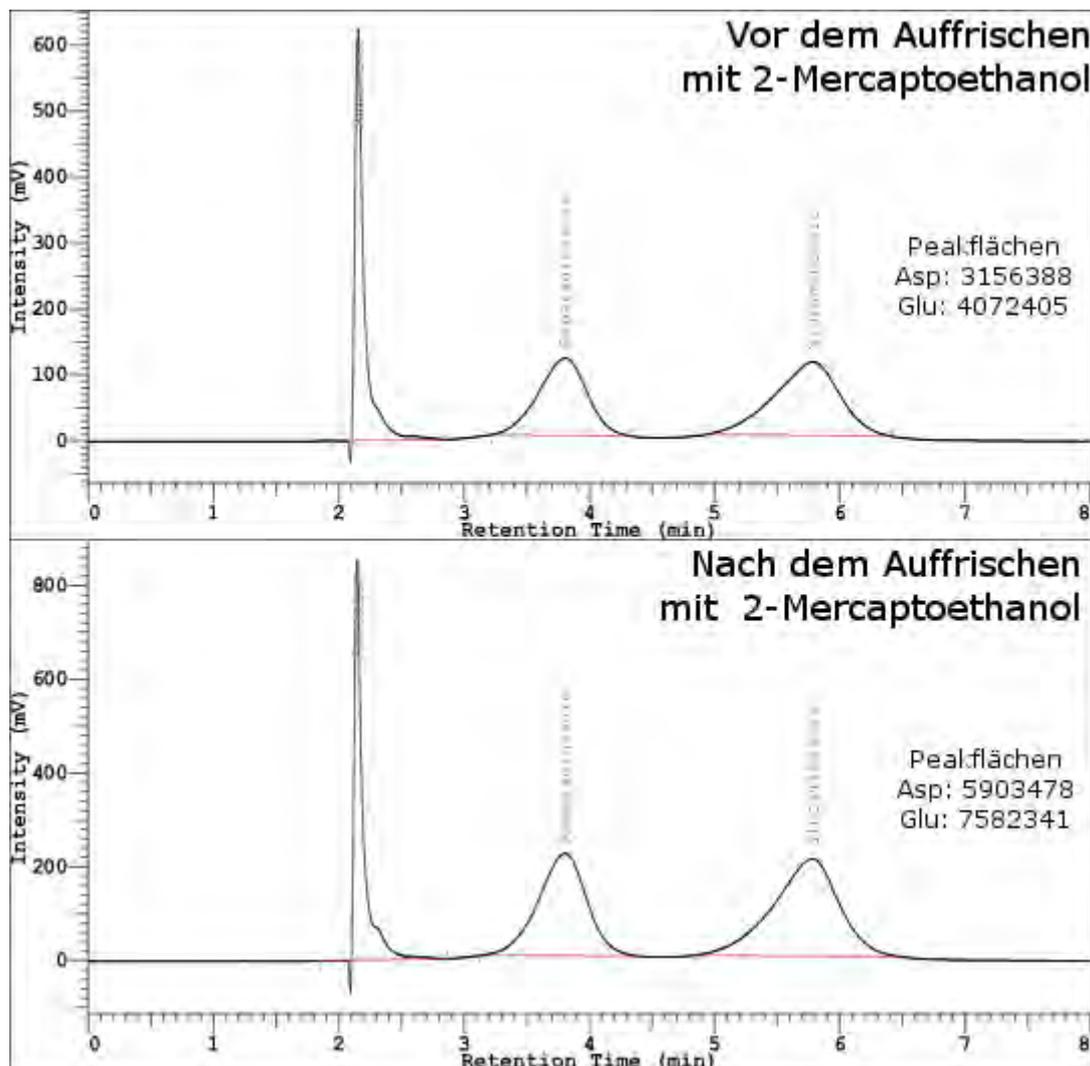


Abbildung 4.3-2 Auffrischung des OPA-Reagenz. Beim Vergleich der beiden Chromatogramme ist festzustellen, dass sich die Peakfläche der beiden Aminosäuren nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol erhöht hat. Die erzeugte Signalintensität wurde nahezu verdoppelt.

Wie bereits im Kapitel Hochleistungsflüssigchromatografie erwähnt, hat die OPA-Derivatisierung Vor- und Nachteile. Auf der einen Seite werden die Aminosäuren fluoreszenzmarkiert, was die Detektion wesentlich verbessert. Außerdem steigt die Hydrophobizität, wodurch eine Trennung mit einer RP-Säule verbessert wird. Auf der anderen Seite ist letzteres auch ein Nachteil, denn dadurch werden die Unterschiede der Aminosäuren angeglichen. Durchgeführt wurde die Derivatisierung wie im

Handbuch beschrieben (Merck: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. S. 4). Der genaue Ablauf wird nachfolgend genannt.

1. 460 µL der Probe werden in ein Reaktionsvial pipettiert
2. 200 µL Borat-Puffer und 100 µL OPA-Reagenz werden hinzugefügt
3. Mischen und 200 Sekunden warten
4. 50 µL 0,75 N Salzsäure hinzufügen und mischen
5. 100 µL aus dem Reaktionsvial werden in das Verdünnungsgefäß pipettiert
6. 400 µL Dilutions Solution werden addiert und nochmals gemischt
7. 20 µL dieser Lösung werden injiziert

Als nächstes wird der Aufbau des verwendeten Autosampler-Racks erläutert. Die vier benötigten Reagenzien Borat-Puffer, OPA-Reagenz, 0,75 N Salzsäure und Dilution Solution werden in die 20 mL Gefäße gegossen und in die vordere Reihe gestellt. Darauf folgen drei Reihen, die mit insgesamt 30 Proben gefüllt werden können. Zu jeder Probe werden Reaktionsvials in der Höhe der Anzahl der Bestimmungen benötigt. Jeweils eins für die Standards, aber jeweils zwei für die Proben, denn sie werden in Doppelbestimmung gemessen. Die letzten drei Reihen sind für Verdünnungsgefäße bestimmt. Ihre Anzahl entspricht der Anzahl der genutzten Reaktionsvials (Abbildung 4.3-3). Nachdem die Proben derivatisiert sind, werden sie auf die Säule gebracht. In diesem Moment beginnt die chromatografische Trennung. Ihre Entwicklung und ihr Ablauf werden im folgenden Kapitel erörtert.

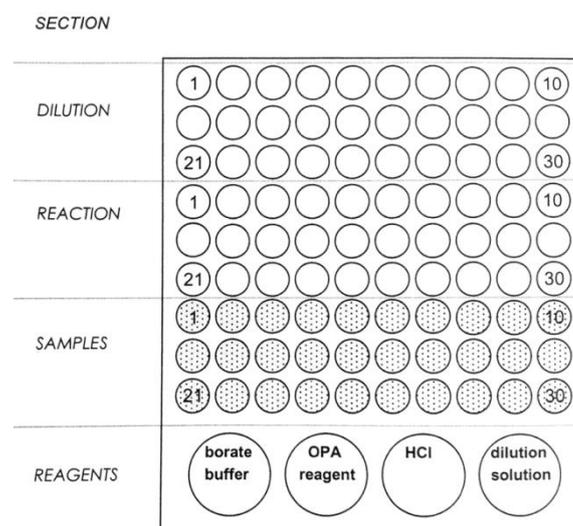


Abbildung 4.3-3 Autosampler-Rack. Die vier großen Plätze im Autosampler werden von den Reagenzien besetzt. Maximal können mit diesem Rack 30 Proben in Einzelbestimmung gemessen werden. Für Mehrfachbestimmungen liegt die Anzahl entsprechend niedriger, da für jede Messung ein Reaktionsvial sowie ein Verdünnungsgefäß benötigt werden (Abb. modifiziert nach: Merck: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. S. 18).

4.4 Aminosäure-Bestimmung mittels HPLC

Für die Austestung der optimalen Methode zur Auftrennung der Aminosäuren wurden verschiedene Parameter verändert. Nur die für diese Arbeit ausschlaggebenden Entscheidungen werden in der Methodenentwicklung erläutert. Zunächst folgen drei Tabellen, welche die Komponenten der Anlage, die benötigten Materialien für die Durchführung der Methode sowie die genutzten Aminosäurestandards aufzeigen.

Tabelle 4.4-1 Die Geräte der HPLC-Anlage. In der Tabelle sind die genutzten Geräte der HPLC-Anlage zu finden, sortiert nach interner Nummerierung.

Gerät	Hersteller	Interne Nummer
Fluorescence Detector F-1080	Merck Hitachi	IA27
Interface D-7000	Merck Hitachi	IA28
Autosampler L7250	Merck Hitachi	IA29
Pumpe L-7100	Merck Hitachi	IA30

Tabelle 4.4-2 Material der HPLC-Methode. Hier sind die Chemikalien für die Herstellung der mobilen Phase aufgeführt. Außerdem werden die genutzten Gefäße für den Autosampler sowie die verwendete Säule genannt.

Material	Hersteller	Charge	Artikel-Nr.	Hinweis
Natriumacetat	Merck	A0034968	1.06268.0250	
Acetonitril LiChrosolv®	Merck	I479891	1.14291.1000	
Methanol LiChrosolv®	Merck	I700807337 I680418318	1.06007.1000	
neoLab-Gewindeflaschen ND10 1,5 mL, Klarglas, weite Öffnung	neoLab	22083318	7-0725	
Superspher® 100, LiChroCART® 250-4, RP 18	Merck	Sorbent: OB535567 Catridge: 713860	1.16056	
Vorsäule LiChrospher® 100 RP 18 LiChroCART® 4-4	Merck	Sorbent: HX087259 Catridge: HX110272	1.50957.0001	
1000 µL Pipette, Transferpette® S	Brand		704780	interne Nr. 8V
1000 µL Pipettenspitzen, Plastikbrand®	Brand	L-199-6	732032	

Tabelle 4.4-3 Aminosäurestandards. Geordnet nach Retentionszeit werden die genutzten Aminosäuren, für die Standardherstellung, aufgeführt. Darunter befindet sich auch die α -Aminobuttersäure, die als interner Standard dient.

Aminosäure	Hersteller	Charge	Artikel-Nr.	Hinweis
L-Asparaginsäure	Merck	K42099626244	1.00126.0100	for biochemistry
L-Glutaminsäure	Merck	K44459191330	1.00291.0250	for biochemistry
DL- Alanin	Alfa Aesar	5003A09V	A12230	
α -Aminobuttersäure	Alfa Aesar	10169842	L06035	
DL-Phenylalanin	Merck	K2428557241	1.07257.0025	for biochemistry
L-Leucin	Merck	K40251560039	1.05360.0025	for biochemistry
L-Lysin	Aldrich Chemistry	BCBJ2564V	62840-25G-F	

Zunächst wurde nach dem idealen Laufmittel gesucht. Die dafür benötigten Stammlösungen der jeweiligen Aminosäuren wurden mit 1 g/L angesetzt. Die genauen Einwaagen aller erstellten Aminosäurestandards sind im Kapitel 7.5 im Anhang zu finden. Als hydrophiler Anteil wird ein 50 mmol/L Natriumacetat Puffer genutzt (Einwaagen siehe Kapitel 7.7 im Anhang). Der pH-Wert des Puffers wird mittels einer 1 N Salzsäure auf pH 7 eingestellt und daraufhin vakuumfiltriert (Merck KGaA: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. S. 5). Die Vakuumfiltration dient zum einen der Entfernung von Partikeln, zum anderen aber auch der Entgasung. Dieser Ansatz des Puffers wird für alle Messungen genutzt und nicht verändert. Der Puffer ist mindestens vier Tage verwendbar und liefert stabile Ergebnisse. Das ist daran zu erkennen, dass keine zusätzlichen Peaks, durch biologische Verunreinigung des Puffers, entstehen. Außerdem gibt es auch keine pufferbedingten Verschiebungen der Aminosäurepeaks (Abbildung 4.4-1). Der pH-Wert des Puffers wurde am vierten Tag mittels pH-Teststreifen auf pH 6,9 bestimmt. Für die hydrophobe Komponente des Laufmittels wird in der Anleitung von Merck zu einem Methanolgradienten geraten. Daher wurde diese Variante zu erst ausgetestet. Zu Testzwecken und um die verwendeten Komponenten sowie die Säule täglich zu prüfen, wurde an jedem Testtag mindestens ein Mischstandard aus Asparagin- und Glutaminsäure vermessen. Auf der beigelegten CD sind alle erfolgten Messungen inklusive der Kontrollmessungen zu finden. Die für bestimmte Erläuterungen benötigten Chromatogramme und Messergebnisse sind aber im Text bzw. Anhang dieser Arbeit zu finden.

