

**Isoprostane und 3-Nitrotyrosin als neue  
Indexparameter des oxidativen Stresses in vivo:  
Analytik, Bildung, Metabolismus  
und biologische Bedeutung**

vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation von  
Dipl.-Chem. Edzard Schwedhelm  
geboren am 06.07.1971 in Gehrden

Hannover 2000

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. med. Jürgen C. Frölich

Tag der Promotion: 14. Dezember 2000

## Kurzfassung

Die Isoprostane entstehen durch die von freien Radikalen katalysierte Endocyclisierung der Arachidonsäure in Lipiden in Analogie zu der durch die Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase katalysierten Bildung der Prostaglandine aus freier Arachidonsäure. Von den Prostaglandinen unterscheiden sich die Isoprostane durch ihre Regio- und Stereochemie. Es sind vier Regioisomere mit jeweils 64 Stereoisomeren möglich. Unter den Isoprostanen nehmen 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> und 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub> eine Sonderstellung ein, da sie eine über den Thromboxan-Rezeptor vermittelte biologische Aktivität aufweisen. Auch wurde die enzymatische Bildung dieser beiden Isoprostane als Nebenprodukt der Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase nachgewiesen. Im Gegensatz zu 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> unterliegt 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub> jedoch der Epimerisierung zu Prostaglandin E<sub>2</sub>. Nachdem der Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> in der Zellkultur von Schweinehepatozyten untersucht worden war, wurden sowohl für 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> als auch für seinen Hauptmetaboliten, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>, auf der Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie basierende analytische Methoden zu ihrer Quantifizierung in menschlichem Urin entwickelt. Die Methoden setzten die Synthese eines geeigneten internen Standards voraus und wurden in der entsprechenden Matrix validiert. Sie wurden in verschiedenen *in vivo*-Studien eingesetzt und haben gezeigt, dass sich diese Isoprostane als Indexparameter einer *in vivo*-Lipidperoxidation ausgezeichnet eignen.

3-Nitrotyrosin entsteht durch die Oxidation und Nitrierung der Aminosäure Tyrosin. Neben der reaktiven Sauerstoffspezies HOCl werden insbesondere die reaktiven Stickstoffspezies Nitrylchlorid (NOCl<sub>2</sub>), Stickstoffmonoxid und -dioxid sowie Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) für die Bildung von 3-Nitrotyrosin in biologischen Systemen verantwortlich gemacht. Sowohl für die freie Aminosäure Tyrosin als auch für Tyrosin-Reste in Albumin konnte gezeigt werden, dass der Beitrag von Peroxynitrit unter physiologischen Bedingungen zur 3-Nitrotyrosin-Bildung nur sehr gering ist. Als Hauptmetabolit von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen wurde 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure in Abhängigkeit von den 3-Nitrotyrosin-Plasmaspiegeln mit einer Halbwertszeit von 175 min (3-Nitrotyrosin) in den Urin ausgeschieden. Trotz der langen Halbwertszeit lag die mit der in dieser Arbeit entwickelten, auf Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie basierenden und validierten analytischen Methode gemessene mittlere Blutplasma-Konzentration von 3-Nitrotyrosin lediglich bei 1,15 ± 0,71 nM; bei einem Verhältnis von 1,48 ± 0,65 × 10<sup>-6</sup> von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten in den Plasmaproteinen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich 3-Nitrotyrosin als Indexparameter des oxidativen Stresses nur in äußerst geringen Konzentrationen in der humanen Zirkulation findet und seine Bedeutung in diesem Kompartiment bisher überschätzt wurde.

**Schlagworte:** Isoprostane, 3-Nitrotyrosin, oxidativer Stress

## Summary

Prostaglandins are formed by prostaglandin H<sub>2</sub>-synthase from free arachidonic acid. In analogy, isoprostanes are formed by a free-radical catalyzed mechanism from arachidonic acid esterified to lipids. The isoprostanes differ from their enzymatic analogues to their regio- and stereochemistry. Four regioisomers and 64 stereoisomers are known. Among the isoprostanes, 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> and 8-iso-prostaglandin E<sub>2</sub> are prominent due to their thromboxane receptor-mediated biological activity. Additionally, their enzymatic formation catalyzed by prostaglandin H<sub>2</sub>-synthase as a minor product is known. Unlike 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub>, 8-iso-prostaglandin E<sub>2</sub> is not stable in aqueous buffer and rearranges to form its epimer prostaglandin E<sub>2</sub>. Therefore, only the metabolism of 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> was studied. Two analytical methods have been developed for 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> and its major urinary metabolite, 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> using gas chromatography-tandem mass spectrometry. For both methods suitable internal standards were synthesized. Both methods were fully validated. They were used in several *in vivo* experiments and both isoprostanes have shown their usefulness as indices of *in vivo* lipid peroxidation.

3-Nitrotyrosin is a product of tyrosine oxidation and nitration. Apart from reactive oxygen species, e.g. HOCl, 3-nitrotyrosine is commonly derived from reactive nitrogen species like nitryl chloride (NOCl<sub>2</sub>), nitric monoxide, nitric dioxide or peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). It was found out that the contribution of small, i.e. physiological concentrations of peroxynitrite to the formation of 3-nitrotyrosine is rather small. This was explored for free tyrosine and serum albumin. 3-Nitrotyrosin is degraded to 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid in the rabbit with a half-life period of 175 min and excreted into the urine. An analytical method for the quantitative determination of 3-nitrotyrosin in human plasma was developed and fully validated. Despite the long half-life of 3-nitrotyrosine in blood plasma, only 1.15 ±0.17 nM of 3-nitrotyrosine were found in the blood of healthy human volunteers. The ratio of 3-nitrotyrosin to tyrosin residues in serum proteins was determined to be 1.48 ±0.65 ×10<sup>-6</sup>. These data prove that 3-nitrotyrosine can only be found in very small amounts in the human circulation. Therefore, its suitability as a marker of oxidative stress in this compartment may be limited and was overestimated in the past.

**Keywords:** isoprostanes, 3-nitrotyrosine, oxidative stress

Die vorliegende Arbeit entstand von August 1997 bis September 2000 in Zusammenarbeit des Instituts für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Direktor Prof. Dr. med. Jürgen C. Frölich, mit dem Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper, bei denen ich mich für die gebotenen Arbeitsbedingungen und ihre Betreuung bedanken möchte. Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen C. Frölich für die Übernahme des Korreferats und die von ihm gewährte finanzielle Unterstützung am Ende meiner experimentellen Arbeiten danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dimitrios Tsikas, der diese Arbeit mit seiner kritischen, kreativen und hilfsbereiten Art umfassend und kontinuierlich betreute.

Bei Herrn Frank-M. Gutzki möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der GC-MS- und GC-tandem-MS-Analysen bedanken. Des weitern möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit danken. Mein Dank gilt insbesondere Frau Christine Tünemann für die Messungen an isolierten menschlichen arteriellen Blutgefäßen.

Für die Isolation von Schweinehepatozyten danke ich PD Dr. Augustinus Bader vom LBAO-Forschungszentrum des Oststadtkrankenhauses in Hannover.

Für eine Spende von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *ent*-2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> danke ich Dr. Thierry Durand von der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Montpellier, Frankreich.

Für die Kooperation bei der Untersuchung des Metabolismus von 3-Nitrotyrosin danke ich Prof. Dr. Eberhard Bassenge vom Institut für Angewandte Physiologie an der Universität Freiburg.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums in jeglicher Form unterstützt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Stipendium zur Förderung der Promotion (Graduiertenförderung) des Landes Niedersachsen finanziert.



# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einführung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Oxidativer Stress .....  | 1         |
| 1.2      | Isoprostane .....  | 6         |
| 1.2.1    | F <sub>2</sub> -Isoprostane .....  | 11        |
| 1.2.2    | 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> , E <sub>2</sub> -Isoprostane und 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub> ..... | 13        |
| 1.3      | Analytik von Isoprostanen.....   | 16        |
| 1.3.1    | F <sub>2</sub> -Isoprostane .....  | 17        |
| 1.3.2    | 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> .....  | 18        |
| 1.4      | 3-Nitrotyrosin .....   | 19        |
| 1.4.1    | 3-Nitrotyrosin als Aminosäure in Proteinen.....  | 24        |
| 1.4.2    | 3-Nitrotyrosin als freie Aminosäure .....  | 26        |
| 1.5      | Analytik von 3-Nitrotyrosin .....  | 27        |
| <b>2</b> | <b>Zielsetzung .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3</b> | <b>Methoden.....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1      | Festphasenextraktion (SPE).....  | 32        |
| 3.1.1    | Festphasenextraktion von Prostaglandinen und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-<br>essigsäure.....                       | 32        |
| 3.1.2    | Festphasenextraktion von 3-Nitrotyrosin .....  | 32        |
| 3.2      | Derivatisierungsprozeduren.....  | 32        |
| 3.2.1    | Veresterung mit Pentafluorobenzylbromid (PFB-Bromid).....  | 32        |
| 3.2.2    | Veresterung mit 4-Fluorobenzylester (4FB-Bromid).....  | 33        |
| 3.2.3    | Veresterung mit Diazomethan.....   | 33        |
| 3.2.4    | Methoximierung mit <i>O</i> -Methylhydroxylamin Hydrochlorid (MOX) .....                                       | 33        |
| 3.2.5    | Methoximierung mit <i>O</i> -2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylhydroxylamin<br>Hydrochlorid (PFBOX).....              | 33        |
| 3.2.6    | Veretherung mit <i>N, O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) .....                                | 34        |
| 3.2.7    | Veresterung mit propanolischer HCl.....  | 34        |
| 3.2.8    | Amidierung mit Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFPA) .....  | 34        |
| 3.3      | Dünnschichtchromatographie (TLC).....  | 34        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.3.1 | TLC-System für Prostaglandine als freie Säuren.....  | 34 |
| 3.3.2 | TLC-System für Prostaglandine und 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure<br>als PFB-Ester ..... | 35 |
| 3.4   | High-performance liquid chromatography (HPLC).....   | 35 |
| 3.4.1 | HPLC-System für Prostaglandine als freie Säuren.....                                       | 35 |
| 3.4.2 | HPLC-System für Prostaglandine als PFB-Ester.....  | 36 |
| 3.4.3 | HPLC-System für underivatisierte Aminosäuren.....  | 36 |
| 3.5   | Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS).....  | 37 |
| 3.5.1 | GC-MS-System für derivatisierte Prostaglandine.....  | 37 |
| 3.5.2 | GC-MS-System für derivatisierte phenolische Säuren.....                                    | 37 |