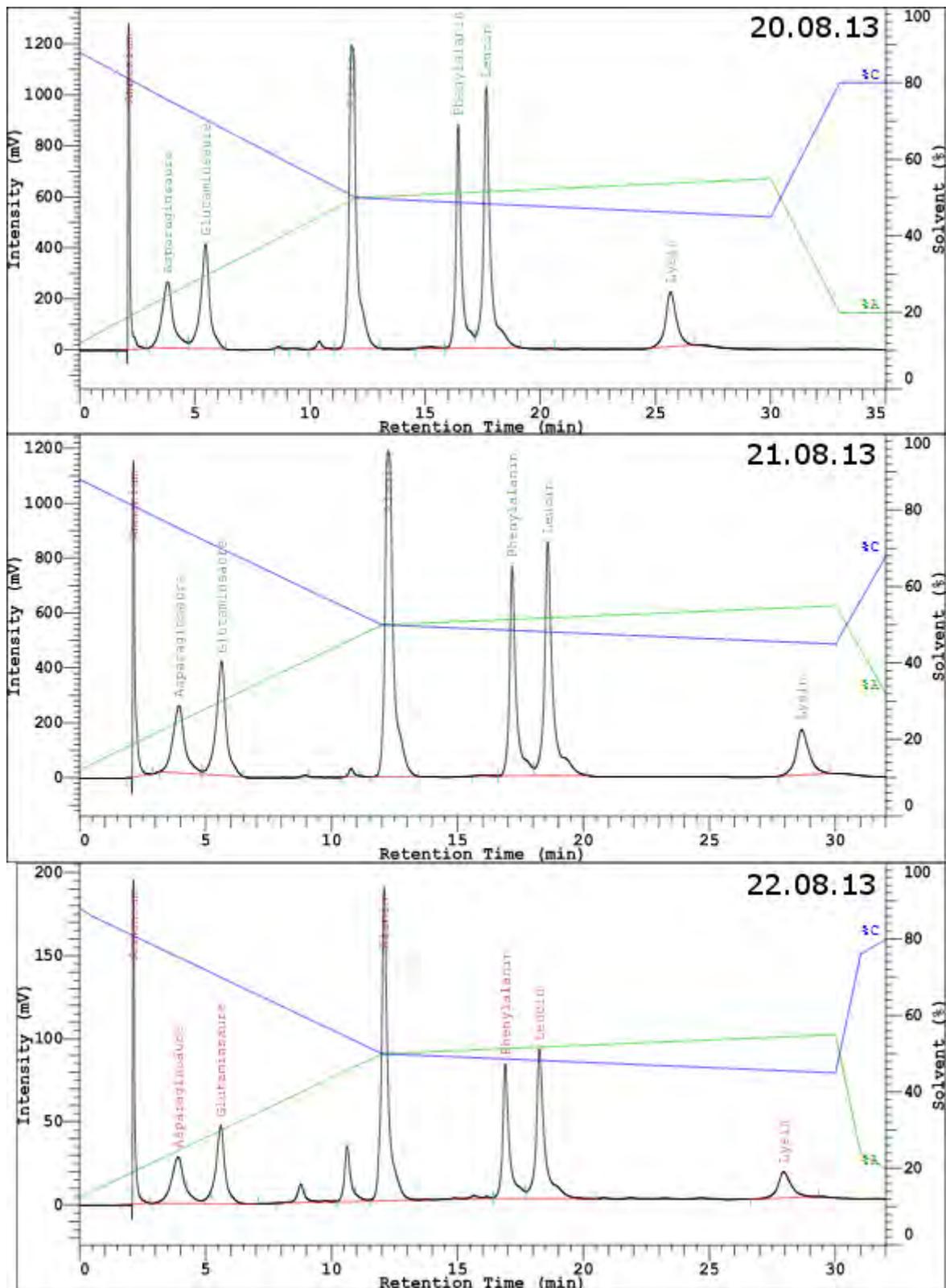


Abbildung 4.4-1 Haltbarkeit des Puffers. Die linke Achse der Abbildung zeigt die Intensität des Fluoreszenzsignals. Die Untere gibt die Retentionszeit an und die Rechte zeigt das Mischungsverhältnis von Puffer (C) zu Methanol (B). Der verwendete Puffer wurde am 19.08.13 angesetzt und seitdem vier Tage ungekühlt gelagert. Das entspricht den Anforderungen, die der Puffer erfüllen muss. Dieser Versuch ist parallel zur Einstellung des Gradienten erfolgt. Die Chromatogramme von 20.08.13 und 21.08.13 zeigen eine Aminosäurekonzentration von je 30 mg/L, während das Chromatogramm vom 22.08.13 die Auftrennung einer 3 mg/L Aminosäurekonzentration zeigt. Daher ist hier die Intensität des Fluoreszenzsignals deutlich geringer und die zwei Geisterpeaks in der Retentionszeit von 8 min bis 11 min erscheinen größer, im Vergleich zu den beiden Vorgängern. Im Vergleich gibt es keine pufferbedingten Verschiebungen der Peaks oder erkennbare zusätzliche Peaks aufgrund von Verunreinigungen.

Zu Beginn dieser Methodenentwicklung war die Auswahl der geeigneten Aminosäuren noch nicht vollständig abgeschlossen. Daher wurde zunächst mit Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Leucin und Lysin gearbeitet. Abbildung 4.4-2 zeigt ein Chromatogramm mit diesen Aminosäuren und einem Methanolgradienten. Die rechte Achse zeigt die Laufmittelzusammensetzung in Prozent. Laufmittel B ist das Lösemittel Methanol und Laufmittel C ist der Natriumacetatpuffer. Auffällig sind die im Chromatogramm sichtbaren, kleinen Haarnadelpeaks. Sie entstehen durch Luft, die in den Detektor gelangt. Diese Luft wird aus dem Laufmittelgemisch freigesetzt. Um das zu verhindern erfolgt die Filtration des Puffers wie bereits erwähnt. Zusätzlich wird das Methanol mindestens 15 min im Ultraschallbad entgast.

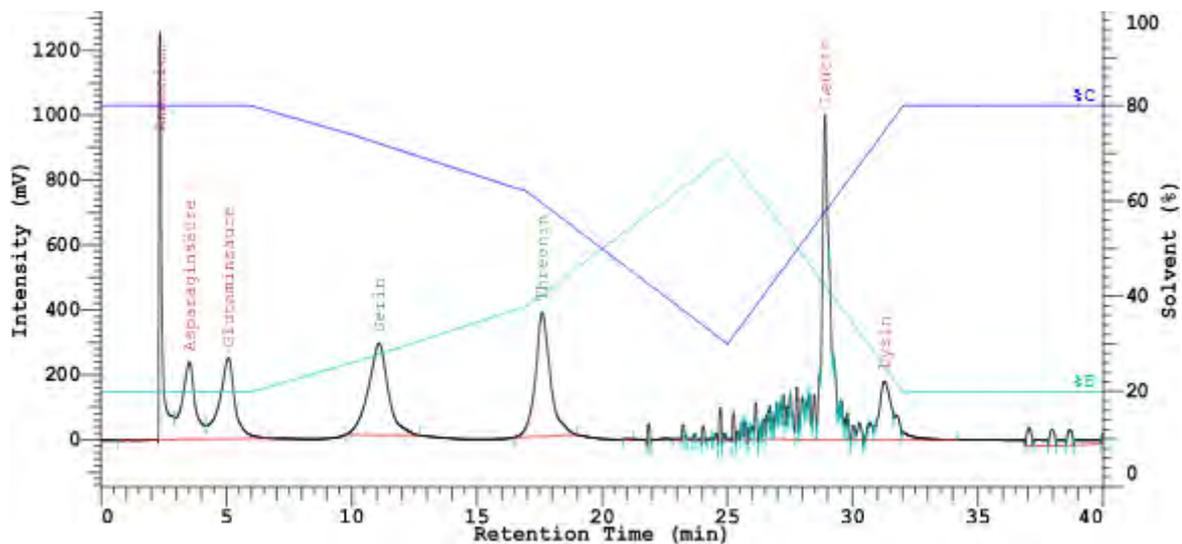


Abbildung 4.4-2 Suche eines geeigneten Methanolgradienten. Alle Peaks des Mischstandards sind vorhanden. Die ersten drei Peaks weisen keine Basislinientrennung auf. Die restlichen Peaks sind basisliniengetreunt. Ab ca. 22 min stören Luftpeaks das ansonsten saubere Chromatogramm. Der Methanolgradient erreicht seine maximal Konzentration von 70 % Methanol bei einer Retentionszeit von 25 min. (Fließmittelgeschwindigkeit: 0,9 mL/min)

Abbildung 4.4-2 zeigt außerdem, dass diese Luftpeaks nur ab einem bestimmten Verhältnis von Puffer und Lösemittel auftreten. Der Grund dafür ist, dass Methanol mit Wasser relativ hochviskose Flüssigkeiten bildet (Abbildung 4.4-3). Bei einem Methanolgehalt von 40 % steigt die Viskosität auf 1,62 mPa s an. Wasser hat im Vergleich eine Viskosität von 1 mPa s. Lösemittel mit einer höheren Viskosität als die von Wasser sind weniger gut für die HPLC geeignet, aufgrund des hohen entstehenden Druckes (Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. S. 77). Bei diesem Gradienten ist ein Fluss von maximal 0,9 mL/min möglich, da sonst das Drucklimit von 350 bar überschritten wird. Der hohe Druck entspannt sich im Detektor. Dadurch kommt es zum Ausgasen von noch vorhandener Luft.

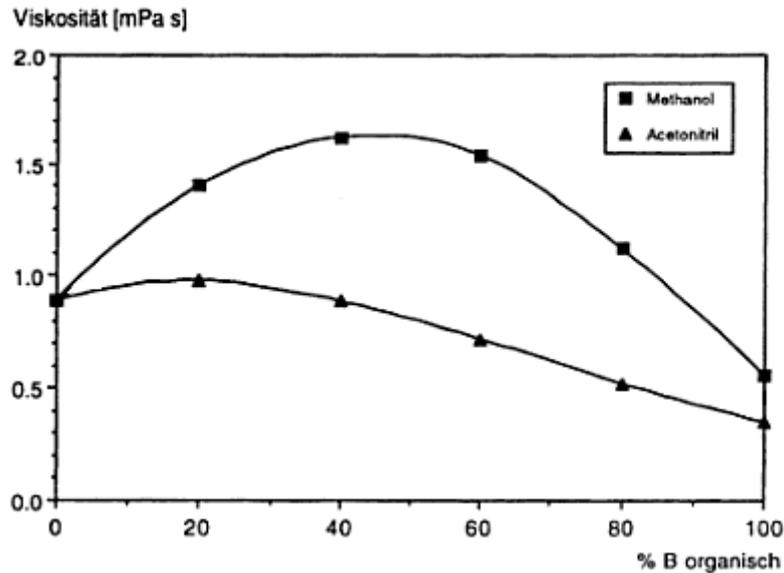


Abbildung 4.4-3 Viskosität von Lösemittel-Wasser-Gemischen. Die Grafik zeigt das Viskositätsverhalten von Gemischen aus Wasser mit Methanol (Viereck) oder Acetonitril (Dreieck). Vertikal ist die Viskosität bei 25 °C aufgetragen und horizontal der prozentuale Anteil der Lösungsmittelkomponente. Das Viskositätsmaximum für Methanol liegt bei 1,62 mPa s. Es wird bei einer Mischung von 40 % Methanol mit 60 % Wasser erreicht. (Abb. modifiziert nach: Meyer V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. S. 167)

Die Luftpeaks der Methanolmethode waren durch Veränderung des Gradienten nicht zu beseitigen (Abbildung 4.4-4). Der Gradient hätte eine Zusammensetzung von 40 % Methanol nicht erreichen dürfen, denn dadurch hätten sich die Retentionszeiten deutlich verlängert.

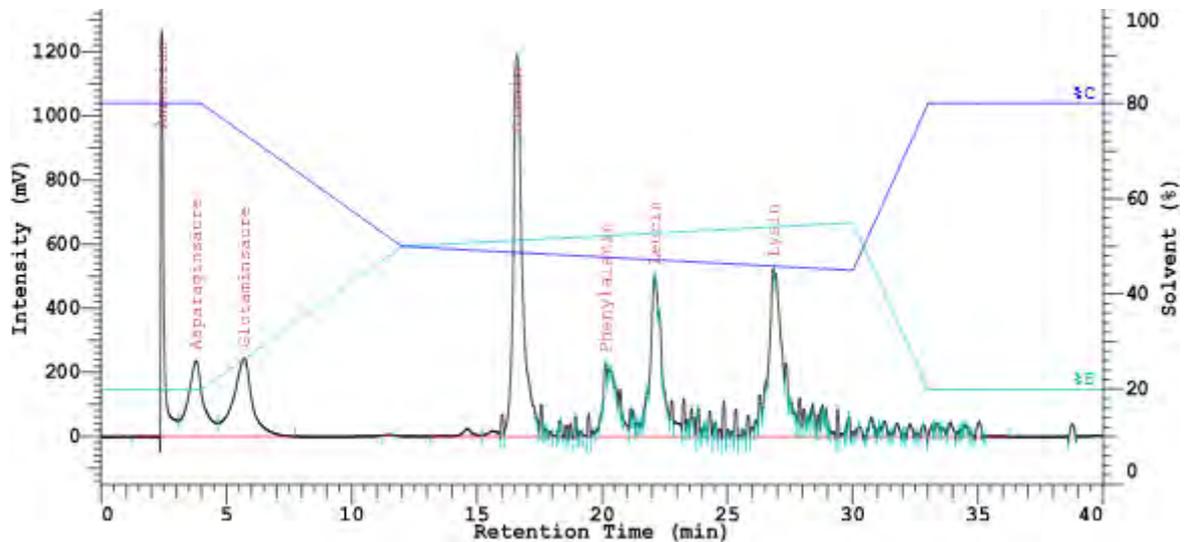


Abbildung 4.4-4 Versuch Luftpeaks durch Veränderung des Gradienten zu entfernen. Bei diesem Lauf wurde einen Gradienten gewählt, der bei einer Retentionszeit von 30 min sein Maximum von 55 % Methanol erreicht. Ab ca. 16 min sind abermals Luftpeaks sichtbar.

Die OPA-Derivate müssen zügig analysiert werden, damit sie keinen Abbau erfahren (vgl. Kapitel 4.3). Dies gilt ebenfalls für die Hydrolyseproben, da auch sie einem Abbauprozess unterliegen könnten.

Eine weitere Möglichkeit für den hydrophoben Fließmittelanteil ist Acetonitril. Das Viskositätsproblem ist mit dem Wechsel des Lösemittels gelöst (vgl. Abbildung 4.4-3). Die Viskosität von Acetonitril liegt, ganz gleich in welchem Mischungsverhältnis, immer unterhalb der von Wasser. Somit konnte der Fluss von 0,9 mL/min auf 1,2 mL/min angehoben werden, ohne 300 bar zu überschreiten. Ein weiterer Vorteil ist, dass Acetonitril deutlich schmalere Peaks als Methanol zeigt. Außerdem wird im Vergleich weniger Acetonitril verbraucht als Methanol. Dafür ist Acetonitril fast dreimal so teurer (Concha-Herrera, V. et al.: *A comparative study of the performance of acetonitrile and methanol in the multi-linear gradient separation of proteic primary amino acids*. S. 257). Aufgrund dieser Tatsache wurde keine weitere Arbeitszeit in die Optimierung des Acetonitrilgradienten investiert, da es eine weitere Gradientenmethode gibt, die die Vorteile von Acetonitril mit denen von Methanol verbindet.

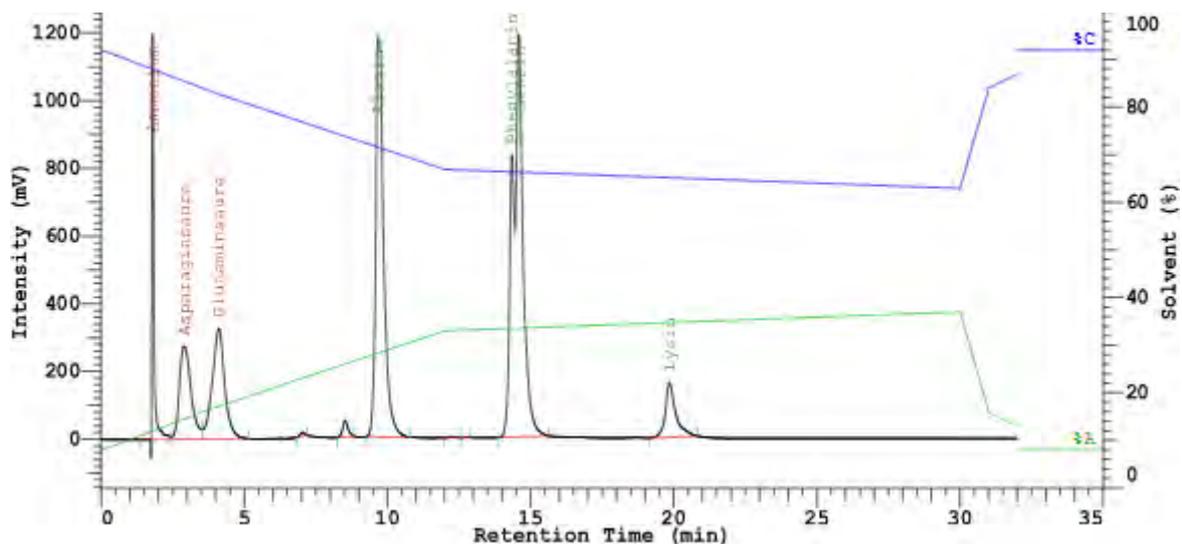


Abbildung 4.4-5 Suche eines geeigneten Acetonitrilgradienten. Die Aminosäurepeaks sind hier schmalere und höher verglichen mit einem Methanolgradienten. Die Peaks von Phenylalanin und Leucin sind kaum voneinander getrennt. Der Lösemittelanteil ist deutlich geringer im Vergleich zu Methanol. (Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min)

Bei dieser Methode wird als hydrophober Anteil des Laufmittels ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol und Wasser in Anteilen von (45/45/10) verwendet (Wang, L. et al.: *Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction*. S. 1260). Die resultierenden Peaks sind vergleichbar schmal und der Einsatz des teureren Acetonitrils wurde deutlich verringert (Abbildung 4.4-6).

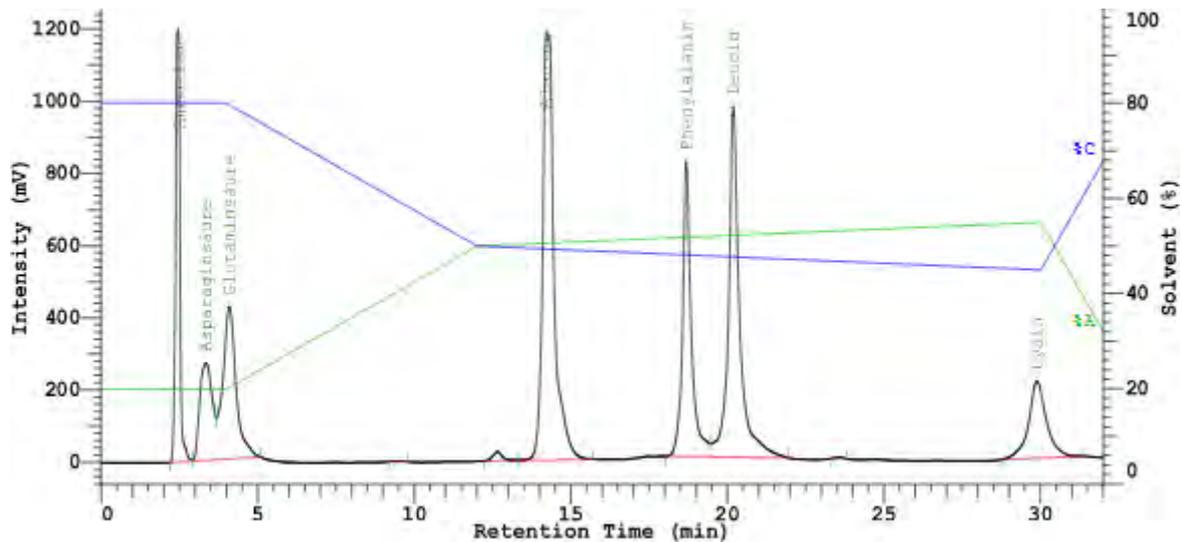


Abbildung 4.4-6 Chromatogramm mit Hilfe eines ACN/MeOH/H₂O-Gradienten. Dieses Chromatogramm zeigt die Auftrennung der Aminosäuren mit Hilfe des genannten Lösungsmittelgemisches (A). Die Gradientenparameter wurden vorerst von dem Methanolgradienten übernommen. Asparaginsäure und Glutaminsäure sind nicht optimal getrennt. Die störenden Luftpeaks sind nicht mehr vorhanden. Der Druck liegt unter 300 bar. (Fließmittelgeschwindigkeit: 0,9 mL/min)

Der Gradient musste daraufhin für eine optimale Peaktrennung mit diesem Laufmittel verbessert werden. Dazu diente die erste Hydrolyse H1. Mit dieser Probe wurde der Gradient optimiert und im Rahmen dessen auch der Fluss auf 1,2 mL/min erhöht. Die Erhöhung des Flusses erlaubte es den Gradienten abzufachen und zu verlängern, bei einer Zunahme der Messzeit von nur 15 min (Abbildung 4.4-7). Die Peakform von Alanin lässt vermuten, dass dort noch eine andere Aminosäure zu finden ist. Da die Quantifizierung mittels der Alaninfläche meist verlässliche Ergebnisse liefert, konnte dies nicht vollständig aufgeklärt werden.

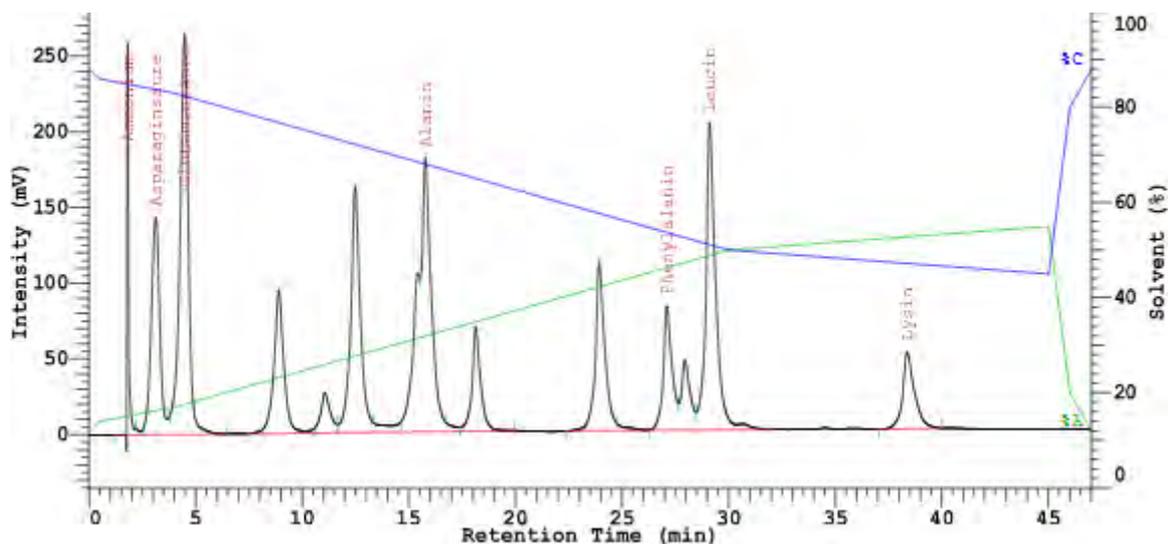


Abbildung 4.4-7 Chromatogramm der Hydrolyse H1. Im Vergleich zum vorherigen Bild wurde der Anteil von %A zu Beginn herabgesetzt. Dadurch trennen sich Asparagin- und Glutaminsäure besser voneinander. Phenylalanin und Leucin sowie der von ihnen umschlossene Peak sind auswertbar, wenn auch nicht optimal getrennt. Die Peakform von Alanin lässt vermuten, dass dort noch eine andere Aminosäure zu finden ist. (Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min)

Mit Erhöhung des Flusses liegt der Druck der Anlage zu Spitzenzeiten mit 340 bar noch unterhalb der Grenze von 350 bar. Dieser hohe Druck belastet die Anlage stark, sodass sie im späteren Verlauf der Messungen mit druckstabileren Materialien umgebaut und der Fluss wieder auf 1,1 ml/min gesenkt werden musste. Im Zuge dessen wurde auch die Messzeit auf 50 min verlängert. Hergestellt wird das Lösemittelgemisch indem 225 mL Methanol und 225 mL Acetonitril in je einem Messzylinder abgemessen werden. Beide Lösemittel werden in einem 500 mL Messkolben vereint und bis zu der Markierung mit Wasser aus der Reinstwasseranlage aufgefüllt. Bei der Mischung von Wasser und Methanol kommt es zu einer Volumenkontraktion (Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. S. 64). Wird das Lösemittelgemisch auf die beschriebene Art und Weise angesetzt, ist der Anteil Methanol zu Acetonitril konstant. Abweichungen von diesem Vorgang führen zu Veränderungen der Anteile der einzelnen Komponenten und somit auch der Polarität des Lösemittels.

Auf die Entwicklung der Zusammensetzung der mobilen Phase folgen die Auswahl des internen Standards, des zur Quantifizierung verwendeten Gradienten und der verwendeten Konzentrationen für die Kalibrierung. Der interne Standard wird der Probe hinzugefügt. Dadurch können Verluste bei der Hydrolyse oder Schwankungen des Fluoreszenzsignals aufgrund der OPA-Derivatisierung ausgeglichen werden. Zwei interne Standards wurden getestet: Norleucin und α -Aminobuttersäure. Norleucin wurde gewählt, da er als üblicher genutzter interner Standard (Anders, J.C.: *Advances in Amino Acid Analysis*. S. 34) genannt und auch in anderen bereits verwendeten Veröffentlichungen erwähnt wurde (Fountoulakis, M.; Lahm, H.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. S. 128). Um die Retentionszeit von Norleucin zu testen, wurden zwei Chromatogramme erstellt. Das Erste ohne Norleucin, nur mit den sechs zur Quantifizierung verwendeten Aminosäuren und das Zweite mit Norleucin versetzt (Abbildung 4.4-8).

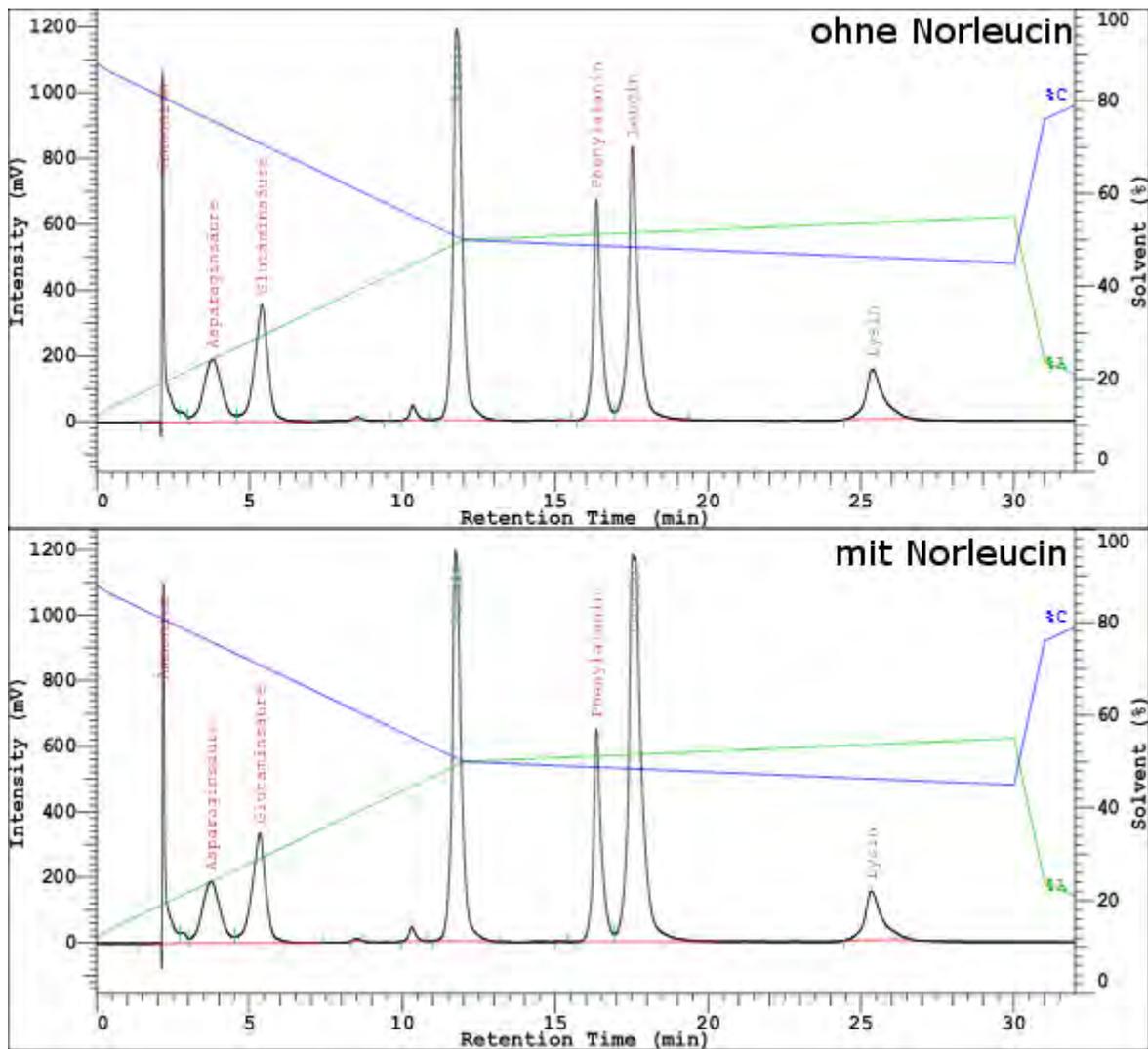


Abbildung 4.4-8 Retentionszeit von Norleucin. Auf dem oberen Chromatogramm ist eine Auftrennung der sechs, als Standard verwendeten Aminosäuren in einer Konzentration von 30 mg/L zu sehen (ohne Norleucin). Im unteren Chromatogramm wurde ein Mischstandard mit Norleucin in derselben Konzentration angesetzt. Ein Peak für Norleucin ist nicht zu erkennen, aber eine deutliche Vergrößerung der Peakfläche von Leucin. (Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min)

Die beiden Chromatogramme zeigen das Problem sehr deutlich. Norleucin ist von Leucin nicht zu trennen und das obwohl sich die beiden Aminosäuren strukturell deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 4.4-9).

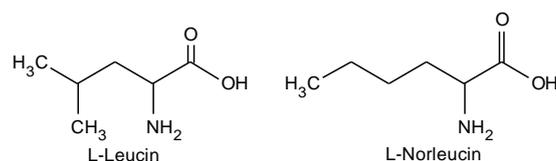


Abbildung 4.4-9 Leucin und Norleucin. Vergleicht man die Strukturen von Leucin (links) und Norleucin (rechts), so unterscheiden sie sich deutlich.

Eine Verlängerung des Gradienten wurde ausgetestet, blieb aber erfolglos (vgl. Abbildung 7.4-1 im Anhang). Daraufhin wurde die bereits in Kapitel 3.3 erwähnte α -Aminobuttersäure als interner Standard getestet. Der für die Trennung von Norleucin und Leucin entwickelte, flachere Gradient ohne Plateau wurde für alle folgenden Messungen beibehalten. Der Gradient steigt bis zu einem %A-Anteil von 60 % und fällt dann steil ab auf den Ausgangsanteil von 12 %. Die Auftrennung der sechs Aminosäuren versetzt mit AABA und dem beschriebenen Gradienten ist in Abbildung 4.4-10 zu sehen. AABA zeigt auch in Chromatogrammen von Hydrolyseproben eine gute Identifizierbarkeit und ist daher als interner Standard geeignet.