## **4 Ergebnisse ..... 39**

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.1     | Isoprostane.....  | 39 |
| 4.1.1   | 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ .....   | 40 |
| 4.1.1.1 | Analytische Methode.....  | 40 |
| 4.1.1.2 | Interner Standard .....   | 42 |
| 4.1.1.3 | NICI-Massenspektren.....  | 46 |
| 4.1.1.4 | Validierung der quantitativen Methode.....  | 49 |
| 4.1.1.5 | Variation der 24-Stunden-Ausscheidung .....   | 56 |
| 4.1.1.6 | Zellweger-Syndrom.....  | 57 |
| 4.1.2   | Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in der Zellkultur von<br>Schweinehepatozyten.....                                | 58 |
| 4.1.2.1 | Strukturaufklärung des Metaboliten von 8-iso- $[^3H]$ Prostaglandin $F_{2\alpha}$<br>in der Zellkultur von Schweinehepatozyten..... | 63 |
| 4.1.3   | 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ .....   | 67 |
| 4.1.3.1 | Analytische Methode.....  | 67 |
| 4.1.3.2 | Synthese von <i>ent</i> -2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ .....  | 68 |
| 4.1.3.3 | Interner Standard .....   | 69 |
| 4.1.3.4 | NICI-Massenspektren.....  | 72 |
| 4.1.3.5 | Validierung der quantitativen Methode.....  | 72 |
| 4.1.3.6 | Vergleich der Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-<br>Prostaglandin $F_{2\alpha}$ mit GC-MS und GC-Tandem-MS .....           | 80 |
| 4.1.3.7 | Simultane Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-<br>Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ .....    | 81 |



|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.1.4   | 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub> .....  | 83  |
| 4.1.4.1 | NICI-Massenspektren.....  | 84  |
| 4.1.4.2 | Gaschromatographische Trennung von 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub><br>und Prostaglandin E <sub>2</sub> .....                                   | 86  |
| 4.1.4.3 | Dünnschichtchromatographische Trennung von 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub><br>und Prostaglandin E <sub>2</sub> .....                           | 90  |
| 4.1.4.4 | Chemische Umwandlung von 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub> in Prostaglandin E <sub>2</sub> ..  | 91  |
| 4.1.5   | Bildung von Isoprostanen durch die PGH <sub>2</sub> -Synthase.....  | 92  |
| 4.1.6   | Effekt der Inhibierung der Prostaglandin H <sub>2</sub> -Synthase auf die<br>physiologische Bildung von 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> ..... | 95  |
| 4.1.7   | Isoprostane als Mediatoren des oxidativen Stresses: Organbad-Versuche .....   | 96  |
| 4.2     | 3-Nitrotyrosin .....  | 98  |
| 4.2.1   | 3-Nitrotyrosin als freie Aminosäure .....   | 99  |
| 4.2.1.1 | Analytische Methode .....   | 99  |
| 4.2.1.2 | Interner Standard .....   | 100 |
| 4.2.1.3 | NICI-Massenspektren.....  | 104 |
| 4.2.1.4 | Validierung der quantitativen Methode .....   | 106 |
| 4.2.1.5 | Vergleich der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mit GC-MS und<br>GC-Tandem-MS .....   | 115 |
| 4.2.1.6 | In vitro-Bildung von 3-Nitrotyrosin durch Peroxynitrit .....  | 116 |
| 4.2.2   | 3-Nitrotyrosin-Reste in Proteinen.....  | 117 |
| 4.2.2.1 | Analytische Methode .....   | 118 |
| 4.2.2.2 | In vitro-Nitrierung von bovine serum albumin (BSA) durch Peroxynitrit .   | 119 |
| 4.2.2.3 | Validierung der Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten<br>in Proteinen.....   | 120 |
| 4.2.2.4 | Vergleich der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen mit<br>GC-MS und GC-Tandem-MS .....   | 122 |
| 4.2.3   | 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure .....  | 123 |
| 4.2.3.1 | Interner Standard .....   | 123 |
| 4.2.3.2 | NICI-Massenspektren.....  | 127 |
| 4.2.4   | Metabolismus von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen.....   | 129 |

## **5 Diskussion.....134**

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 5.1   | Methodenentwicklung und Anwendung.....      | 134 |
| 5.1.1 | GC-Tandem-MS-Analytik von Isoprostanen..... | 135 |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 5.1.2    | GC-Tandem-MS-Analytik von 3-Nitrotyrosin.....  | 140        |
| 5.2      | Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> und 3-Nitrotyrosin .....  | 144        |
| 5.2.1    | Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> in der Zellkultur<br>von Schweinehepatozyten.....                                 | 144        |
| 5.2.2    | Korrelation zwischen 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> und seinem Metaboliten in<br>menschlichem Urin.....                           | 145        |
| 5.2.3    | Metabolismus von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen.....  | 146        |
| 5.3      | Biologische Bedeutung der Isoprostane und von 3-Nitrotyrosin .....   | 147        |
| 5.3.1    | Biologische Aktivität und enzymatische Bildung von<br>8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> und 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub> ..... | 147        |
| 5.3.2    | Peroxynitrit und 3-Nitrotyrosin .....  | 149        |
| 5.4      | Schlussfolgerungen.....  | 150        |
| 5.4.1    | Isoprostane .....  | 150        |
| 5.4.2    | Bedeutung der Isoprostane als BOSS ( <i>biomarker of oxidative stress status</i> )   | 151        |
| 5.4.3    | 3-Nitrotyrosin .....   | 152        |
| 5.4.4    | Bedeutung von 3-Nitrotyrosin als BOSS .....  | 153        |
| 5.5      | Ausblick.....  | 154        |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>156</b> |
| <b>7</b> | <b>Anhang .....</b>  | <b>189</b> |

---

# 1 Einführung

## 1.1 Oxidativer Stress [1]

Die Beziehung zwischen Sauerstoff und dem aeroben Leben ist von ambivalentem Charakter. Molekularer Sauerstoff nimmt die bei der Oxidation von Biomolekülen zur Energiegewinnung entstehenden Elektronen auf und wird unter Aufnahme von vier Elektronen zu Wasser reduziert. Diese überaus nützliche Eigenschaft des molekularen Sauerstoffs kann auch von Nachteil sein. Die in den Mitochondrien kontrolliert ablaufende, von der Cytochrom-*c*-Oxidase katalysierte, Vier-Elektronen-Reduktion des molekularen Sauerstoffs ist nicht immer vollständig. Nicht nur das Radikal Sauerstoff, sondern auch die bei der unvollständigen Reduktion des molekularen Sauerstoffs entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) oxidieren viele Biomoleküle und richten so großen Schaden an [2,3]. Als Verursacher des oxidativen Schadens werden neben den ROS auch die reaktiven Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) ausgemacht [4]. Der aerobe Organismus hat daher Schutzmechanismen gegen die unkontrollierte Oxidation von Biomolekülen, den oxidativen Stress, entwickelt. Neben dem reduktiven Potential der Zelle, vor allem durch Glutathion (GSH) aufrechterhalten, sind es die Antioxidantien, die die reaktiven Spezies abfangen [5,6]. Kommt es dennoch zur Oxidation von Biomolekülen, so trifft der Schaden alle drei großen Klassen von Biomolekülen: Zucker, Lipide und Proteine [7].

Das insbesondere von Barry Halliwell und William A. Pryor in die wissenschaftliche Öffentlichkeit getragene Biomarker-Konzept sucht gezielt aus jeder dieser Gruppen von Biomolekülen exemplarische Vertreter heraus, die als stabile Endprodukte der destruktiven Veränderungen ausgemacht werden können [8,9]. Damit werden zwei Möglichkeiten eröffnet: (1) Die Vorhersagbarkeit eintretender oder bereits eingetretener pathologischer Veränderungen im Organismus und (2) Aussagen über die Wirksamkeit von Gegenmaßnahmen [5,7-9]. Als stabile Endprodukte und damit Biomarker des Status des oxidativen Stress (*biomarker of oxidative stress status*, BOSS) [9] sollten diejenigen Moleküle gewählt werden, die einer Analytik möglichst leicht, d. h. nicht-invasiv zugänglich sind.

## ROS und RNS

Bei der Ein-Elektron-Reduktion von molekularem Sauerstoff bilden sich sukzessiv die ROS Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot -}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $HO^{\cdot}$ ) (zusammen mit dem Hydroxid-Anion ( $HO^-$ )). Bei der weiteren Reduktion des Sauerstoffs entsteht Wasser. Neben dem Hydroxyl-Radikal sind auch Superoxid-Anion, atomarer Sauerstoff und molekularer Sauerstoff im Grundzustand Radikale. Das Superoxid-Anion steht mit der korrespondierenden Säure, dem Perhydroxyl-Radikal, im Gleichgewicht ( $O_2^{\cdot -} + H^+ \rightleftharpoons HO_2^{\cdot}$ ,  $pK_a = 4,8$  [2]). Zwei Enzyme stehen dem Organismus zum Abbau der Produkte der unvollständigen Oxidation von Sauerstoff zur Verfügung: die Superoxid-Dismutase (SOD, *EC 1.15.1.1*) und die Katalase (*EC 1.11.1.16*). Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Oxidation eines Superoxid-Anions zu molekularem Sauerstoff und die Reduktion eines zweiten Superoxid-Anions zu Wasserstoffperoxid. Eine weitergehende Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser wird von der Katalase katalysiert. Daneben ist auch die durch  $Fe^{3+}$  katalysierte Reduktion von Wasserstoffperoxid zu  $HO^{\cdot}$  und  $HO^-$  möglich (Fenton-Reaktion [10]). Abb. 1 zeigt mögliche Reaktionen des Superoxid-Anions nach W. H. Koppenol [11].