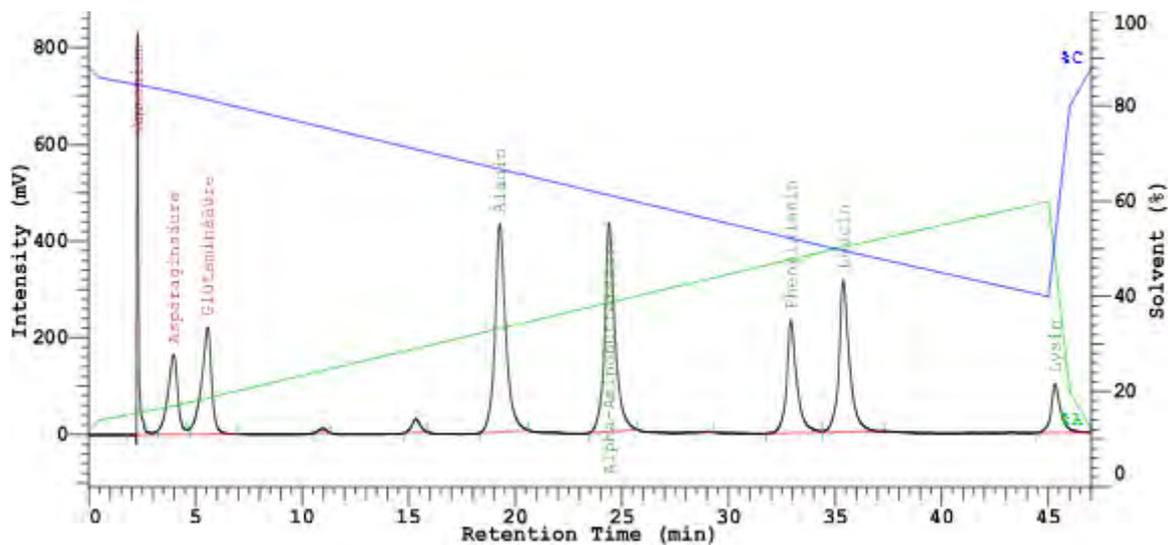


Abbildung 4.4-10 α -Aminobuttersäure als interner Standard. α -Aminobuttersäure eluiert nach Alanin und vor Phenylalanin bei einer Retentionszeit von ca. 24,5 min. (Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min)

Für diese Arbeit musste außerdem ein Bereich bestimmt werden, in dem eine lineare Kalibrierung konstant möglich ist. Dazu wurden Mischstandards mit 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L und 20 mg/L Aminosäuren hergestellt. Die geforderte Linearität ist über den gesamten Bereich gegeben, da das Bestimmtheitsmaß bei über 0,99 liegt (Tabelle 4.4-4).

Tabelle 4.4-4 Bestimmtheitsmaße der Aminosäuren. Bei der durchgeführten Kalibrierung am 04.09.13 wurden vier Messpunkte genutzt und die Kalibriergerade durch den Ursprung gelegt. Daraus ergeben sich die in der Tabelle gezeigten Werte für die Aminosäuren. Das Bestimmtheitsmaß liegt bei allen Aminosäuren oberhalb von 0,99.

Aminosäure	R ²
Asp	0,9982
Glu	0,9985
Ala	0,9988
Phe	0,9997
Leu	0,9980
Lys	0,9993

Mit dieser Messung kann noch eine weitere Aussage getroffen werden: die Nachweisgrenze wird unterhalb von 1 mg/L liegen. Das Rauschen der Basislinie ist, im Vergleich zu den entstandenen Peaks, wesentlich kleiner. Die Systempeaks, die vor Alanin auftreten, erscheinen allerdings in dieser Auflösung groß (Abbildung 4.4-11). Um immer oberhalb der Bestimmungsgrenze zu arbeiten, wurde die Faustregel „dreifache Nachweisgrenze = Bestimmungsgrenze“ (Kromidas, S.: *Validierung in der Analytik*. S. 194) auf diese 1 mg/L angewendet. Daher liegt die niedrigste, zur Kalibrierung genutzte Konzentration der Aminosäurestandards bei 3 mg/L. Diese Entscheidung hat sich, in Bezug auf die Ergebnisse der Messungen, als positiv erwiesen.

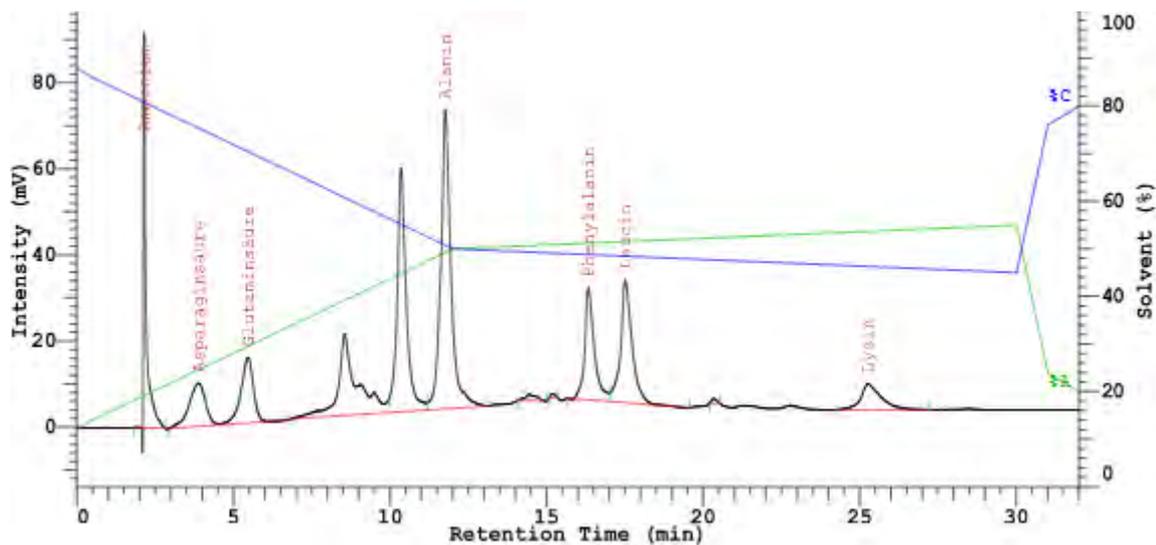


Abbildung 4.4-11 Chromatogramm eines Mischstandards mit 1 mg/L Aminosäuren. Alle erwarteten Peaks sind erkennbar. Die Trennung der einzelnen Peaks hat sich durch die niedrigere Konzentration nicht verschlechtert. Die Systempeaks vor Alanin wirken größer aufgrund der kleineren Auflösung, sind aber klar von den Aminosäurepeaks unterscheidbar. (Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min)

Die Obergrenze der Kalibrierung wurde auf 20 mg/L festgelegt. Sie musste für die Quantifizierung von Lysozym angehoben werden (vgl. Kapitel 4.2). Dagegen sprechen jedoch zwei Argumente. Zum einen würde ein weiterer Standard die Messzeit der Kalibrierung um ca. 60 min erhöhen, denn die Derivatisierung kann mit ca. 15 min veranschlagt werden. Die Chromatografie benötigt 47 Minuten. Diese Verlängerung der Kalibrierzeit waren nicht mit dem Tagesablauf in Einklang zu bringen. Zum anderen sollte die Kalibrierung nicht verändert werden, um eine Vergleichbarkeit von BSA und Lysozym zu gewährleisten. Die Verlängerung der Messzeit der Kalibrierung wurde umgangen, indem der 40 mg/L Standard nach den Proben vermessen und später in die Kalibrierung eingefügt wurde. Mit Ausnahme von Lysin, dass über ein $R^2=0,982$ verfügt, zeigten alle Aminosäuren ein Bestimmtheitsmaß von über 0,99. Daher sind sie durchaus mit den Ergebnissen von BSA zu vergleichen.

Für die Herstellung der Standards werden die benötigten Mengen der Stammlösungen in einem 50 mL Messkolben zusammengeführt. Durch das Pipettieren der Stammlösung beinhalten die Standards den Fehler der Pipette. Die Konzentrationen von 3 mg/L bis 20 mg/L sind alle mit einer 1000 µL Pipette durchführbar. Für 40 mg/L erhöht sich der Fehler durch mehrfaches Pipettieren. Dieser zeigt sich aber in der Kalibrierung nicht. Für alle Standards wurde dieselbe Pipette mit der internen Nummer V8 verwendet. Sie wird auch für den Bradford Assay genutzt. Die Pipette wurde bei drei Volumina jeweils fünfmal geprüft und für gut befunden. Der Variationskoeffizient liegt bei unter 1 % und zeigt somit eine zufriedenstellende Präzision der Pipette an. Der Betrag der Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert bezogen auf den Sollwert liegt ebenfalls bei unter 1 % und zeugt somit von einer hohen Richtigkeit (siehe Anhang, Kapitel 7.6). Diese Pipette wurde daraufhin nur noch für dieses Projekt verwendet und nicht für den Laboralltag genutzt. Somit konnte auf eine tägliche Pipettenprüfung verzichtet werden. Abschließend werden die Parameter der Methode, die Anwendung gefunden, haben zusammengefasst:

Mobile Phase: Natriumacetatpuffer 50 mmol/L und Acetonitril/Methanol/H₂O (45/45/10)

Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min für alle Bestimmungen von BSA; 1,1 mL/min für alle Bestimmungen von Lysozym

Gradient: Bedingt durch die Änderung der Fließmittelgeschwindigkeit musste auch der Gradient angepasst werden (Tabelle 4.4-5).

Tabelle 4.4-5 Gradientenelution. In den beiden Tabellen sind die verwendeten Gradienten für die Quantifizierung der darüber stehenden Proteine zu sehen. Da der Fluss auf 1,1 mL/min gesenkt werden musste, folgte eine Änderung des Gradienten bei Lysozym. Dies war technisch bedingt, da die HPLC-Anlage dem hohen Druck auf Dauer nicht stand hielt. Um möglichst wenig zu verändern, wurde nur der spätere Teil des Gradienten um drei Minuten verlängert

BSA			Lysozym		
Zeit [min]	Lösemittel [%]	Puffer[%]	Zeit [min]	Lösemittel [%]	Puffer[%]
0	12	88	0	12	88
0,5	14	86	0,5	14	86
4	17	83	4	17	83
35	50	50	35	50	50
45	60	40	48	60	40
46	20	80	49	20	80
47	12	88	50	12	88

Interner Standard: α-Aminobuttersäure

Konzentrationen der Aminosäurestandards: 3 mg/L, 9 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L

5 Ergebnisse der Proteinquantifizierung

Zum Abschluss der Arbeit werden die Ergebnisse der Proteinquantifizierung vorgestellt und diskutiert. Da die generierte Datenmenge beträchtlich ist, werden nur die zum Verständnis nötigen Chromatogramme und Daten in dieser Arbeit gezeigt. Die Gesamtheit der Daten ist auf der beigelegten CD zu finden.

5.1 Auswertung und Diskussion

Die Peaks, sowohl der Kalibrierung als auch der Proben, wurden nach ihrer individuellen Peakgestalt ausgewertet, da eine Auswertung nach Retentionszeit nicht möglich ist. Die Retentionszeiten verändern sich nicht nur von Messtag zu Messtag, sondern auch innerhalb einer Messreihe. Diese Schwankungen sind nicht verhinderbar (Merck KGaA: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. S. 33). Da jeder Peak einzeln betrachtet und integriert wurde, können hier keine allgemein gültigen Retentionszeiten genannt oder Anweisungen zur Integration gegeben werden.

Die jeweiligen Kalibrierungen zu den Hydrolyseproben werden in der Arbeit nicht gezeigt. Sie sind auf der beiliegenden CD einzusehen. Innerhalb der Kalibrierungen gibt es Schwankungen, die zu einem Bestimmtheitsmaß von unter 0,99 führen. Das niedrigste Bestimmtheitsmaß, mit 0,9396 für Asparaginsäure, ist bei der Kalibrierung für die Proben H13, H14 und H15 zu finden. Diese Abweichungen sind derivatisierungsbedingt, denn sie betreffen meist nur eine Konzentration innerhalb der Kalibrierung und sind bei allen im Mischstandard enthaltenen Aminosäuren wiederzufinden. Da sich diese Methode nicht im Bereich einer Spurenanalyse bewegt und die Proben den gleichen derivatisierungsbedingten Schwankungen ausgesetzt sind, können die Kalibrierungen als akzeptabel bewertet werden.

Nachdem die Auswertung der Peaks und die Bewertung der Kalibrierungen erklärt wurden, werden nun die individuellen Gegebenheiten der Probenanalyse und -beschaffenheit erläutert. Die Proben wurden durchnummeriert von H1 bis H15 für die Hydrolyseproben von BSA und HL1 bis HL6 für die Proben von Lysozym. Besonders die Proben H2 und H3 sind von Bedeutung. Anhand dieser Proben können Aussagen über die Haltbarkeit und den Einfluss der Derivatisierung auf die Ergebnisse gemacht werden.

Die Probe H1 diente hauptsächlich zu Testzwecken. Nach einer 24 stündigen Hydrolyse wurde 1 mL der Probe neutralisiert. Dies geschah unter mehrmaligem Testen des pH-Wertes mit pH-Papier. Dadurch ist eine nicht quantifizierbare Menge an Probe verlorengegangen. Die Neutralisation mit

Natronlauge fand in einem Mikroreaktionsgefäß statt. An ihm wurde das Endvolumen von 1,8 mL abgelesen. Die Ergebnisse sind also als ungenau einzustufen, ermöglichten es aber einzuschätzen, ob die Hydrolyse grundsätzlich gelungen ist. Anhand von H1 kann die für alle Messungen gültige Auswertung, die in Excel statt gefunden hat (Tabelle 5.1-1), erläutert werden. Bei den angegebenen Aminosäurekonzentrationen handelt es sich um Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Diese werden mit Hilfe von Formel 2, in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Da diese Messwerte um den wahren Wert schwanken, wird ein Mittelwert aus den sechs Proteinkonzentrationen gebildet. Diese Schwankungen können, wie bereits für die Kalibrierung erwähnt, aufgrund der Derivatisierung entstanden sein. Um ein Ergebnis zu erzielen das näher am wahren Wert liegt, wurden Proteinkonzentrationen nicht mit in die Berechnung des Mittelwertes einbezogen, wenn sie um mehr als 30 % von diesem abweichen. Diese Grenze wurde gewählt, da durch sie merklich bessere Ergebnisse erzielt wurden. Bei ihrer Unterschreitung ist es möglich, dass korrekte Messwerte entfernt werden, obwohl sie nah am wahren Wert liegen. Der Grund hierfür ist der Bezug zum Mittelwert. Der Mittelwert kann durch Ausreißer stark beeinflusst werden. In dieser Arbeit wäre der Bezug zu einem rechnerischen wahren Wert möglich gewesen. Dieser wurde aber verworfen, da in zukünftigen Messungen mit unbekanntem Proben ein Verfahren angewendet werden muss, ohne den rechnerischen Wert zu kennen.

Tabelle 5.1-1 Auswertung von H1. Die Spalte „Aminosäurekonz.“ zeigt die mittels HPLC gemessene Aminosäurekonzentration der Probe an. In der darauffolgenden Spalte wird die daraus errechnete Proteinkonzentration angegeben. Unterhalb dieser Angaben wird ein Mittelwert aus den Proteinkonzentrationen gebildet und die Verdünnung der Probe während der Hydrolyse sowie bei der Neutralisation berücksichtigt. In der ganz rechten Spalte ist die Unrichtigkeit der einzelnen Aminosäurekonzentrationen bezogen auf den Mittelwert angezeigt. Die Unrichtigkeit von Alanin beträgt über 30 %. Daher wurde dieser Wert aus der Berechnung der Proteinkonzentration entfernt.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
04.09.2013	H1	Asp	13,08	0,121	0,121	11,54
		Glu	18,75	0,107	0,107	1,16
		Ala	9,04	0,147	-	35,11
		Phe	6,12	0,091	0,091	15,96
		Leu	11,56	0,096	0,096	11,45
		Lys	11,53	0,089	0,089	18,09
		Mittelwert		0,108	0,101	
		Verdg. berück.		0,390	0,363	

Die Proben H2 und H3 wurden aus derselben Proteinlösung gewonnen (vgl. Tabelle 7.8-1 im Anhang). Sie enthalten beide den internen Standard AABA und wurden 24 h hydrolysiert. Ein Milliliter der jeweiligen Probe wurde in einen 2 mL Messkolben pipettiert und mit 501 µL der NaOH-Lösung

neutralisiert. Nach dem Abkühlen wurden die Kolben auf 2 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Je eine Hälfte von H2 und H3 wurde in den Autosampler gestellt. Die andere Hälfte wurde im Kühlschrank gelagert. Die Messungen der Standards waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Die Proben wären 2 h später vermessen worden. Aufgrund eines Fehlers wurden die Messungen nach der Kalibrierung durch den Autosampler abgebrochen. Dies wurde erst ca. 18 h nach Einstellung der Proben festgestellt. Daraufhin wurden sowohl die über Nacht bei Raumtemperatur als auch die im Kühlschrank gelagerten Proben vermessen. Für diese Messreihe musste das OPA-Reagenz aufgefüllt werden. Es wurde eine neue Kalibrierung mit zwei Messpunkten bei 3 mg/L und 21 mg/L durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war die Kalibrierung noch nicht auf 3 mg/L bis 20 mg/L festgelegt. Zur Auswertung der Messergebnisse gab es also zwei unterschiedliche Kalibrierungen sowie die beiden, bei unterschiedlichen Temperaturen über Nacht gelagerten, Proben. Werden die Ergebnisse der Messungen mit der alten Kalibrierung ausgewertet, fallen sie durchweg zu hoch aus. Das lässt sich durch das reaktivere OPA-Reagenz erklären. Die daraus gewonnenen Ergebnisse sind nicht verwendbar und wurden auch nicht um Unrichtigkeiten korrigiert. Bessere Ergebnisse sind mit Hilfe der neuen Kalibrierung zu gewinnen. Sie liegen laut Einwaage näher an der Proteinkonzentration (vgl. Tabelle 5.1-2). Bei einem Vergleich der Ergebnisse mit der Lagerung der Proben, kann ein Abbauprozess bei der ungekühlten Probe H3 vermutet werden. Ob diese Schwankungen auf die angewandte Methode zurückzuführen sind oder ein Abbauprozess stattfindet ist nicht völlig zu klären, da H2 ein solches Verhalten nicht zeigt. Aufgrund dieser nicht eindeutigen Ergebnisse wird sicherheitshalber von einem Abbauprozess ausgegangen und versucht, die Proben zügig zu analysieren. Eine sichere Erkenntnis ist, dass das OPA-Reagenz zwischen zusammengehörigen Messungen nicht aufgefrischt werden darf, sei es durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol oder dem Auffüllen des Vorratsbehälters mit ungenutztem Reagenz aus dem Kühlschrank. Werden die Messwerte nun auf Vergleichbarkeit mit dem Bradford-Assay geprüft, so ist festzustellen, dass diese gegeben ist. Die nicht korrigierten Proteinkonzentrationen von H2 mit 0,431 g/L und 0,434 g/L sowie den Abweichungen 7,8 % und 8,5 % sind dem Wert der Einwaage von 0,4 g/L sogar näher als die 0,471 g/L des Bradford-Assays der Abweichung von 17,8 % aufweist. Wird der korrigierte Wert von H2 mit 0,403 g/L betrachtet, ist dieser dem vom Bradford-Assay ermittelten Wert in der Genauigkeit sogar weit überlegen.

Die Proben H4 bis H9 enthalten jeweils dieselbe Proteinlösung. H4, H5 und H6 werden 24 h hydrolysiert und H7, H8 und H9 48 h. Wie bei H1, H2 und H3 ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit dem Bradford-Assay nicht abzusprechen. Durch das Fehlen eines internen Standards ist die Aussagekraft begrenzt. Dies betont nochmals die Wichtigkeit, immer einen internen Standard mitzuführen. Die korrigierten Proteinkonzentrationen liegen, bis auf H9, weiter entfernt vom Sollwert, als die unkorrigierten Werte. Das ist auf das Fehlen eines korrigierenden internen Standards

zurückzuführen. Daher wird hier eine Auswertung mit den nicht korrigierten Werten vorgenommen. Laut Einwaage beträgt die Proteinkonzentration 0,398 g/L. Der Bradford-Assay ermittelte einen Wert von 0,431 g/L und weicht somit um 8,3 % vom Sollwert ab. H6 und H9 weisen mit 15,8 % und 20,9 % die größten Abweichungen auf. H7 liegt mit einer Abweichung von 2,5 % am dichtesten am wahren Wert. Durchschnittlich ergibt sich nach 24 h Hydrolyse ein Wert von 0,361 g/L mit einer Abweichung von 9,3 %. Der Durchschnitt für die 48 h Hydrolyse liegt bei 0,413 g/L mit einer Abweichung von 3,7 %. Wird ein Mittelwert aus den einzelnen Proteinkonzentrationen einer Serie gebildet, so erhöht sich die Genauigkeit. Werden die einzelnen Abweichungen der Aminosäuren betrachtet, zeigt sich, dass die Alaninkonzentration bei allen Proben zu hoch ausfällt (siehe dazu Tabelle 7.8-3 und Tabelle 7.8-4. im Anhang). Der Grund für die Abweichungen ist im Chromatogramm zu finden. Wie schon in Kapitel 4.4 genannt, zeigt Alanin teilweise einen deutlichen Doppelpeak. In manchen Chromatogrammen ist dieser weniger deutlich und kann nicht als zwei Peaks gewertet werden (Abbildung 5.1-1). Aufgrund der Tatsache, dass die gesamte Fläche Alanin zugeordnet wurde, ist die Alaninkonzentration zu hoch.

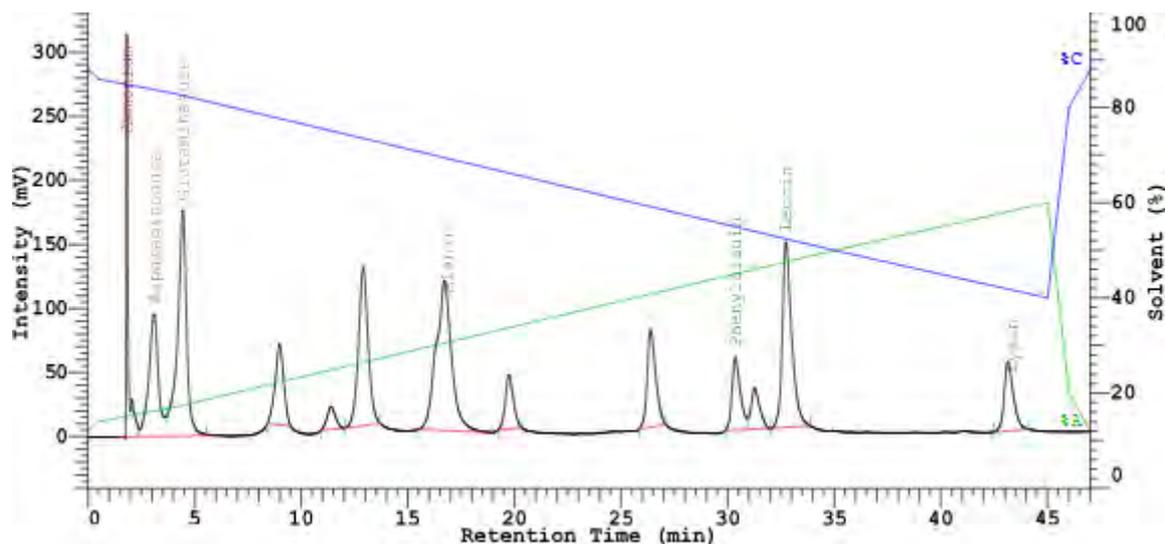


Abbildung 5.1-1 Erstes Chromatogramm von H4. Der Alaninpeak lässt einen weiteren Peak, der darunter liegt, vermuten. Dieser ist aber nicht klar abtrennbar. Daher wurde der gesamte Peak der Aminosäure Alanin zugeordnet. (Fließmittelgeschwindigkeit: 1,2 mL/min)

Bei den Proben H10 bis H15 wurde ein interner Standard mitgeführt. H10, H11 und H12 wurden 24 h hydrolysiert. H13, H14 und H15 hydrolysierten 48 h im Trockenschrank. Der Sollwert beträgt hier laut Einwaage 0,405 g/L und der Bradford-Assay ermittelte 0,447 g/L. Das ergibt eine Abweichung von 10,4 %. H10 bis H12 mussten nicht, durch das Entfernen von Aminosäurekonzentrationen aufgrund der Unrichtigkeit, korrigiert werden und zeigen sehr gute Ergebnisse. H10 ermittelte mit 0,405 g/L exakt den Sollwert. H11 wich um 4,0 % vom Sollwert ab und H12 um 3,2 %. Der Mittelwert für die 24 h Hydrolyse zeigte eine Abweichung von 2,3 %. Die korrigierten Werte der 48 stündigen Hydrolyse zeigen ebenfalls sehr gute Ergebnisse. H15 erreicht ebenfalls den Sollwert von 0,405 g/L. H13 und

H14 zeigen Abweichungen von unter einem Prozent. Dadurch liegt die Abweichung des Mittelwertes bei 0,16 %. Ob diese Ergebnisse zufällig sind oder die Methode tatsächlich Proteine mit einer so hohen Genauigkeit quantifizieren kann, ist mit den vorliegenden Datenmenge nicht eindeutig zu beantworten. Die konsequente Abweichung einer Aminosäure innerhalb einer Messreihe ist auch bei den Proben H13, H14 und H15 zu beobachten. Der 9 mg/L Standard zeigt sich besonders bei Asparaginsäure innerhalb der Kalibriergeraden als zu hoch (Abbildung 5.1-2).

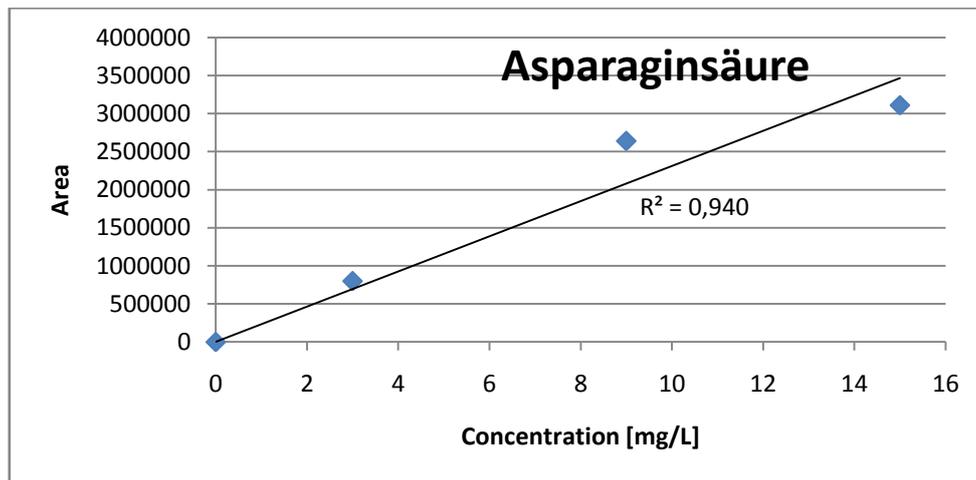


Abbildung 5.1-2 Kalibriergerade von Asparaginsäure für die Probenreihe H13/14/15. Eine deutliche Abweichung des 9 mg/L Standards nach oben ist erkennbar. Das Bestimmtheitsmaß spiegelt dies mit $R^2=0,940$ wider. Es ist das schlechteste aller durchgeführten Messungen.

Das Chromatogramm für Asparaginsäure zeigt keine Besonderheiten. Der dazugehörige Peak ist nahezu basisliniengetrennt und nicht deformiert (Abbildung 5.1-3). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Abweichungen auf die Kalibrierung zurückzuführen sind.

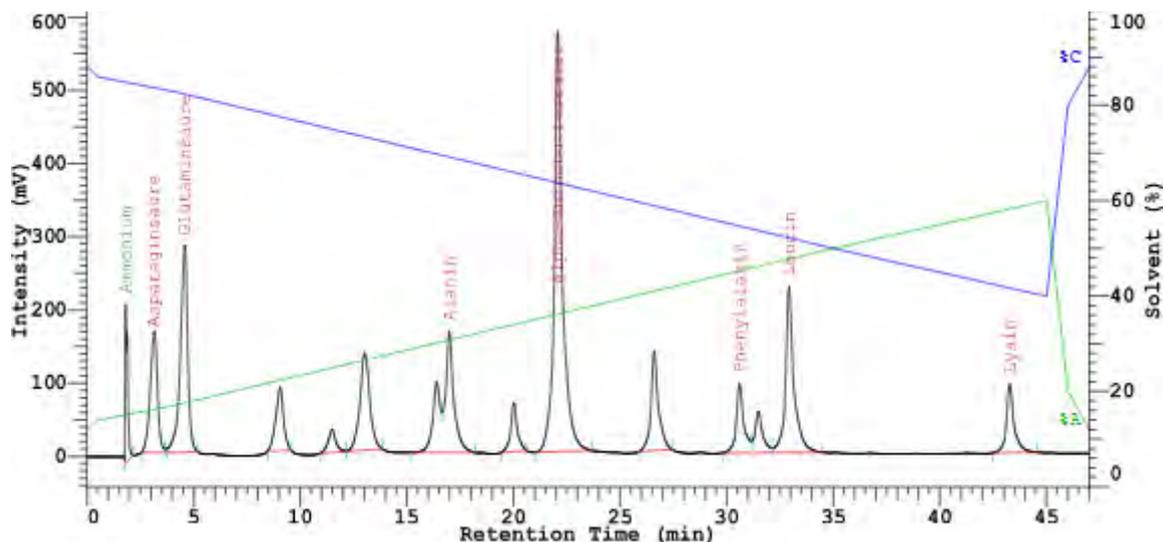


Abbildung 5.1-3 Erstes Chromatogramm der Probe H13. Asparaginsäure ist deutlich getrennt vom Ammoniumpeak und der nachfolgenden Glutaminsäure. Wird das Chromatogramm betrachtet, wären eher die Ergebnisse des Alanins als kritisch anzusehen. Die Ergebnisse für Alanin fügen sich hingegen gut ein und zeigen keine besonderen Abweichungen, da der zweite Peak klar abtrennbar ist.