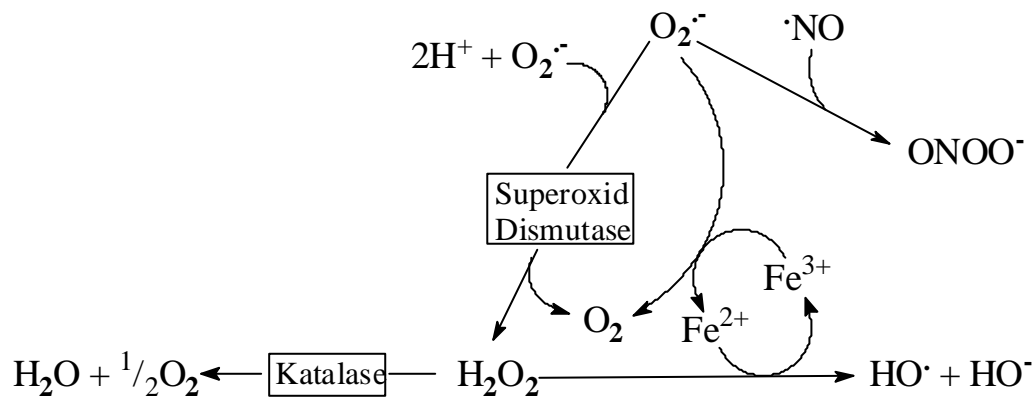


Abb. 1. Mögliche Reaktionen des Metabolismus des Superoxid-Anions ( $O_2^{\cdot -}$ ) [11].

Weitere nicht-radikalische ROS sind Ozon, Singulett-Sauerstoff ( $^1\Delta_g$ -Zustand) und die Hypochlorige Säure. Eine Möglichkeit zur Detektion von ROS bieten in der Elektronen-Resonanzspektroskopie (ESR) eingesetzte *spin traps* [12,13].

Zu den RNS zählen die Oxide des Stickstoffs, Stickstoffmonoxid ( $\cdot NO$ ) und Stickstoffdioxid ( $\cdot NO_2$ ). Wird Stickstoffmonoxid reduziert oder oxidiert, so entstehen die nicht-radikalischen Ionen Nitroxyl-Anion ( $NO^-$ ) und Nitrosyl-Kation (Nitrosonium-Ion,  $NO^+$ ) [14]. Während das

---

Nitroxyl-Anion und insbesondere das reaktive Nitrosyl-Kation nicht in freier Form in biologischen Systemen vorzufinden sind, können Verbindungen wie *S*-Nitrosothiole diese Ionen übertragen [15]. Reagiert das Nitroxyl-Anion mit molekularem Sauerstoff, so entsteht Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) ( $k = 5,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  [16]). Eine weitere wichtige Quelle für Peroxynitrit ist die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit dem Superoxid-Anion ( $k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  [17]). Das Peroxynitrit-Anion steht mit der Peroxosalpetrigen Säure ( $\text{ONOOH}$ ) im Gleichgewicht ( $\text{pK}_a = 6,8$  [18]). Die Reaktion von Peroxynitrit mit Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) führt zum Teil zur Erhöhung der Reaktivität des Peroxynitrits. Auf einen Vorschlag von Uppu *et al.* zurückgehend [19], soll im Folgenden mit Peroxynitrit die Summe aus  $\text{ONOO}^-$  und  $\text{ONOOH}$  definiert sein. Desgleichen soll mit Bicarbonat die Summe aus  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  definiert sein.

Über Entstehung, Schaden und Nutzen, den der Organismus aus reaktiven Sauerstoffspezies zieht, siehe M. T. Moslen [20]. Eine Bewertung der biologischen Bedeutung von reaktiven Stickstoffspezies findet sich bei R. P. Patel *et al.* [21].

### **Stickstoffmonoxid**

Die Entdeckung, dass Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS, *EC 1.14.13.39*) gebildet wird, und seine Identifizierung als relaxierender Faktor aus Endothelzellen (*endothelium-derived relaxing factor*, EDRF), eröffneten ein neues Forschungsgebiet [22,23]. 1998 wurde der Nobel-Preis für Medizin an drei beteiligte Wissenschaftler verliehen [24,25,26]. Stickstoffmonoxid vermittelt jedoch nicht nur die Relaxation des Gefäßes, sondern ist als Radikal auch an pathophysiologischen Prozessen wie der Lipid-Peroxidation beteiligt. Stickstoffmonoxid kann sowohl die Lipid-Peroxidation initiieren als auch die Radikal-Kettenreaktion terminieren [27]. Als "dunkle Seite" von Stickstoffmonoxid werden jedoch diejenigen Reaktionen betrachtet, die zur Bildung weitaus reaktiverer RNS als Stickstoffmonoxid selbst führen, so z.B. die Bildung von Peroxynitrit aus Superoxid-Anion und Stickstoffmonoxid [28]. In welchem Ausmaß und unter welchen Umständen die NOS selbst zur Bildung von Superoxid-Anionen beiträgt, ist umstritten [29]. Neben der Bildung von Superoxid-Anionen wurde auch die Bildung von  $\text{NO}^-$  durch die NOS postuliert [30].

## Peroxynitrit

Die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit dem Superoxid-Anion zu Peroxynitrit ist mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  nahezu diffusionskontrolliert [17]. Die Reaktion kann durchaus mit dem durch die Superoxid-Dismutase katalysierten Abbau von Superoxid-Anionen konkurrieren ( $k = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  [31]). Das gebildete Peroxynitrit nitriert Proteine, oxidiert und nitriert Aminosäuren, DNA und Lipide und wird somit für pathologische Veränderungen verantwortlich gemacht [32,33]. Doch bleibt die biologische Bedeutung von Peroxynitrit nicht unumstritten [34]. Die Ausbeute der Nitrierung von Proteinen mit Peroxynitrit ist gering. Das Peroxynitrit-Anion ( $\text{ONOO}^-$ ) ist im Alkalischen relativ stabil, die Peroxosalpetrige Säure ( $\text{HOONO}$ ) ist instabil und isomerisiert mit einer Halbwertszeit von 0,8 sec bei pH 7 und  $37^\circ\text{C}$  zu Nitrat [18]. Von der Stabilität des Anions wird bei der Synthese von Peroxynitrit im Labor Gebrauch gemacht [35]. Für die Oxidation durch Peroxynitrit werden zwei Mechanismen diskutiert: (1) der  $\text{HOONO}^*$ -Mechanismus und (2) der "Käfig"-Mechanismus [36]. Der  $\text{HOONO}^*$ -Mechanismus geht von einer angeregten Form des Peroxynitrits als reaktivem Zwischenprodukt aus. Der "Käfig"-Mechanismus postuliert die homolytische Spaltung von  $\text{HOONO}$  zum Hydroxyl-Radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) und Stickstoffdioxid ( $\cdot\text{NO}_2$ ) in einem Lösemittelkäfig.

## Peroxynitrit und $\text{CO}_2$

Das Peroxynitrit-Anion ( $\text{ONOO}^-$ ), die bei physiologischem pH-Wert dominierende deprotonierte Form der Peroxosalpetrigen Säure, reagiert mit  $\text{CO}_2$  ( $k = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  [37]). Als intermediäres Produkt wurde Nitrosoperoxocarbonat ( $[\text{ONOOCO}_2]^-$ ) vorgeschlagen [38]. Die Anwesenheit von  $\text{CO}_2$  hat entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute der Nitrierung von Tyrosin. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktion wird die Bildung von Nitrosoperoxocarbonat angesehen [38]. Der Zerfall von Nitrosoperoxocarbonat verläuft über einen "Käfig"-Mechanismus, bei dem Stickstoffdioxid und das Carbonat-Radikalanion gebildet werden ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) [39-41]. Lösemittel haben Einfluss auf die Viskosität des Käfigs und somit auf die Zerfallsreaktion [39]. Spektroskopische Untersuchungen sprechen ebenfalls für die Anwesenheit von Radikalen beim Zerfall von Nitrosoperoxocarbonat und bei der Reaktion von Peroxynitrit mit Tyrosin in der Gegenwart von  $\text{CO}_2$  [40,41]. Mechanistisch könnte das Carbonat-Radikalanion für die Bildung des Tyrosyl-Radikals ( $\text{Tyr-O}^\cdot$ ) und Stickstoffdioxid für die anschließende Nitrierung verantwortlich sein [42].

---

## Antioxidantien

Seit über zwei Jahrzehnten wird der Beitrag von oxidativem Stress zu chronischen Krankheiten wie Arteriosklerose und Herzerkrankungen, Mutation und Krebs, neurologischen Erkrankungen und dem Alterungsprozess diskutiert [43,44,45]. Neben Enzymen wie der Superoxid-Dismutase und Katalase sind es die kleinen molekularen Antioxidantien wie GSH, Ascorbinsäure (Vitamin C) und die Tocopherole (hauptsächlich  $\alpha$ -Tocopherol, Vitamin E), die den Organismus vor Schäden bewahren [46]. Entscheidend ist die richtige Balance zwischen den Oxidantien und den Antioxidantien. So zeigt ein Antioxidans immer auch prooxidative Eigenschaften [47,48]. Die einzelnen Antioxidantien unterscheiden sich in ihrer Verteilung in verschiedenen Kompartimenten aufgrund ihrer Lipophilie. Das lipidlösliche  $\alpha$ -Tocopherol verringert u. a. die Nitrierung durch Peroxynitrit [49]. Peroxynitrit verringert auch den Plasma-Pool an  $\alpha$ -Tocopherol und anderen Antioxidantien [50]. Eine Möglichkeit, die antioxidative Kapazität von biologischen Geweben und Medien zu bestimmen, liegt in der Anwendung der Zyklovoltammetrie [51].

## Veränderungen an Biomolekülen

Modifikationen der DNA und RNA durch ROS und RNS werden für die Entwicklung von Krebs mitverantwortlich gemacht. Es entstehen eine Reihe von Oxidationsprodukten, darunter Nitrierungs- und Hydroxylierungsprodukte, der Nukleinsäuren. Die gebräuchlichste Methode, den entstandenen Schaden abzuschätzen, ist die Quantifizierung von 8-Hydroxyguanin (8-OHG) oder 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) in menschlichem Urin [52].

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) werden leicht von freien Radikalen angegriffen. Es erfolgt die Abstraktion von allylischem Wasserstoff an geeigneter Methylengruppe, wenn das entstehende Radikal mit den Doppelbindungen in Resonanz treten kann (Dienyl-Radikal). Der Initiation folgt die Peroxidation durch Anlagerung von molekularem Sauerstoff und Umlagerung der Doppelbindungen. Die gebildeten Peroxide sind gleichzeitig Initiatoren weiterer Radikal-Kettenreaktionen (Kettenfortpflanzung). Die entstehenden Hydroperoxide, Peroxy- und Alkoxy-Radikale unterliegen der Umlagerung, Fragmentierung (**b**-Spaltung) und Cyclisierung. Die Eigenschaften einiger Zwischen- und Endprodukte der Lipid-Peroxidation erlauben ihre Erfassung mit geeigneten Methoden [53,54,55]. Konjugierte Diene absorbieren bei 235 nm [54], kurzkettige Alkane sind in der ausgeatmeten Luft detektierbar [56].

---

Malondialdehyd und andere mit der Thiobarbitursäure reagierende Aldehyde (TBARS) werden mit dem TBA-Test gemessen [57,58]. Die bei der Cyclisierung von Arachidonsäure entstehenden Isoprostane können als spezifischer Index für die Lipid-Peroxidation herangezogen werden (siehe 1.2).

Unter den ROS und RNS tragen die radikalischen Moleküle zur Lipid-Peroxidation bei. Für die ROS sind dies insbesondere das Hydroxyl-Radikal und Substanzen, die Hydroxyl-Radikale bilden können [59]. Für die RNS tragen Stickstoffmonoxid und -dioxid zur Lipid-Peroxidation bei [27]. Die beiden Gase haben eine etwa 10-fach höhere Löslichkeit in den hydrophoben Bereichen der Lipid-Membran als im Cytosol. Als mäßig reaktives Radikal hat  $\cdot$ NO auch die Eigenschaft die Lipid-Peroxidation zu terminieren [27].

ROS und RNS können auf unterschiedliche Art mit Proteinen reagieren. Der Angriff kann auf das Rückrad der Polypeptidkette gerichtet sein und zur Fragmentierung der Proteine führen [60]. Der Angriff kann auch auf die Seitenketten der Aminosäuren erfolgen [61]. Unterschiedliche Aminosäuren bilden dabei unterschiedliche Oxidationsprodukte. Die Oxidation und Nitrosylierung von Cystein (und Methionin)-Resten führt zur Bildung von Disulfiden, Sulf-oxiden und *S*-Nitrososubstanzen [62,63]. Die Oxidation und Nitrierung von Tyrosin-Resten führt zur Bildung von Dityrosin, 3,4-Dihydroxyphenylalanin (3,4-DOPA) und 3-Nitrotyrosin (siehe 1.4).

## 1.2 Isoprostane

*Entdeckung der Isoprostane.* Die Isoprostane sind Regio- und Stereoisomere der Prostaglandine, zu deren Entdeckung und Charakterisierung Sune Bergström und Bengt Samuelsson entscheidend beigetragen haben (Nobelpreis für Medizin 1982 zusammen mit Sir John Vane [64,65]). Grundlage der Forschung war die 1964 gemachte Beobachtung, dass die Inkubation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit verschiedenen Gewebehomogenaten zur Bildung von Prostaglandinen führte [66,67]. 1968 gelang die Isolation eines Isomers von PGE<sub>1</sub> aus eben diesen *in vitro*-Inkubationen: 8-iso-PGE<sub>1</sub> [68]. Schon ein Jahr zuvor zeigten Versuche zur Autooxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, dass neben geringen Mengen an Prostaglandinen eine Reihe weiterer Regio- und Stereoisomere gebildet werden [69]. Erst neun Jahre später gab die Wiederholung der Autooxidations-Versuche Anlass zu der Speku-



lation, Isoprostane auch *in vivo* vorzufinden: "Thus, it is possible that some of the complex symptoms of lipid peroxidation *in vivo* could be due to nonenzymatically produced prostaglandins or their stereoisomers." [70]. P. L. Taylor konnte im Jahr 1979 tatsächlich die Existenz von mehreren Isoprostanen in menschlicher Samenflüssigkeit nachweisen [71]. Taylor führte die Bildung der Isoprostane jedoch auf die Isomerisierung von Prostaglandinen zurück. Ein Zufall kam 1990 Jason D. Morrow und L. Jackson Roberts zu Hilfe, die Hypothese der nichtenzymatischen Bildung der Isoprostane *in vivo* zu beweisen. Bei der quantitativen Bestimmung von  $9\alpha,11\beta$ -PGF<sub>2</sub>, eines Metaboliten von PGD<sub>2</sub> in menschlichem Blutplasma, machten sie die Beobachtung, dass bei nochmaligem Messen der Proben die Konzentration von  $9\alpha,11\beta$ -PGF<sub>2</sub> etwa 50-fach über der zuvor gemessenen lag [72,73]. Zunächst unbeabsichtigt hatten sie weitere Isomere des PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  mitbestimmt. Sie konnten zeigen, dass die Isoprostane nicht nur bei unsachgemäßer Probenlagerung *ex vivo* entstehen, sondern auch *in vivo* als Folge einer durch freie Radikale katalysierten Lipid-Peroxidation gebildet werden [74]. Die nicht von der Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase (PGH<sub>2</sub>-Synthase, Cyclooxygenase, *EC 1.14.99.1*) abhängige Radikalreaktion gibt so Aufschluss über das Ausmaß der *in vivo*-Lipid-Peroxidation (Übersichtsartikel [75,76,77,78]).

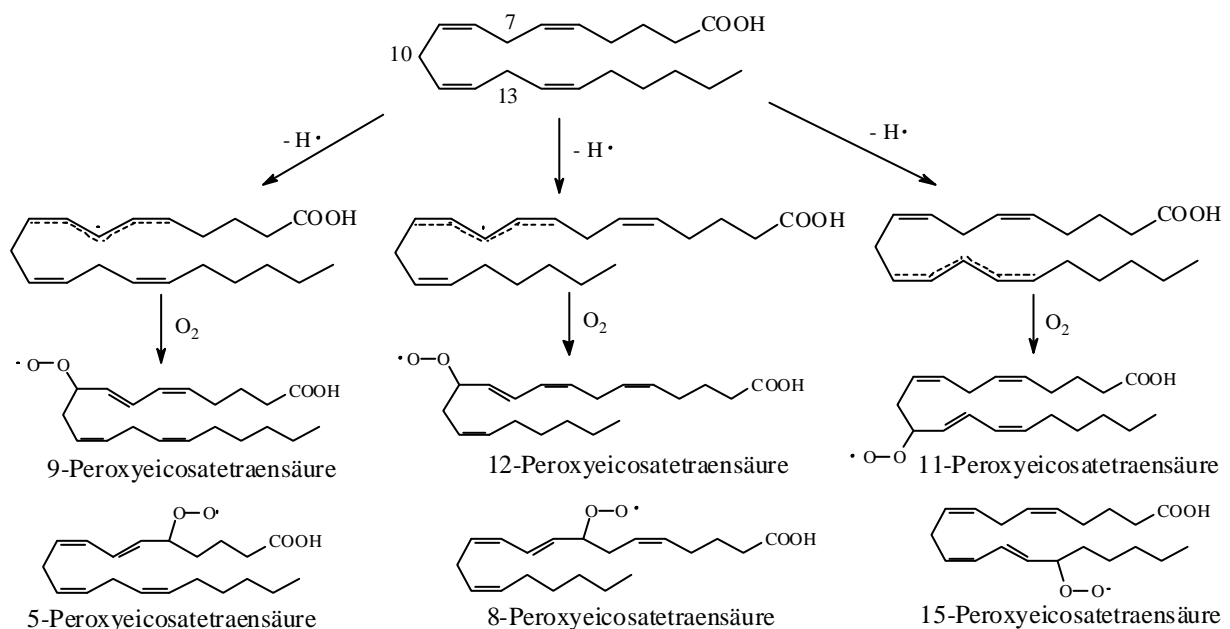


Abb. 2. Mechanismus der radikalischen Peroxidation von Arachidonsäure.

*Mechanismus der Bildung der Isoprostane.* Der erste Schritt der Bildung der Isoprostane ist die Abstraktion eines H-Radikals von der Arachidonsäure durch freie Radikale (Abb. 2).



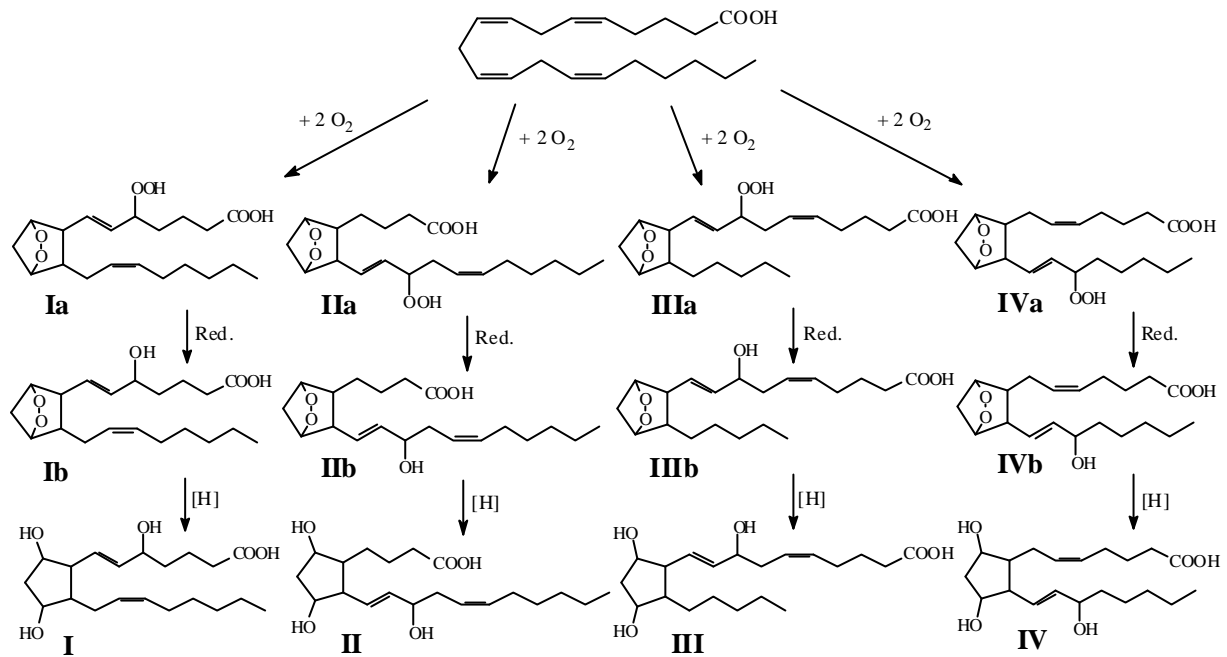


Abb. 4. Bildung von vier möglichen Regioisomeren (**I** – **IV**) bei der Peroxidation von Arachidonsäure ([82] als Modell für die Biosynthese von Prostaglandinen).