Nachdem gezeigt wurde, dass die entwickelte Methode in der Lage ist BSA mit vergleichbarer Genauigkeit wie der Bradford-Assay zu quantifizieren, folgen nun die Ergebnisse der Lysozym-Hydrolyse. HL1, HL2 und HL3 wurden für 24 h hydrolysiert. HL4, HL5 und HL6 hydrolysierten 48 h. HL1 bis HL6 wurden aus derselben Proteinlösung hergestellt. Sie enthalten den internen Standard AABA. Der Sollwert laut Einwaage beträgt hier 0,801 g/L. Die Proteinkonzentration nach Bradford beträgt 0,897 g/L. Damit ergibt sich eine Abweichung von 12,0 %. Trotz des Größenunterschiedes von BSA, mit dem der Bradford-Assay kalibriert wurde, zu Lysozym, ist keine erwartete größere Abweichung des Bradford-Assays zu erkennen. Bei den Proben H2 und H3 betrug die Abweichung des Assays sogar 17,8 %. HL1 zeigt mit 0,803 g/L und einer Abweichung von 0,25 % das beste Ergebnis. Die Proteinkonzentration von HL2 führt zu einer Abweichung von 4,4 % und HL3 zu 1,7 %. Die maximale Abweichung dieser Messreihe zeigt HL5 mit 5,0 %. Der Mittelwert der 24-stündigen Hydrolyse zeigt eine Abweichung vom Sollwert von 0,79 %, die 48 h Hydrolyse einen Wert von 4,3 %.

Die Genauigkeit der Methode ist also unabhängig von der Größe des Proteins, da sich für BSA und Lysozym vergleichbare Lysozym vergleichbare Abweichungen ergeben. Die Abweichungen der 48-stündigen Hydrolyse sind durch die nicht durch die nicht korrigierbaren Unrichtigkeiten zu erklären. Sie liegen in allen drei Proben über 20 % für die für die Proteinkonzentration ermittelt aus der Lysinkonzentration (siehe

Tabelle 7.8-8, im Anhang). Auffällig sind auch die nicht korrigierten Unrichtigkeiten von Alanin bei HL2 und von Asparaginsäure bei HL3. Trotz der Überschreitung der 30 % Grenze wurde sich gegen eine Korrektur entschieden. Die Abweichungen von Lysin sind so gravierend, dass der Mittelwert stark beeinflusst wurde. Nach der Entfernung der Lysinwerte steigt der Mittelwert an und die genannten Aminosäuren unterschreiten damit die gesetzte Grenze. Daher wurden diese Werte nicht entfernt. HL1 bis HL3 zeigen eine deutliche Abweichung der Aminosäure Lysin. Diese Abweichungen können weder einer schlechten Kalibrierung, noch einer Peakveränderung zugeordnet werden.

Tabelle 5.1-2 Vergleich der Proteinkonzentrationen. Für jede Hydrolyseprobe sind bis zu vier verschiedene Proteinkonzentrationen aufgezeigt. In der zweiten Spalte befinden sich die Proteinkonzentrationen, die mittels Aminosäureanalytik gewonnen wurden. Die dritte Spalte gibt Werte für die Proteinkonzentration an, die um Unrichtigkeiten der einzelnen Aminosäuren von über 30 %, bezogen auf den Mittelwert, bereinigt sind. In der darauffolgenden Spalte, sind die Ergebnisse des Bradford-Assays zu sehen. Die vorletzte Spalte zeigt die Konzentration der Proteinlösung nach Einwaage. (n.v. = nicht vorgenommen; n.n. = nicht nötig; üN = über Nacht; KS = Kühlschrank)

Hydrolyse- probe	Proteinkonzentrationen				Hinweis
	AS- Analytik [g/L]	AS-Analytik, Unrichtigkeit > 30 % entfernt [g/L]	Bradford- Assay [g/L]	nach Einwaage [g/L]	
H1	0,390	n.v.	-	0,410	ohne int. Std.
H2	0,431	0,403	0,471	0,400	üN im KS
H2	0,434	n.n.	0,471	0,400	üN nicht im KS
H2	0,454	n.v.	0,471	0,400	alte K. üN KS
H2	0,460	n.v.	0,471	0,400	alte K. üN nicht KS
H3	0,486	n.n.	0,471	0,400	üN im KS
H3	0,471	0,440	0,471	0,400	üN nicht im KS
H3	0,516	n.v.	0,471	0,400	alte K. üN KS
H3	0,503	n.v.	0,471	0,400	alte K. üN nicht KS
H4 24 h	0,379	0,352	0,431	0,398	ohne int. Std.
H5 24 h	0,369	0,343	0,431	0,398	ohne int. Std.
H6 24 h	0,335	0,307	0,431	0,398	ohne int. Std.
H7 48 h	0,388	0,355	0,431	0,398	ohne int. Std.
H8 48 h	0,369	0,336	0,431	0,398	ohne int. Std.
H9 48 h	0,481	0,440	0,431	0,398	ohne int. Std.
H10 24 h	0,405	n.n.	0,447	0,405	
H11 24 h	0,389	n.n.	0,447	0,405	
H12 24 h	0,392	n.n.	0,447	0,405	
H13 48 h	0,440	0,402	0,447	0,405	
H14 48 h	0,451	0,406	0,447	0,405	
H15 48 h	0,450	0,405	0,447	0,405	
HL1 24 h	0,744	0,803	0,897	0,801	
HL2 24 h	0,705	0,766	0,897	0,801	
HL3 24 h	0,748	0,815	0,897	0,801	
HL4 48 h	0,768	n.n.	0,897	0,801	
HL5 48 h	0,761	n.n.	0,897	0,801	
HL6 48 h	0,770	n.n.	0,897	0,801	

Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurde jeweils nach der Messung der Proben H4, H5, H6 und H7, H8, H9 nochmals der 3 mg/L Standard vermessen. Dieser Standard befand sich bis zum Zeitpunkt seiner Messung ca. 10 h ungekühlt im Autosampler. Die größte Abweichung bei H4, H5 und H6 ergibt sich bei der Glutaminsäure mit 13,66 % (Tabelle 5.1-3). Innerhalb der Werte ist kein genereller Abbau der Aminosäuren aufgrund der Standzeit zu erkennen. Vielmehr Schwanken auch

hier die Werte, ähnlich den Proteinkonzentrationen, derivatisierungsbedingt. Dies ist ein Indiz für die Robustheit der entwickelten Methode. Bei H7, H8 und H9 liegen die Abweichungen durchschnittlich bei 17,67 %, mit einer maximalen Abweichung von 36,00 % bei Alanin. Diese Ergebnisse sprechen gegen die geforderte Robustheit. Ob diese hohen Abweichungen Einzelfälle sind, kann mit Hilfe der ermittelten Daten nicht geklärt werden.

Tabelle 5.1-3 Überprüfung der Robustheit. Um die Methode auf Robustheit zu testen wurde bei nach den Messungen für die Proben H4, H5, H6 und H7, H8, H9 nochmals der 3 mg/L Mischstandard in Doppelbestimmung vermessen. In der zweiten und vierten Spalte befinden sich jeweils die Mittelwerte der Aminosäurekonzentrationen. Mit diesen Werten wird die Abweichung vom Sollwert berechnet. Bei der Kalibrierung von H7, H8 und H9 wurde kein interner Standard mitgeführt.

Aminosäuren	Aminosäurekonz. bei H4/5/6 [mg/L]	Abweichung bei H4/5/6 [%]	Aminosäurekonz. bei H7/8/9 [mg/L]	Abweichung bei H7/8/9 [%]
Asp	3,02	0,67	3,59	19,67
Glu	2,89	3,67	3,68	22,67
Ala	3,41	13,67	4,08	36,00
AABA	2,91	3,00	-	-
Phe	3,19	6,33	3,40	13,33
Leu	3,10	3,33	3,40	13,33
Lys	3,10	3,33	3,03	1,00
Mittelwert	3,05	1,67	3,53	17,67
Sollwert	3,00	Sollwert	3,00	

Werden die Chromatogramme der beiden 3 mg/L Messungen der Serie H4/5/6 verglichen, kann eine deutliche Abnahme der Peakflächen und -höhen im unterem Chromatogramm festgestellt werden (Abbildung 5.1-4). Die Aminosäurekonzentrationen der obigen Tabelle sind, wie bereits erwähnt, Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurde das Chromatogramm mit den niedrigeren Werten gewählt, weil auch hier der Wert für Alanin zu hoch ist, obwohl der Peak kleiner ausfällt. Die Begründung dafür ist in der Kalibrierung zu finden. Der 15 mg/L Standard fiel bei allen Aminosäuren zu niedrig aus. Dadurch wurde die Kalibriergerade abgeflacht und kleinere Peakflächen erhalten so eine höhere Konzentration. Dies ist auch bei Alanin der Fall, auch wenn die Kalibrierung nicht signifikant stärker abgeflacht ist als z.B. bei Glutaminsäure (Abbildung 5.1-5). Die Probenserie H7/8/9 verhält sich ähnlich. Die Peakhöhen und -flächen des Standards sind ebenfalls geringer bei der abschließenden Messung. Werden aber deutlich zu hoch ausgewertet, da hier der 9 mg/L und der 20 mg/L Standard zu niedrig ausfallen. Basierend auf den vorliegenden Daten ist daher kein Rückschluss auf die Robustheit der Methode möglich.

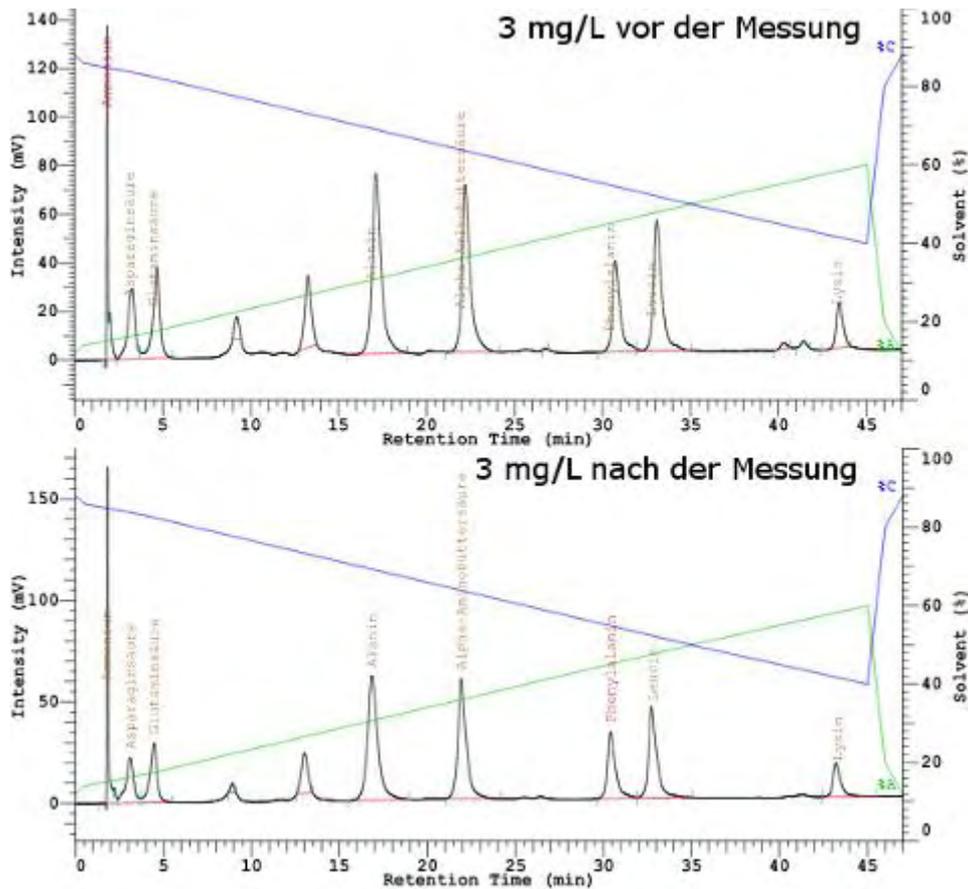


Abbildung 5.1-4 Vergleich 3 mg/L Standard vor und nach der Messung. Im oberen Bild ist das Chromatogramm des 3 mg/L Standards bei der Kalibrierung zu sehen. Im unteren Bild wurde zum Vergleich ein Chromatogramm desselben Standards nach der Messung dargestellt. Hier sind deutlich kleiner Peaks und Peakflächen erkennbar. Die Peakformen sind gleich geblieben.

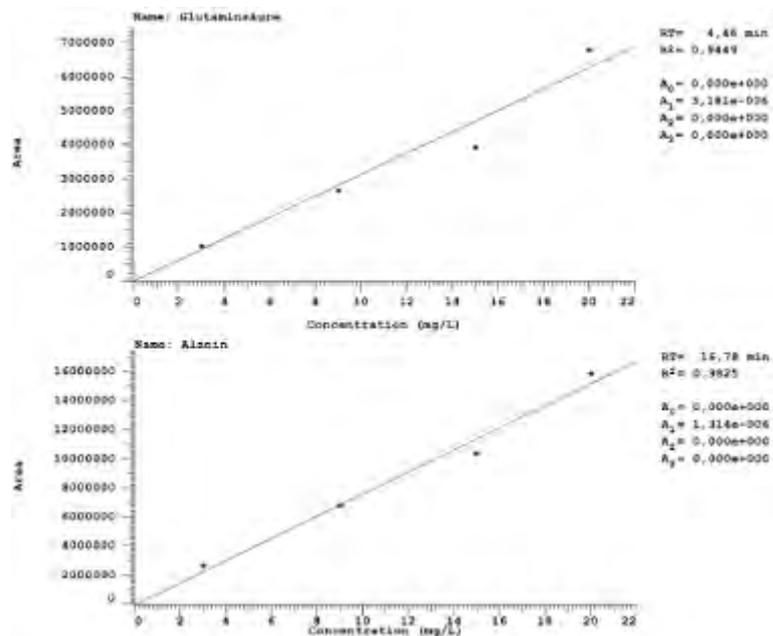


Abbildung 5.1-5 Vergleich der Kalibriergeraden von Glutaminsäure und Alanin für die Messungen von H4/5/6. Der 15 mg/L Standard fällt im Vergleich mit den anderen Standards zu niedrig aus. Dies ist auch bei den nicht gezeigten Kalibrierungen der anderen Aminosäuren der Fall.

Mit den erhobenen Daten können die folgenden Aussagen getroffen werden. Eine 48 h Hydrolyse brachte keine signifikante Verbesserung der Ergebnisse im Vergleich zu einer 24 h Hydrolyse. Die Derivatisierung hat einen großen Einfluss auf die Kalibrierung. Das kann zu einer Beeinflussung von Standards führen, die nach den Proben zur Überprüfung der Robustheit vermessen werden. Sie sind nicht wie die Proben um Abweichungen des internen Standards korrigierbar. Die Aminosäurekonzentrationen schwanken in beide Richtungen um den Mittelwert. Daher ist eine Korrektur mittels AABA nicht sinnvoll. Außerdem wurde AABA bei der Kalibrierung für H7/8/9 nicht mit geführt, da die Probe den internen Standard nicht enthielt. Aufgrund dessen ist keine Bestimmung der Robustheit möglich gewesen. Die Genauigkeit der Methode ist unabhängig von der Gestalt des Proteins. Beide Testproteine brachten mit dem Bradford-Assay vergleichbare Ergebnisse hervor. Tendenziell liegen die Ergebnisse der Aminosäureanalytik unterhalb der Sollkonzentration, während die Ergebnisse des Bradford-Assays darüber liegen.

5.2 Empfehlungen

In diesem Kapitel sollen Empfehlungen gegeben werden, um die Methode in Zukunft zu verbessern. Begonnen wird mit der Problematik der korrigierten Proteinkonzentrationen. Ist eine 30 % Grenze bei der Unrichtigkeit der durch die Aminosäurekonzentrationen ermittelten Proteinkonzentrationen sinnvoll? Die Antwort darauf kann nur eine ausführliche Validierung der Methode erbringen. Mit den ermittelten Daten war dies nicht möglich. Im Zuge einer Validierung sollten auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Aminosäuren konkret festgelegt werden. Außerdem sollte weiterhin getestet werden, welche Hydrolysezeit geeigneter ist: 24 h oder 48 h. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluss zu. Sollten sich dies bestätigen, wäre die Hydrolyse über 24 h vorzuziehen. An dieser Stelle soll auch auf die Möglichkeit hingewiesen werden, die Hydrolysemethode gänzlich zu wechseln. Sollte zukünftig mit einem höherem Probenaufkommen zu rechnen sein, wäre zu einem Mikrowellenaufschluss zu raten. Damit könnten Proben innerhalb eines Tages analysiert werden. Um die Analysezeit weiter einzuschränken ohne die Hydrolysemethode zu ändern, gilt es auszutesten, ob eine Zweipunktkalibrierung verlässliche Ergebnisse erbringen könnte. Da die Messungen der Standards den Schwankungen der Derivatisierung unterlegen sind, ist eine exakte Kalibrierung vermutlich nicht zu erreichen. Daher wäre eine zeitoptimierte Kalibrierung eine sinnvolle Alternative. An dieser Stelle soll auch auf die nicht exakte Trennung von Alanin aufmerksam gemacht werden. Diese gilt es zukünftig zu verbessern. Außerdem haben die Ergebnisse dieser Methodenentwicklung gezeigt, dass mehrere Proben aus einer Proteinlösung hydrolysiert werden sollten. Die aus den Mittelwerten der Dreifachbestimmung errechneten Proteinkonzentrationen, zeigen eine höhere Genauigkeit. Weiterhin sollte auch die Doppelbestimmung der Proben in der chromatografischen Methode beibehalten werden. Auch dadurch werden die Ergebnisse um

Schwankungen bei der Derivatisierung bereinigt. Die Messungen der Kalibrierung und der Proben sollten auch weiterhin mit einer Messung des 3 mg/L Standards abgeschlossen werden, um genauere Aussagen über die Robustheit der Messung treffen zu können. Abschließend soll noch einmal betont werden, dass eine Validierung der Methode dringend erforderlich ist, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass die Methode nutzbares Potential aufweist. Daher sollte auch weiterhin Aufwand investiert werden, um sie gänzlich fertigzustellen und zu validieren. Zusätzlich wird empfohlen die Methode mit realen Proben von aufgereinigten Proteinen zu testen. Nur so kann entschieden werden, ob die entwickelte Methode generell in der Lage ist, diese zu quantifizieren.

6 Quellenverzeichnis

6.1 Literaturquellenverzeichnis

Anders, J. C.: *Advances in Amino Acid Analysis*. BioPharm. S. 32-39 & S. 67, April 2002.

Carl Roth GmbH Co. KG: *Gebrauchsanweisung. Roti®-Quant*. Karlsruhe, 2008.

Canfield: *The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme*. J. Biol. Chem. Ausgabe 238, Nr. 8 S. 2698-2707, 1963.

Christen, P.; Jaussi, R.: *Biochemie*. Berlin: Springer-Verlag, 1. Auflage, 2005.

Concha-Herrera, V.; Torres-Lapasió, J. R.; Vivó-Truyols, G.; García-Álvarez-Coque, M. C.: *A comparative study of the performance of acetonitrile and methanol in the multi-linear gradient separation of proteic primary amino acids*. Analytica Chimica Acta. Ausgabe 582, S. 250-258, 2007.

Fa. CEM, Antwort vom 21.01.2014 auf die schriftlich gestellte Anfrage.

Fountoulakis, M.; Lahm, H.: *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. J. Chromatogr. A, Ausgabe 826, S. 109-134, 1998.

Gey, M. H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2. Auflage, 2008.

Grombach, P; Haberer, K.; Merkl, G.; Trüeb, E. U.: *Handbuch der Wasserversorgungstechnik*. München; Wien: Oldenbourg-Industrieverlag, 3. Auflage, 2000.

Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K.: *Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS*. Biochem Biophys Res Commun. Ausgabe 173, S. 639-646, 1990.

Hirs, C. H. W.; Stein, W. H.; Moore, S.: *The amino acid composition of ribonuclease*. J. Biol. Chem. Ausgabe 211, S. 941-950, 1954.

Kromidas, S.: *Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage, 2011.

Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 10. Auflage, 2009.

Merck KGaA: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. Darmstadt, 1996.

Merck KGaA: *ChromBook. Your guide to a fascinating world of chromatography*. Darmstadt, 2011.

Moore, S.; Stein W. H.: *Photometric Ninhydrin Method For Use In The Chromatography Of Amino Acids*. J. Biol. Chem. 1948, Ausgabe 176, S. 367-388, 1948.

Moore, S.; Stein, W. H.: *Chromatographic Determination of Amino Acids by the Use of Automatic Recording Equipment*. Methods in Enzymology, Ausgabe 6, S. 819-831, 1963.

Nelson, D. L.; Cox, M. M.: *Lehninger Biochemie*. Berlin: Springer-Verlag, 4. Auflage, 2009.

Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 7. Auflage, 2008.

Lösche, K.: *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie*. Hamburg: B. Behr's Verlag, 2000.

Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.): *Bioanalytik*. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum, 3. Auflage, 2012.

Sigma Aldrich: *Product Information, Phthaldialdehyde Reagent, Complete Solution*. Abgerufen am 04.02.2014 von: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/p0532dat.pdf>

Tswett, M.: *Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls*. Ber. Deutsch. Bot. Ges., Ausgabe 24, S. 384-393, 1906.

Wang, L.; Xu, R.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Tu, Y.; Zeng, X.: *Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction*. Food Chemistry, Ausgabe 123, S. 1259-1266, 2010.

Weiss, M.; Manneberg, M.; Juranville, J.; Lahm, H.; Fountoulakis, M.: *Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins*. J. Chromatogr. A, Ausgabe 795, S. 263-275, 1998.

6.2 Abbildungsquellenverzeichnis

Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 7. Auflage, S. 14, S. 27, S. 28, 2008.

Lundblad R. L.; Macdonald, F. M. (Hrsg.): *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 4. Auflage, S.765, 2010.

Canfield: *The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme*. J. Biol. Chem. Ausgabe 238, Nr. 8, S. 2706, 1963.

Merck KGaA: *Application Note. HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA*. Darmstadt, S. 18, 1996.

Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 10. Auflage, S. 97, S. 167, 2009.

Otto, M.: *Analytische Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 4. Auflage, S. 406, 2011.

7 Anhang

7.1 Berechnung Proteinkonzentration H1

Tabelle 7.1-1 Auswertung der ersten Proteineinwaage. 1 mL der Proteinlösung wurde im Vial mit 1 mL der 12 molaren Salzsäure versehen. Nach der Hydrolyse wurde daraus 1 mL entnommen und mit 12 molarer Natriumhydroxidlösung neutralisiert, sodass sich ein Endvolumen von 1,8 mL ergab.

Einwaage Protein in 10 mL [g]	Säurezugabe [mL]	Volumen Proteinlg. [mL]	Endvolumen nach Neutralisation [mL]	Protein-konzentration [g/L]
0,0041	1	1	1,8	0,114

7.2 Ansatz 12 molarer Natronlauge

$$M(\text{NaOH}) = 39,997 \text{ g/mol}$$

$$m(\text{NaOH}) = M(\text{NaOH}) \cdot n(\text{NaOH})$$

$$m(\text{NaOH}) = 39,997 \text{ g/mol} \cdot 12 \text{ mol}$$

$$m(\text{NaOH}) = 479,964 \text{ g in 1 L Reinstwasser}$$

$$47,9964 \text{ g/100mL}$$

$$\text{Ist-Einwaage: } 48,072 \text{ g/100mL} \rightarrow 12,019 \text{ mol/L}$$

7.3 Berechnung Molarität 37 %iger Salzsäure

$$\rho(\text{HCl, 37 \%}) = 1.109 \text{ g/L, } M(\text{HCl}) = 36,45 \text{ g/mol}$$

$$\beta(\text{HCl, 100 \%}) = \rho(\text{HCl, 37 \%}) \cdot 0,37 = 1.109 \text{ g/L} \cdot 0,37$$

$$\beta(\text{HCl, 100 \%}) = 440,3 \text{ g/L}$$

$$c(\text{HCl, 37 \%}) = 440,3 \text{ g/L} : 36,45 \text{ g/mol}$$

$$c(\text{HCl, 37 \%}) = 12,08 \text{ mol/L}$$

7.4 Chromatogramme

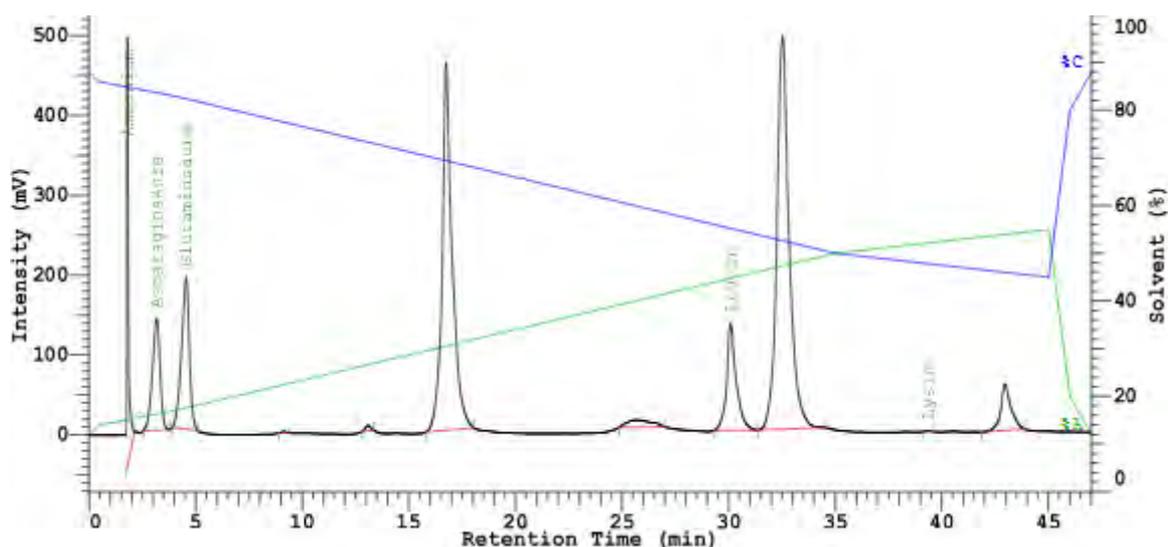


Abbildung 7.4-1 Versuch der Auftrennung von Leucin und Norleucin. Durch den verlängerten Gradienten sind die Retentionszeiten verändert worden und die Peaks werden nicht richtig zugeordnet. Im Folgenden die korrekte Peakreihenfolge: Asp, Glu, Ala, Phe, Leu, Lys. Bei dem als Leucin bezeichneten Peak handelt es sich um Phenylalanin. Eine Trennung von Norleucin und Leucin ist nicht ersichtlich.

7.5 Einwaagen für Stammlösungen der Aminosäurestandards

Tabelle 7.5-1 Einwaagen der Aminosäure-Stammlösungen. Jede Stammlösung ist mit Herstellungsdatum und Einwaage verzeichnet. Die Einwaagen wurden mit zwei unterschiedlichen Waagen durchgeführt: mit vier bzw. fünf Stellen Präzision. Die beiden Stammlösungen mit unbekannter Einwaage waren vorhanden und die Einwaage nicht notiert. Die ausgegrauten unteren Einwaagen gehören zu Aminosäuren, die nicht in der finalen Methode verwendet wurden.

Standard	Einwaage Soll [g/100 mL]	Einwaage Ist [g/100 mL]	Herstellungsdatum
Asparaginsäure	0,1	unbekannt	29.07.2013
Asparaginsäure	0,1	0,09999	25.09.2013
Glutaminsäure	0,1	unbekannt	29.07.2013
Glutaminsäure	0,1	0,1001	03.09.2013
Alanin	0,1	0,1006	13.08.2013
Alanin	0,1	0,1002	03.09.2013
α -Aminobuttersäure	0,1	0,1000	18.09.2013
Phenylalanin	0,1	0,1003	13.08.2013
Phenylalanin	0,1	0,0999	03.09.2013
Leucin	0,1	0,1000	06.08.2013
Leucin	0,1	0,10000	14.11.2013
Lysin	0,1	0,0999	06.08.2013
Lysin	0,1	0,10001	14.11.2013
Norleucin	0,1	0,1003	03.09.2013
Norleucin	0,1	0,1002	10.09.2013
Serin	0,1	0,0999	06.08.2013
Threonin	0,1	0,0999	06.08.2013

7.6 Pipettenprüfung

Tabelle 7.6-1 Pipettenprüfung. Die Pipette V8 wurde bei 100 μ L, 500 μ L und 1000 μ L auf Präzision und Richtigkeit geprüft. Dazu wurde fünfmal das jeweilige Volumen pipettiert und dokumentiert. Die Präzision bzw. der Variationskoeffizient bildet sich aus der Standardabweichung durch den Mittelwert mal 100. Die Richtigkeit bzw. die Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert und somit die Unrichtigkeit wurde als Betrag der Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert bezogen auf den Sollwert mal 100 errechnet.

Sollwert [μ L]	geprüfte Pipette: V8		
	100	500	1000
Pipettiertes Volumen	100,4	499,5	1007,3
	101,8	503,1	1004,5
	99,8	501,9	1002,9
	100,6	503	1000,6
	101,1	502,3	1001,9
Mittelwert	100,74	501,96	1003,44
Standardabweichung	0,754	1,462	2,586
Präzision [%]	0,748	0,291	0,258
Richtigkeit [%]	0,740	0,392	0,344

7.7 Einwaagen Natriumacetatpuffer

Tabelle 7.7-1 Einwaagen Natriumacetat. In dieser Tabelle sind alle Einwaagen zur Herstellung des Natriumacetatpuffers zu finden.