Ein Unterschied zwischen der enzymatischen Bildung und der Bildung durch freie Radikale liegt jedoch in der Stereochemie der entstandenen Verbindungen **IV**, **IVa** und **IVb**. Das Enzym katalysiert lediglich die Bildung des (8*R*,9*S*,11*R*,12*S*,15*S*)-Isomers der Verbindungen **IV**, **IVa** und **IVb** [83,84,85]. Die bei der enzymatischen Katalyse entstehenden Produkte heißen  $PGG_2$  (Stereoisomer von **IVa**) und  $PGH_2$  (Stereoisomer von **IVb**) [80]. Durch Reduktion kann aus  $PGH_2$  das entsprechende Stereoisomer von **IV**,  $PGF_{2\alpha}$ , gebildet werden. Jedes der vier Regioisomere, die bei der durch freie Radikale katalysierten Reaktion gebildet werden können, ist ein Gemisch von theoretisch acht racemischen Diastereomeren. Die Regio- und Stereoisomeren der Triole **I** - **IV** werden als  $F_2$ -Isoprostane bezeichnet [74]. Einzelne Stereoisomere können bei der Bildung des Cyclopentanrings bevorzugt sein [86,87]. Die Ringschlussreaktion ist ein disrotatorischer Prozess unter Beachtung der Orbital-symmetrie [88]. Die Seitenketten sind *cis* zum gebildeten Ring orientiert. Der Ringschluss kann dabei *exo,exo* oder *endo,endo* erfolgen. Die *exo,exo*-Stellung der Seitenketten entspricht der Bildung des 8-iso-Isomers von  $PGF_{2\alpha}$  [86]. Die *endo,endo*-Stellung der Seitenketten entspricht der Bildung des 12-iso-Isomers von  $PGF_{2\alpha}$  [87].

*Vorkommen der Isoprostane.* Isoprostane konnten in allen bisher untersuchten Geweben und biologischen Flüssigkeiten nachgewiesen werden [78]. Werden Ratten mit  $CCl_4$  vergiftet, so

zeigt sich die einsetzende Lipid-Peroxidation zunächst in veresterten Lipiden der Leber [89]. Bestätigt wurde die Beobachtung durch FAB (*fast atom bombardment*)-Massenspektrometrie (MS)- und FAB-Tandem-MS-Messungen an intakten Phospholipiden der Leber [90,91]. Anschließend kommt es zur Freisetzung der Isoprostane durch Hydrolyse mit Phospholipasen, so dass diese als freie F<sub>2</sub>-Isoprostane im Blutplasma gemessen werden können [90]. Damit sind zwei Paradigmen der Prostaglandin-Bildung für die Isoprostan-Bildung nicht mehr gültig: (1) Prostanoiden liegen nicht als Phospholipid-Ester vor und (2) Prostanoiden werden erst nach der Hydrolyse durch Phospholipasen aus Arachidonsäure gebildet. Dies hat zum einen Auswirkungen auf die Fluidität peroxidierter Membranen, zum anderen ist es von Bedeutung für die biologische Aktivität der Isoprostane [76,92].

*Klassen der Isoprostane.* Neben den F<sub>2</sub>-Isoprostanen ist auch die *in vivo* Bildung von D-Ring- und E-Ring-Isoprostanen bekannt [93,94]. Es ist nicht zwingend, dass die Isoformen (Abb. 4) des PGH<sub>2</sub> zu F<sub>2</sub>-Isoprostanen reduziert werden. Auch eine Umlagerung der Isoformen des PGH<sub>2</sub> zu D<sub>2</sub>- und E<sub>2</sub>-Isoprostanen ist möglich. Der Stoffwechsel der Arachidonsäure ist hinlänglich bekannt [95,96]. Spezifische Enzyme katalysieren die Bildung von PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>. Ob jedoch die gleichen Enzyme die Bildung von D<sub>2</sub>-, E<sub>2</sub>- und F<sub>2</sub>-Isoprostanen aus den Isoformen des PGH<sub>2</sub> katalysieren, ist fraglich. Die Mechanismen, die das Verhältnis der Bildung von D<sub>2</sub>- und E<sub>2</sub>- zu F<sub>2</sub>-Isoprostanen regulieren, sind bislang unbekannt [93]. Glutathion spielt hier möglicherweise eine Rolle [97].

Von Morrow *et al.* wird ebenfalls die *in vivo*-Bildung von Isothromboxanen berichtet [98]. Wie *in vitro*-Untersuchungen seiner Arbeitsgruppe zeigten, ist zur Bildung der Isothromboxane aus Isoformen (Abb. 4) des PGH<sub>2</sub> nicht unbedingt die Anwesenheit von Fe-haltigen Enzymen wie der Thromboxan-Synthase notwendig [98]. Auch Isomere der Leukotriene und Levuglandine werden als Produkte der Lipid-Peroxidation von Arachidonsäure diskutiert [99,100]. Im Tiermodell der Lipid-Peroxidation durch CCl<sub>4</sub>-Vergiftung von Ratten zeigt sich die Umwandlung von D<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>-Isoprostanen in A<sub>2</sub>/J<sub>2</sub>-Isoprostane. A<sub>2</sub>/J<sub>2</sub>-Isoprostane wurden jedoch nur in veresteter Form nachgewiesen [101]. Unter den Isomeren der A<sub>2</sub>/J<sub>2</sub>-Isoprostane konnte 8-iso-PGA<sub>2</sub> identifiziert werden [102].

Von besonderer Bedeutung für den Status der Lipid-Peroxidation in neuronalen Membranen ist das Vorhandensein von Neuroprostanen, die aus Docosahexaensäure gebildet werden. Es wurden sowohl F<sub>4</sub>-Isoprostane (Neuroprostane) als auch D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>-Isoprostane identifiziert

[103,104,105]. Fischöle sind eine weitere Quelle der Docosahexaensäure [106]. Neben der Docosahexaensäure enthalten Fischöle auch die fünffach ungesättigte Fettsäure Eicosapentaensäure [106]. Wegen der durch sie ausgelösten kompetitiven Inhibition der Enzyme PGH<sub>2</sub>-Synthase, Lipoxygenase und Thromboxan-Synthase wird beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren ein positiver Effekt auf Entzündungs- und Gefäßerkrankungen zugesprochen [107,108,109]. Die Autooxidation von Eicosapentaensäure führt zur Bildung von F<sub>3</sub>-Isoprostanen [110,111].

In höheren Pflanzen kommt Arachidonsäure nicht vor [112].  $\alpha$ -Linolensäure ist hier die dominierende mehrfach ungesättigte Fettsäure. Der Mechanismus der Lipid-Peroxidation der  $\alpha$ -Linolensäure findet in Analogie zur Peroxidation der Arachidonsäure statt [113,114]. Die aus der  $\alpha$ -Linolensäure entstehenden F<sub>1</sub>- und E<sub>1</sub>-Isoprostane (Phytoprostane) entsprechen nicht Dinor-dihydro-Derivaten der F<sub>2</sub>- und E<sub>2</sub>-Isoprostane (Regioisomere **I** bis **IV**, Abb. 4), und zwar aufgrund einer anderen Regioisomerie [73,114]. Lipid-Peroxidation von  $\gamma$ -Linolensäure führt im Gegensatz dazu zur Bildung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-Derivaten der Regioisomere **III** und **IV** (Abb. 4). Dies ist bei der Diskussion des Ursprungs von Dinor-dihydro-Derivaten von F<sub>2</sub>-Isoprostanen von Bedeutung (siehe 4.1.3.7).

*Nomenklatur der Isoprostane.* Die Nomenklatur der Isoprostane ist zur Zeit nicht einheitlich. Entsprechende Vorschläge zur systematischen Nomenklatur der Isoprostane wurden jedoch gemacht [115,116]. Im folgenden Text wird die Nomenklatur der Isoprostane nach [116] verwandt. Für 8-iso- und 12-iso-Isomere der Prostaglandine werden die trivialen Namen beibehalten.

### 1.2.1 F<sub>2</sub>-Isoprostane

Im Jahr 1990 wurde die Bedeutung der nichtenzymatischen, durch freie Radikale katalysierten Lipid-Peroxidation der Arachidonsäure durch den Nachweis von Isomeren des PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , den F<sub>2</sub>-Isoprostanen, in biologischen Proben erkannt [73]. Mehrere Eigenschaften machen sie zu idealen Indexparametern des *in vivo*-Status der Lipid-Peroxidation: (1) F<sub>2</sub>-Isoprostane sind in biologischen Flüssigkeiten stabil [74], (2) F<sub>2</sub>-Isoprostane sind spezifische Produkte der Lipid-Peroxidation [117,118] und (3) ihre Bildung ist unabhängig von der Lipidzusammensetzung der Diät [119,120]. F<sub>2</sub>-Isoprostane werden auch als Marker des oxidativen Stresses

diskutiert [121]. Einen guten Überblick über die F<sub>2</sub>-Isoprostane geben L. Jackson Roberts und Domenico Praticò [122,123].