Herstelldatum	Einwaagen Natriumacetat [g]	Sollwert der Einwaage [g]
06.08.2013	4,103	4,102
13.08.2013	8,203	8,203
19.08.2013	8,202	8,203
26.08.2013	4,102	4,102
03.09.2013	4,103	4,102
09.09.2013	8,200	8,203
18.09.2013	8,206	8,203
23.09.2013	8,205	8,203
25.09.2013	8,205	8,203
30.09.2013	8,207	8,203
08.10.2013	8,204	8,203
12.11.2013	4,100	4,102
02.12.2013	4,102	4,102
09.12.2013	8,203	8,203

7.8 Daten der Proteinquantifizierung

7.8.1 Proteineinwaagen

Tabelle 7.8-1 Proteineinwaagen. In dieser Tabelle befinden sich die zu den Hydrolyseproben gehörenden Proteineinwaagen. Aus einer Proteinlösung von 10 mL wurden ab H4 jeweils sechs Proben vermessen. Drei davon nach 24 h Hydrolysezeit und weitere drei nach 48 h.

Hydrolyse	Proteineinwaagen [g/10mL]
H1	0,0041
H2 und3	0,0040
H4 bis H9	0,00398
H10 bis H15	0,00405
HL1 bis HL6	0,00801

7.8.2 Auswertung von H2 und H3

Tabelle 7.8-2 Auswertung von H2 und H3. In den folgenden Tabellenabschnitten sind die Aminosäure- und Proteinkonzentrationen der Probe H2 und H3 aufgeführt. Für jede Probe liegen mehrere Auswertungen vor. Zum einen wird die Lagerung bei Raumtemperatur und im Kühlschrank unterschieden, zum anderen die Auswertung mittels alter und neuer Kalibrierung. Bei den Proteinkonzentrationen wird nicht nur die Verdünnung berücksichtigt, sondern auch die Konzentration des internen Standards. Dazu wird das Verhältnis von AABA zum Sollwert von 20 mg/L gebildet. Dieser Faktor fließt in das Ergebnis ein.

Messtag	Probe	AS	AS-Konz. alte Kal. [mg/L]	AS-Konz. frische Kal. [mg/L]	Protein-konz. alte K. [g/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
20.09. 13	H2 KS	Asp	11,00	10,19	0,102	0,094	0,094	19,65
		Glu	27,39	22,93	0,157	0,131	0,131	11,77
		Ala	8,19	7,20	0,133	0,117	0,117	0,48
		Phe	6,78	6,76	0,101	0,101	0,101	14,11
		Leu	14,12	12,69	0,117	0,105	0,105	10,17
		Lys	16,99	20,19	0,131	0,156	-	32,63
	AABA	24,35	21,75	0,123	0,117	0,110	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert:				1,09	0,494	0,469	0,439	Verdg. berück.
					0,454	0,431	0,403	iStd berück.

Messtag	Probe	AS	AS Konz. alte Kal. [mg/L]	AS Konz. frische Kal. [mg/L]	Protein-konz. alte K. [g/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
20.09. 13	H2 üN bei RT	Asp	13,18	12,21	0,122	0,113	-	8,14
		Glu	22,10	18,50	0,126	0,106	-	1,29
		Ala	7,62	6,69	0,123	0,108	-	3,89
		Phe	5,85	5,83	0,087	0,087	-	16,79
		Leu	13,04	11,72	0,108	0,097	-	6,77
		Lys	12,57	14,94	0,097	0,115	-	10,24
	AABA	21,55	19,25	0,111	0,104	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert:				0,96	0,443	0,418	Verdg. berück.	
					0,460	0,434	iStd berück.	

Messtag	Probe	AS	AS Konz. alte Kal. [mg/L]	AS Konz. frische Kal. [mg/L]	Protein-konz. alte K. [g/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
20.09. 13	H3 KS	Asp	17,88	16,58	0,165	0,153	-	11,52
		Glu	27,90	23,35	0,160	0,134	-	2,86
		Ala	12,12	10,65	0,197	0,173	-	25,61
		Phe	7,06	7,03	0,105	0,105	-	23,73
		Leu	14,80	13,30	0,123	0,110	-	19,61
		Lys	16,37	19,46	0,126	0,150	-	9,07
	AABA	25,33	22,63	0,146	0,137	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert:				1,13	0,584	0,550	Verdg. berück.	
					0,516	0,486	iStd berück.	

Messtag	Probe	AS	AS Konz. alte Kal. [mg/L]	AS Konz. frische Kal. [mg/L]	Protein-konz. alte K. [g/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
20.09. 13	H3 üN bei RT	Asp	15,96	14,79	0,148	0,137	0,137	12,30
		Glu	25,21	21,10	0,144	0,121	0,121	0,98
		Ala	11,38	10,00	0,185	0,162	-	33,11
		Phe	6,31	6,29	0,094	0,094	0,094	23,01
		Leu	13,42	12,06	0,112	0,100	0,100	17,75
		Lys	12,82	15,23	0,099	0,117	0,117	3,68
	AABA	23,18	20,70	0,130	0,122	0,114	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert:				1,04	0,520	0,487	0,455	Verdg. berück.
					0,503	0,471	0,440	iStd berück.

7.8.3 Auswertung von H4 bis H6

Tabelle 7.8-3 Auswertung von H4 bis H6. Bei diesen Proben wurde kein interner Standard mitgeführt. Dadurch konnten die Ergebnisse nicht um die Abweichungen des internen Standards korrigiert werden.

Messtag	Probe	AS	Aminosäure-konz. Mittelwert [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
25.09.2013	H4	Asp	12,61	0,117	0,117	22,95
		Glu	17,08	0,098	0,098	3,01
		Ala	7,95	0,129	-	36,06
		Phe	4,75	0,071	0,071	25,39
		Leu	8,85	0,074	0,074	22,46
		Lys	10,56	0,081	0,081	14,17
		Mittelwert:		0,095	0,088	
	Verdg. berück.:		0,379	0,352		

Messtag	Probe	AS	Aminosäure-konz. Mittelwert [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
25.09.2013	H5	Asp	12,14	0,112	0,112	21,63
		Glu	16,20	0,093	0,093	0,38
		Ala	7,69	0,125	-	35,22
		Phe	4,84	0,072	0,072	21,80
		Leu	8,71	0,072	0,072	21,56
		Lys	10,31	0,079	0,079	13,87
		Mittelwert:		0,092	0,086	
	Verdg. berück.:		0,369	0,343		

Messtag	Probe	AS	Aminosäure-konz. Mittelwert [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
25.09.2013	H6	Asp	10,23	0,095	0,095	12,80
		Glu	14,29	0,082	0,082	2,51
		Ala	7,34	0,119	-	41,93
		Phe	4,36	0,065	0,065	22,53
		Leu	8,51	0,071	0,071	15,67
		Lys	9,35	0,072	0,072	14,03
		Mittelwert:		0,084	0,077	
	Verdg. berück.:		0,335	0,307		

7.8.4 Auswertung H7 bis H9

Tabelle 7.8-4 Auswertung von H7 bis H9. Bei diesen Proben wurde kein interner Standard mitgeführt. Dadurch konnten die Ergebnisse nicht um die Abweichungen des internen Standards korrigiert werden.

Messtag	Probe	AS	Aminosäure-konz. Mittelwert [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
26.09.2013	H7	Asp	11,71	0,108	0,108	11,70
		Glu	17,16	0,098	0,098	1,24
		Ala	8,52	0,138	-	42,53
		Phe	4,98	0,074	0,074	23,44
		Leu	10,00	0,083	0,083	14,25
		Lys	10,34	0,080	0,080	17,77
			Mittelwert:	0,097	0,089	
			Verdg. berück.:	0,388	0,355	

Messtag	Probe	AS	Aminosäure-konz. Mittelwert [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
26.09.2013	H8	Asp	10,48	0,097	0,097	5,20
		Glu	16,44	0,094	0,094	2,06
		Ala	8,16	0,132	-	43,59
		Phe	4,86	0,072	0,072	21,43
		Leu	9,66	0,080	0,080	12,93
		Lys	9,98	0,077	0,077	16,49
			Mittelwert:	0,092	0,084	
			Verdg. berück.:	0,369	0,336	

Messtag	Probe	AS	Aminosäure-konz. Mittelwert [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
26.09.2013	H9	Asp	14,34	0,133	0,133	10,37
		Glu	21,09	0,121	0,121	0,35
		Ala	10,51	0,170	-	41,85
		Phe	6,28	0,094	0,094	22,06
		Leu	12,58	0,104	0,104	13,03
		Lys	12,87	0,099	0,099	17,49
			Mittelwert:	0,120	0,110	
			Verdg. berück.:	0,481	0,440	

7.8.5 Auswertung H10 bis H12

Tabelle 7.8-5 Auswertung von H10 bis H12. Bei diesen Proben wurde der interne Standard mitgeführt. Die Ergebnisse mussten nicht um Unrichtigkeiten korrigiert werden.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
08.10.2013	H10	Asp	14,44	0,134	-	16,00
		Glu	23,57	0,135	-	17,10
		Ala	6,59	0,107	-	7,16
		Phe	6,76	0,101	-	12,47
		Leu	13,05	0,108	-	5,85
		Lys	13,80	0,106	-	7,62
	AABA	22,71	0,115	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert			1,14	0,460	Verdg. berück.	
				0,405	iStd berück.	

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
08.10.2013	H11	Asp	12,07	0,112	-	14,74
		Glu	20,53	0,117	-	20,66
		Ala	5,93	0,096	-	1,08
		Phe	5,70	0,085	-	12,74
		Leu	11,19	0,093	-	4,47
		Lys	10,47	0,081	-	17,10
	AABA	20,00	0,097	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert			1,00	0,389	Verdg. berück.	
				0,389	iStd berück.	

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
08.10.2013	H12	Asp	13,96	0,129	-	20,42
		Glu	23,15	0,132	-	23,47
		Ala	6,52	0,106	-	1,32
		Phe	5,97	0,089	-	17,02
		Leu	11,42	0,095	-	11,54
		Lys	11,96	0,092	-	14,01
	AABA	21,85	0,107	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert			1,09	0,429	Verdg. berück.	
				0,392	iStd berück.	

7.8.6 Auswertung H13 bis H15

Tabelle 7.8-6 Auswertung von H13 bis H15. Bei diesen Proben wurde der interne Standard mitgeführt. Die Ergebnisse wurden um Unrichtigkeiten korrigiert.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
09.10.2013	H13	Asp	16,60	0,154	-	44,22
		Glu	22,20	0,127	0,127	19,28
		Ala	6,79	0,110	0,110	3,42
		Phe	5,33	0,079	0,079	25,39
		Leu	10,33	0,086	0,086	19,40
		Lys	10,76	0,083	0,083	22,11
	AABA	19,33	0,106	0,097	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,97	0,426	0,388	Verdg. berück.
				0,44	0,40	iStd berück.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
09.10.2013	H14	Asp	17,23	0,159	-	49,78
		Glu	22,57	0,129	0,129	21,34
		Ala	6,61	0,107	0,107	0,77
		Phe	5,29	0,079	0,079	25,83
		Leu	10,13	0,084	0,084	20,88
		Lys	10,32	0,080	0,080	25,19
	AABA	18,85	0,106	0,096	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,94	0,425	0,383	Verdg. berück.
				0,45	0,41	iStd berück.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
09.10.2013	H15	Asp	17,15	0,159	-	50,32
		Glu	22,17	0,127	0,127	20,13
		Ala	6,60	0,107	0,107	1,41
		Phe	5,25	0,078	0,078	25,82
		Leu	10,02	0,083	0,083	21,15
		Lys	10,28	0,079	0,079	24,90
	AABA	18,74	0,106	0,095	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,94	0,422	0,380	Verdg. berück.
				0,45	0,41	iStd berück.

7.8.7 Auswertung HL1 bis HL3

Tabelle 7.8-7 Auswertung von HL1 bis HL3. Dies sind die Ergebnisse der Lysozym-Hydrolyse. Der interne Standard wurde mitgeführt und die Ergebnisse um Unrichtigkeiten korrigiert.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
10.12.2013	HL1	Asp	43,52	0,223	0,223	27,76
		Glu	9,96	0,194	0,194	11,10
		Ala	15,91	0,213	0,213	22,08
		Phe	5,42	0,156	0,156	10,32
		Leu	11,43	0,156	0,156	10,63
		Lys	6,42	0,105	-	39,98
	AABA	18,76	0,174	0,188	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,94	0,697	0,753	Verdgl. berück.
				0,744	0,803	iStd berück.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
10.12.2013	HL2	Asp	30,61	0,157	0,157	17,68
		Glu	7,05	0,137	0,137	3,03
		Ala	12,96	0,173	0,173	30,32
		Phe	4,48	0,129	0,129	2,82
		Leu	9,26	0,126	0,126	5,21
		Lys	4,65	0,076	-	43,00
	AABA	15,11	0,133	0,145	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,76	0,532	0,578	Verdgl. berück.
				0,705	0,766	iStd berück.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Protein-konz. [g/L]	Protein-konz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
10.12.2013	HL3	Asp	38,92	0,199	0,199	30,82
		Glu	8,42	0,164	0,164	7,59
		Ala	13,92	0,186	0,186	22,34
		Phe	4,92	0,142	0,142	6,70
		Leu	10,10	0,138	0,138	9,57
		Lys	5,18	0,085	-	44,48
	AABA	16,28	0,152	0,166	Mittelwert	
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,81	0,609	0,663	Verdgl. berück.
				0,748	0,815	iStd berück.

7.8.8 Auswertung von HL4 bis HL6

Tabelle 7.8-8 Auswertung von HL4 bis HL6. Dies sind die Ergebnisse der Lysozym-Hydrolyse. Der interne Standard wurde mitgeführt und Ergebnisse mussten nicht um Unrichtigkeiten korrigiert werden.

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
11.12.2013	HL4	Asp	39,72	0,203	-	17,90
		Glu	9,50	0,185	-	7,18
		Ala	14,61	0,195	-	13,37
		Phe	5,45	0,157	-	8,70
		Leu	12,15	0,166	-	3,92
		Lys	7,84	0,128	-	25,83
	AABA	17,95	0,172	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,90	0,690	Verdg. berück.	
				0,77	iStd berück.	

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
11.12.2013	HL5	Asp	31,35	0,160	-	17,53
		Glu	7,41	0,144	-	5,60
		Ala	11,75	0,157	-	15,11
		Phe	4,29	0,124	-	9,22
		Leu	9,80	0,134	-	2,11
		Lys	6,12	0,100	-	26,91
	AABA	14,35	0,137	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,72	0,546	Verdg. berück.	
				0,76	iStd berück.	

Messtag	Probe	AS	Aminosäurekonz. [mg/L]	Proteinkonz. [g/L]	Proteinkonz. korrigiert [g/L]	Unrichtigkeit [%]
11.12.2013	HL6	Asp	37,17	0,190	-	21,09
		Glu	8,63	0,168	-	6,84
		Ala	12,72	0,170	-	8,37
		Phe	4,90	0,141	-	10,06
		Leu	10,94	0,149	-	5,06
		Lys	7,59	0,124	-	21,18
	AABA	16,32	0,157	Mittelwert		
Verhältnis von AABA & Sollwert			0,82	0,629	Verdg. berück.	
				0,77	iStd berück.	