*Regioisomere der F<sub>2</sub>-Isoprostane.* Vier Regioisomere der F<sub>2</sub>-Isoprostane sind möglich. Das erste in Leberhomogenat von Ratten nach CCl<sub>4</sub>-Vergiftung identifizierte F<sub>2</sub>-Isoprostan war 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [124]. Synonyme sind 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, IPF<sub>2α</sub>-IV, iPF<sub>2α</sub>-III und 15-F<sub>2t</sub>-IsoP [115, 116,123]. Ein weiteres F<sub>2</sub>-Isoprostan mit gleicher Regioisomerie wie PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist 9α,11β-PGF<sub>2α</sub>. Das endogene Vorkommen von 9α,11β-PGF<sub>2α</sub> ist jedoch eher auf die stereoselektive Biotransformation von enzymatisch gebildetem PGD<sub>2</sub> durch die 11-Keto-Reduktase zurückzuführen [125]. Entsprechend den Mechanismen der durch freie Radikale katalysierten Lipid-Peroxidation sollten noch andere Regioisomere der F<sub>2</sub>-Isoprostane entstehen (siehe 1.2). Tatsächlich konnte ein weiteres Regioisomer der F<sub>2</sub>-Isoprostane im menschlichen Urin nachgewiesen werden, iPF<sub>2α</sub>-VI (IPF<sub>2α</sub>-I) [126]. Neben iPF<sub>2α</sub>-VI konnten auch die Stereoisomere 8,12-iso-iPF<sub>2α</sub>-VI (8,12-iso-IPF<sub>2α</sub>-I) und 5-epi-8,12-iso-iPF<sub>2α</sub>-VI (5-epi-8,12-iso-IPF<sub>2α</sub>-I) identifiziert werden [127,128]. Die Ausscheidung von iPF<sub>2α</sub>-VI in den menschlichen Urin (740 ±40 pg/mg Kreatinin, n=6) ist etwa 8-fach höher als diejenige von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (95 ±10 pg/mg Kreatinin, n=6) [127]. Bei Rauchern ist die Ausscheidung der beiden Isoprostane signifikant erhöht und es besteht eine hohe Korrelation der Konzentration beider Isomere im menschlichen Urin [127]. Die Bildung von iPF<sub>2α</sub>-VI ist unabhängig von der PGH<sub>2</sub>-Synthase [127].

*Totalsynthesen.* Nachdem die Bedeutung der F<sub>2</sub>-Isoprostane als Indexparameter der *in vivo*-Lipid-Peroxidation erkannt worden war, wurden in verschiedenen Laboratorien Totalsynthesen entwickelt. So konnten größere Mengen an F<sub>2</sub>-Isoprostanen für pharmakologische Studien gewonnen werden. Im Mittelpunkt der synthetischen Arbeiten stand neben 12-iso-PGF<sub>2α</sub> zunächst 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [129,130,131,132]. Weitere Totalsynthesen anderer Regioisomere von F<sub>2</sub>-Isoprostanen folgten: 1996 das Regioisomer iPF<sub>2α</sub>-VI und 1997 das Regioisomer iPF<sub>2α</sub>-IV [133,134]. Mittlerweile steht auch ein deuterierter interner Standard für die massenspektrometrische Analyse von iPF<sub>2α</sub>-VI zur Verfügung [135].

*Metabolismus.* Der Metabolismus der F<sub>2</sub>-Isoprostane sollte dem Metabolismus der F<sub>2</sub>-Prostaglandine entsprechen. Neben der β-Oxidation ist die ω-Oxidation, Reduktion von Doppelbindungen, Oxidation von Hydroxyl-Gruppen und ω-Hydroxylierung für PGF<sub>2α</sub> beschrieben

worden [136,137,138]. Tatsächlich findet sich im Urin von Menschen mindestens ein weiteres Stereoisomer von PGD<sub>2</sub>-MUM (MUM = *major urinary metabolite*), dessen Existenz nur auf die  $\beta$ - und  $\omega$ -Oxidation eines F<sub>2</sub>-Isoprostanen zurückgeführt werden kann [139,140]. Weitere tetranor-Metabolite eines Regioisomers von F<sub>2</sub>-Isoprostanen (iPF<sub>2 $\alpha$</sub> -III) finden sich im Urin und Plasma von Ratten [140]. Auch sind Metabolite anderer Regioisomere von F<sub>2</sub>-Isoprostanen bekannt: Über 45 Regio- und Stereoisomere von F<sub>2</sub>-Isoprostanen konnten aus dem Leberhomogenat von Ratten nach CCl<sub>4</sub>-Vergiftung isoliert werden [141].

*Biologische Aktivität.* Isoprostane werden auch als Mediatoren des oxidativen Stresses diskutiert [76,123]. Insbesondere zeigen sich 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ausgesprochen biologisch aktiv. Die herausragende Stellung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und 8-iso-PGE<sub>2</sub> unter den Isoprostanen mag jedoch zum Teil historisch begründet sein. Unter den F<sub>2</sub>-Isoprostanen ist darüber hinaus nur die biologische Bedeutung von 12-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  erkannt worden [142,143]. Die Aktivität von 12-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ist über den PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Rezeptor vermittelt [142]. Ungeklärt ist die Frage, ob die lokale Konzentration der Isoprostane *in vivo* überhaupt für eine Rezeptorvermittelte Wirkung ausreicht [123].

### 1.2.2 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub>, E<sub>2</sub>-Isoprostane und 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub>

Die relativ frühe synthetische Verfügbarkeit von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  erlaubte zum einen die Identifikation als eines der Produkte der durch freie Radikale katalysierten Peroxidation von Arachidonsäure und zum anderen pharmakologische Untersuchungen [78].

*Mechanismen der Bildung von 8-iso-PGF<sub>2a</sub>* Für 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ist auch die enzymatische Bildung als Nebenprodukt der PGH<sub>2</sub>-Synthase bekannt. Die gleichzeitige Bildung anderer F<sub>2</sub>-Isoprostane tritt dabei nicht auf. In *in vitro*-Versuchen konnte die Bildung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  durch stimulierte Thrombozyten [144,145], aktivierte Monozyten [146,147] und Endothelzellen [148] nachgewiesen werden. Die Bildung erfolgt dabei abhängig von der Cyclooxygenase-Aktivität und kann durch Inhibitoren der Cyclooxygenase-Aktivität gestoppt werden. Der Unterschied zwischen Thrombozyten und stimulierten Monozyten liegt darin, dass zwei verschiedene Isoformen des Enzyms vorliegen. In Thrombozyten findet sich ausschließlich die PGH<sub>2</sub>-Synthase-I, während sich in stimulierten Monozyten die PGH<sub>2</sub>-Synthase-II findet. Die Menge an gebildetem 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ist jedoch im Vergleich zu anderen

Prostanoiden nur sehr gering [144-148]. So ist beispielsweise die Produktion von Thromboxan in aktivierten Plättchen um mehr als das Tausendfache größer als die von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [144]. Der Gehalt an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin übersteigt den Gehalt der wichtigsten Produkte der PGH<sub>2</sub>-Synthase jedoch um mehr als eine Größenordnung [150]. Die Abhängigkeit der endogen gebildeten Menge an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> von der Aktivität der Cyclooxygenase-Funktion wird kontrovers diskutiert [149-152]. Möglicherweise spielen Art und Dosierung der eingesetzten Inhibitoren der Cyclooxygenase-Aktivität eine Rolle. Wird die Aktivität der PGH<sub>2</sub>-Synthase durch eher geringe Dosen an Aspirin (1x 350 mg oder 7 Tage 75 mg) unterdrückt, ändert sich die Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin nicht [149]. Hohe Dosen an Indomethacin (1,6 bis 2,2 mg/kg/Tag, 2 Tage) führen zu einer signifikanten Abnahme der Ausscheidung an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin [150,151]. Die Abnahme der Ausscheidung an Prostaglandinen ist jedoch wesentlich größer [151]. Naproxen (1 g/1,73 m<sup>2</sup>/Tag, 2 Tage) verringert die Ausscheidung an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin nicht [152].

*E<sub>2</sub>-Isoprostane und 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub>*. Das von der PGH<sub>2</sub>-Synthase gebildete PGH<sub>2</sub> ist instabil und lagert sich mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten unter anderem in PGD<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> um [153]. Entsprechend sollten sich radikalisch gebildete Isomere des PGH<sub>2</sub> auch in E<sub>2</sub>- und D<sub>2</sub>-Isoprostane umlagern. Werden Ratten mit CCl<sub>4</sub> vergiftet, lassen sich tatsächlich E<sub>2</sub>- und D<sub>2</sub>-Isoprostane nachweisen [93]. Die an F<sub>2</sub>-Isoprostanen gebildete Menge übersteigt die an E<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>-Isoprostanen gebildete um ein Mehrfaches [97]. Eines der gebildeten E<sub>2</sub>-Isoprostane konnte als 8-iso-PGE<sub>2</sub> identifiziert werden [94]. 8-iso-PGE<sub>2</sub> repräsentiert etwa 1 – 2 % der an E<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>-Isoprostanen gebildeten Menge, während 8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen größeren Anteil an den nach CCl<sub>4</sub>-Vergiftung von Ratten in der Leber gebildeten F<sub>2</sub>-Isoprostanen hat [94,124].

*Metabolismus*. Tetranor-PGF-MUM (5α,7α-Dihydroxy-11-keto-tetranorprostan-1,16-dicarbonsäure) ist der Hauptmetabolit von PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin [154,155]. Im Gegensatz dazu wird 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> nach Infusion zu 30 % als 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> in den menschlichen Urin ausgeschieden [156]. Zusätzlich zu 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist auch 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin als Metabolit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> identifiziert worden [157]. Neben 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> findet sich in der Zellkultur von Rattenhepatozyten 2,3,4,5-Tetranor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> als Metabolit [157]. Eine kinetische Studie über den Metabolismus von 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> ist von Samar Basu am Kaninchen durchgeführt worden [158]. Die Halbwertszeit in der Eliminationsphase beträgt etwa vier Minuten.



Über den Metabolismus von E<sub>2</sub>-Isoprostanen und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ist bisher nichts bekannt. Möglich ist eine Kombination von β- und ω-Oxidation mit der Reduktion von Doppelbindungen analog zum Metabolismus von PGE<sub>2</sub> [159,160].

*Biologische Aktivität.* Die Ausscheidungsrate von nichtmetabolisiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Humanurin ist ungewöhnlich hoch. Dies mag zum Teil auf eine lokale Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Niere zurückzuführen sein. Interessanterweise ist 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein bereits in nanomolaren Konzentrationen hochpotenter Vasokonstriktor des renalen Blutgefäßsystems [161]. Auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> bewirkt eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses (RPF), jedoch setzt der Effekt erst bei höheren Konzentrationen ein [162]. Die gleichgerichtete biologische Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ist erstaunlich [161-163,164], da PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> oft gegenteilige Effekte auf das Blutgefäßsystem zeigen [165]. Als Mitogen induziert 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die Zellteilung *in vitro* und kann die Freisetzung von Endothelin-1 stimulieren [166,167]. Endothelin-1 und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ihrerseits können die vasokonstriktive Wirkung von Angiotensin-II potenzieren [168,169].

Auch der Einfluß von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf andere Gefäßsysteme ist untersucht worden [170-177]. So zeigen *in vitro*-Untersuchungen, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> vasokonstriktorisch auf die Lungenarterie und bronchokonstriktorisch auf die Lungenmuskulatur wirkt [170,171,172]. *In vivo*-Untersuchungen über die bronchokonstriktorische Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sind widersprüchlich. Inhalation von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> führt dosisabhängig zu gesteigertem Lungenwiderstand beim Meerschweinchen, jedoch nicht beim Kaninchen [173,174,175]. Ebenfalls zu einer Reduktion des Blutflusses kommt es in der perfundierten Leber von Ratten und am isolierten Herzen von Ratte und Meerschweinchen [163,176,177]. Auch hier zeigen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> gleichgerichtete Effekte [163]. Interessanterweise zeigt sich in der Zellkultur von Gefäßmuskelzellen auch die Bildung von Isoprostanen. Werden glatte Gefäßmuskelzellen mit Cytokinen stimuliert, so kommt es zur Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [178].

Verschiedene Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Pharmakologie der vasokonstriktiven Wirkung der Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> näher zu charakterisieren [179-185]. So wurde zunächst die gefäßverengende Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf isolierte arterielle Blutgefäße der Ratte, des Schweins sowie des Rinds untersucht [179,180,181]. Die EC<sub>50</sub>-Werte (EC = *effective concentration*, Konzentration bei der die Hälfte eines maxi-

mal möglichen Effektes erreicht wird) liegen zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  M, abhängig von Art und Ursprung des Gefäßes. Daneben zeigen sich auch Hinweise auf eine gefäßerweiternde Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [182]. An isolierten Herzen von Meerschweinchen konnte gezeigt werden, dass neben 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> als Vasokonstriktor gleicher Potenz wirkt [163]. Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch eine andere Arbeitsgruppe bei Untersuchungen mit *in vivo*-Mikroskopie an der Ratte [183]. Die mit Gewebe aus Tieren gewonnenen Erkenntnisse können auch auf den Menschen übertragen werden [184,185]. Die vasokonstriktiven Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und PGF<sub>2α</sub> sind vergleichbar [185].

Eine Reihe anderer Untersuchungen widmete sich der Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> auf die Plättchenaggregation [164,186-188]. Für beide Isoprostane, 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>, konnte gezeigt werden, dass es sich um schwache Agonisten, aber in erster Linie um Antagonisten der Plättchenaggregation handelt [164,186]. Die agonistische Wirkung ist bei 8-iso-PGE<sub>2</sub> etwas stärker ausgeprägt als bei 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [164]. Die agonistische Wirkung kann nicht durch Indomethacin, wohl aber durch den Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten SQ29548 aufgehoben werden [164,186]. Sowohl 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> inhibieren zwar die durch Arachidonsäure ausgelöste, nicht aber die durch ADP induzierte Plättchenaggregation [186,187]. Die antiaggregatorischen Effekte von NO können durch beide Isoprostane vermindert werden [188].

### 1.3 Analytik von Isoprostanen

Seit der Entdeckung der Bedeutung der Isoprostane als Indexparameter für die Lipid-Peroxidation *in vivo* wurden eine ganze Reihe von analytischen Methoden zu ihrer quantitativen Bestimmung entwickelt. Die erste analytische Methode zur quantitativen Bestimmung der Isoprostane nutzte die Massenspektrometrie [189]. Die massenspektrometrische Bestimmung der Prostaglandine hat sich als eine überaus zuverlässige und präzise Methode über Jahrzehnte hinweg etabliert [125,190,191,192,193,194,195]. Die zunächst eingesetzte Ionisation durch Elektronenstoß (*electron impact*, EI) [196] wurde durch die empfindlichere Technik der negativen chemischen Ionisation (*negative-ion chemical ionization*, NICI) für die massenspektrometrische Quantifizierung der Prostaglandine abgelöst [197]. Eine Verbesserung der Spezifität brachte der Einsatz der Tandem-MS-Technik [198]. Auf der Grundlage dieses Wissens wurden sowohl Methoden zur Bestimmung von mehreren F<sub>2</sub>-Isoprostanen unbekannter

---

Zusammensetzung als auch zur selektiven Bestimmung eines einzigen F<sub>2</sub>-Isoprostanes, d.h. 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, entwickelt.

### 1.3.1 F<sub>2</sub>-Isoprostane

Eine Einführung in die quantitative Bestimmung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen wird von L. J. Roberts *et al.*, D. Praticò und J. A. Lawson *et al.* gegeben [122,123,199].

*Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)*. Die ursprüngliche Methode von J. D. Morrow *et al.* zur massenspektrometrischen Quantifizierung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen beinhaltet zwei Festphasenextraktionen (SPE), zwei dünnenschichtchromatographische Trennungen (TLC) und zwei Derivatisierungsschritte [189,200]. Das Chromatogramm der anschließenden GC-MS-Analyse zeigt diverse Peaks, von denen derjenige, der mit synthetischem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> coeluiert, zur Quantifizierung ausgewählt wird. Dabei handelt es sich um eine ganze Reihe von F<sub>2</sub>-Isoprostanen. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt [189]. Als interne Standards wurden zunächst 9α,11β-[<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]PGF<sub>2α</sub> und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> verwendet [189], später dann 8-iso-[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> [200]. Eine Vereinfachung der Methode besteht in der Elimination eines TLC-Trennschrittes [201]. Diese Methode fand nur Anwendung zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Blutplasma [202]. Eine weitere Vereinfachung führte zum Verzicht auf jegliche TLC-Trennung der Proben, konnte sich jedoch bisher nicht etablieren [203]. Wird die TLC-Trennung durch eine HPLC-Trennung ersetzt, hat dies möglicherweise Vorteile in Bezug auf die Recovery des Analyten [204,205]. Ein Vergleich der HPLC- mit der TLC-Aufreinigung fällt schwer, da nicht bekannt ist, welche F<sub>2</sub>-Isoprostane bei der anschließenden massenspektrometrischen Quantifizierung erfasst werden [189,205].

*GC-Tandem-MS*. Die Technik der Tandem-Massenspektroskopie erhöht die Selektivität der massenspektrometrischen Analyse. Daher eignet sich die GC-Tandem-MS eher zur selektiven Quantifizierung eines F<sub>2</sub>-Isoprostanes, z.B. 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Dennoch ist die GC-Tandem-MS-Analyse von F<sub>2</sub>-Isoprostanen unbekannter Zusammensetzung nach SPE- und TLC-Aufreinigung beschrieben worden [150]. Die gleiche Methode mit zusätzlicher HPLC-Aufreinigung der Proben erlaubt die Elimination anderer F<sub>2</sub>-Isoprostane neben 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [150].

---

*LC-Tandem-MS.* Die *on-line*-Kombination von HPLC mit MS erübrigt eine vorherige Derivatisierung. Lediglich ein SPE-Schritt ist zur Probenvorbereitung nötig. Die LC-Tandem-MS-Analyse erlaubt sowohl die Quantifizierung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen integrativ als auch von diskreten F<sub>2</sub>-Isoprostanen aller vier möglichen Regioisomere [206,207].

### 1.3.2 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub>

Die Identifikation von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als ein dominierendes F<sub>2</sub>-Isoprostan in Leberhomogenat der Ratte nach CCl<sub>4</sub>-Vergiftung führte zur Entwicklung von analytischen Methoden, die die selektive Quantifizierung dieses Isoprostans ermöglichen [124]. Von Vorteil ist dabei, dass ein definierter Messparameter, nämlich 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, erfasst wird.

*Massenspektrometrische Bestimmung.* Insbesondere für die selektive Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Humanurin eignet sich eine Kombination von SPE, TLC und HPLC mit GC-MS [208] und GC-Tandem-MS [150]. Die Methoden sind jedoch aufgrund der Kombination verschiedener chromatographischer Schritte sehr aufwendig. F. Catella *et al.* ersetzten die HPLC durch eine weitere TLC-Trennung, wenn bei anschließender GC-MS der *tert.*-Butyldimethylsilyl- statt des Trimethylsilyl-Esters des Analyten chromatographiert wird [149]. Möglicherweise vereinfachen läßt sich die Probenvorbereitung für die Analytik von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Humanplasma [201].

*Immunologische Verfahren.* Sowohl ein EIA (*enzyme immuno assay*) als auch ein RIA (*radioimmunoassay*) für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde von Z. Wang *et al.* entwickelt [209]. Beide immunologische Verfahren wurden mit GC-MS validiert [149,209]. Weitere immunologische Verfahren sind beschrieben worden [210,211]. Ein kommerziell erhältlicher EIA (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) wurde zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in unterschiedlichen Matrices eingesetzt [212,213,214,215]. Ein Vergleich dieses Immunoassays mit GC-MS für Urinproben zeigt jedoch keine besonders hohe Korrelation zwischen beiden Methoden ( $r=0,628$  [216]).

*Kombination von Immunoaffinitätschromatographie und GC-MS.* A. Bachi *et al.* entwickelten eine schnelle Methode zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit GC-MS und 8-iso-[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> als internen Standard [217]. Dabei wird 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in einem Schritt mit gegen

---

8-iso-PGF<sub>2α</sub> gerichtetem Antiserum aus der biologischen Probe extrahiert und aufgereinigt. Der Vorteil der Immunoaffinitätschromatographie liegt in der Ersparnis weiterer chromatographischer Trennschritte.

## 1.4 3-Nitrotyrosin

Die Nitrierung von Aromaten ist seit langem bekannt [218]. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins aktiviert den Aromaten für die Nitrierung. Mehrere Synthesen für 3-Nitrotyrosin mit Nitriersäure [218,219,220] und Tetranitromethan [221] sind beschrieben worden. 3-Nitrotyrosin fand Anwendung als interner Standard bei der Aminosäure-Sequenzierung [222]. Die Nitrierung von Tyrosin wurde auch zur Proteinbestimmung eingesetzt [223]. Die Möglichkeit einer endogenen Bildung von 3-Nitrotyrosin wurde 1973 von M. E. Knowles *et al.* diskutiert [224]. Erst siebzehn Jahre später fanden Hiroshi Ohshima und seine Mitarbeiter weitere Hinweise auf eine endogene Bildung von 3-Nitrotyrosin [225]. Dies führte zu einer rasanten Entwicklung von analytischen Methoden zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in biologischen Geweben und Flüssigkeiten (siehe 1.5). Bei einer Reihe von pathologischen Veränderungen wurde 3-Nitrotyrosin seither detektiert. Einen Überblick über das wachsende Forschungsgebiet geben Harry Ischiropoulos und Barry Halliwell [226,227].

*Mechanismen der Substitution am Aromaten.* Die Substitutionsreaktionen am Aromaten lassen sich wie folgt einteilen: elektrophile aromatische Substitution, nucleophile aromatische Substitution und radikalische aromatische Substitution [228].

*Elektrophile aromatische Substitution.* Bereits vorhandene Substituenten am aromatischen System können den Benzolkern für die elektrophile aromatische Substitution aktivieren und dirigierend auf die weiteren Substituenten wirken [229]. Für die elektrophile aromatische Substitution des Tyrosins hat dies zwei Konsequenzen: (1) Tyrosin ist gegenüber Phenylalanin aktiviert und (2) die Bildung von 3-Nitrotyrosin ist gegenüber der von 2-Nitrotyrosin bevorzugt.

*Radikalische aromatische Substitution.* Im Unterschied zur ionischen Substitution aktivieren Substituenten am Benzolring den Aromaten immer für die Zweitsubstitution [230]. Substituenten dirigieren in die Position *ortho* > *para* > *meta*, wenn keine sterische Hinderung

vorliegt. Reaktionen zwischen Radikalen untereinander laufen schneller ab als Reaktionen zwischen Radikal und Nicht-Radikal. Für die radikalische aromatische Substitution des Tyrosins bedeutet dies: (1) die Bildung von 3-Nitrotyrosin ist gegenüber der von 2-Nitrotyrosin bevorzugt und (2) es entsteht auch Dityrosin.

*Substitution nach dem  $S_{RN}1$ -Mechanismus.* Einen Sonderfall und gleichsam eine Kombination aus nucleophiler und radikalischer Substitution stellt der  $S_{RN}1$ -Mechanismus dar. Es findet ein Elektronentransfer (ET) zwischen Nucleophil und Aromat statt [228].

*Bildung von 3-Nitrotyrosin.* Trotz entsprechender Hinweise in der Literatur wird die Nitrierung von Tyrosin-Resten in Proteinen häufig auf die *in vivo*-Bildung von Peroxynitrit zurückgeführt [231,232]. Weitere Mechanismen können jedoch für die Entstehung von 3-Nitrotyrosin in Frage kommen [232]. Nachfolgend werden diese diskutiert.

### **Peroxynitrit**

Die Nitrierung und Oxidation von Tyrosin durch Peroxynitrit wurde eingehend diskutiert [33,226]. Für den Wirkmechanismus der Oxidation und Nitrierung durch Peroxynitrit kommen zwei Varianten in Frage: der HOONO\*-Mechanismus und der "Käfig"-Mechanismus. Die Reaktion von Peroxynitrit und Tyrosin ist in Abb. 5 wiedergegeben. Die Ausbeute der Nitrierung von Tyrosin durch Peroxynitrit ist bei physiologischem pH-Wert eher gering [231]. Erst bei hohen Peroxynitrit-Konzentrationen ( $>100 \mu\text{M}$ ) wird eine Ausbeute von 4-5 % 3-Nitrotyrosin erreicht [231,233]. Für kleine Peroxynitrit-Konzentrationen ( $<10 \mu\text{M}$ ) überwiegt die Dityrosin-Bildung die der 3-Nitrotyrosin-Bildung um ein Vielfaches [234].

Wichtig für die Nitrierung von Tyrosin ist die Reaktion von  $\text{CO}_2$  mit Peroxynitrit. Bei physiologischen Konzentrationen von 25 – 30 mM Bicarbonat [235] wird der Reaktion von  $\text{CO}_2$  mit Peroxynitrit auch *in vivo* eine entscheidende Rolle zugeschrieben [19]. Die Zugabe von  $\text{CO}_2$  erhöht die Ausbeute an Nitrierungsprodukten und verringert die Oxidation und Hydroxylierung durch Peroxynitrit [19,236,234]. So ist das Verhältnis von 3-Nitrotyrosin zu *o,o*-Dityrosin nicht nur abhängig von der eingesetzten Peroxynitrit-Konzentration, sondern auch vom pH-Wert der Tyrosin- und der Bicarbonat-Konzentration [236]. Für die Nitrierung des Phenols wird die *ortho*-Substitution auch bei Zugabe von Bicarbonat bevorzugt [237]. 25 mM Bicarbonat verdoppeln die Ausbeute an 3-Nitrotyrosin, reduzieren die Ausbeute an 3,4-Di-

hydroxyphenylalanin (3,4-DOPA) jedoch zu zwei Dritteln [238]. Während Antioxidantien (Mannitol, Harnstoff, Ascorbinsäure) sowohl die Bildung von 3-Nitrotyrosin als auch von *o,o*-Dityrosin verringern, ist dieser Effekt in 25 mM Bicarbonat-Puffer nicht mehr nachweisbar [233,239].

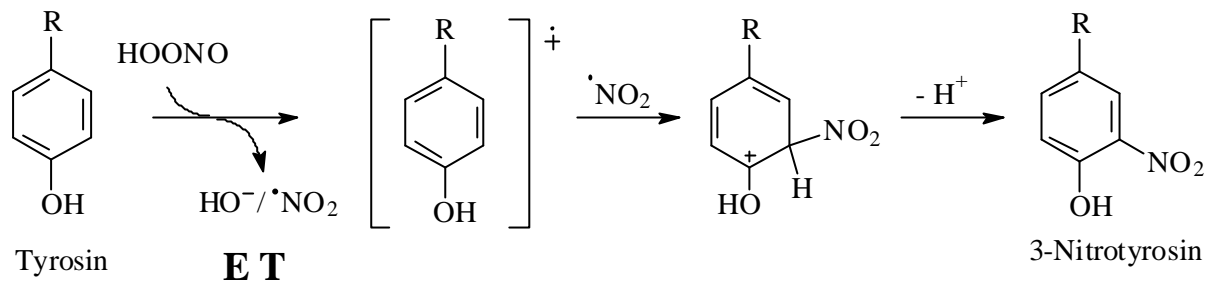


Abb. 5. Ein möglicher Mechanismus für die Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Peroxynitrit und Tyrosin [36]. ET = Elektronentransfer.

Auch bei der Nitrierung von Tyrosin-Resten in Proteinen spielt  $\text{CO}_2$  eine wichtige Rolle [239-241]. Während Bicarbonat ( $>1$  mM) die Ausbeute der Nitrierung von BSA (*bovine serum albumin*) durch Peroxynitrit verdoppelt [239], wird die Nitrierung anderer Proteine (hier: Glutamin-Synthase) erst bei Anwesenheit von  $\text{CO}_2$  (1,3 mM) möglich [240]. Die Tyrosin-Reste in Proteinen werden in unterschiedlichem Ausmaß nitriert. Möglicherweise ist die Nachbarschaft von Tyrosin-Resten zu Häm-Zentren von großer Bedeutung [241,242].

Peroxynitrit modifiziert nicht nur Tyrosin-Reste in Proteinen, sondern ist auch als Bakterizid biologisch aktiv [243]. Die Bildung von Peroxynitrit könnte auch an der NO-vermittelten immunologischen Aktivität von Makrophagen beteiligt sein [244]. Mögliche biologisch relevante Schutzmechanismen gegen die zerstörerische Wirkung von Peroxynitrit werden von Garvin E. Arteel *et al.* diskutiert [245].

### Wasserstoffperoxid und Nitrit

Abhängig vom pH-Wert der Lösung nitriert oder hydroxyliert ein Gemisch aus Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Nitrit aromatische Verbindungen. Für leicht saure pH-Werte (pH 5 – 6) dominiert die Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Tyrosin, während für pH-Werte  $< 5$  die Bildung von Dihydroxy-Verbindungen (2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure aus Salicylsäure) bevorzugt ist [246]. Dieses pH-Wert Profil entspricht demjenigen von Peroxynitrit. In der Tat ist

---

die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu sauren Lösungen von Nitrit mit anschließender Alkalisierung der Lösung die klassische Methode der Peroxynitrit-Herstellung [35].

### Hypochlorige Säure und Nitrit

Werden Hypochlorige Säure (HOCl) und Nitrit in äquimolaren Mengen zu BSA zugesetzt, so wird die konzentrationsabhängige Bildung von 3-Nitrotyrosin beobachtet [247]. Als eigentliche reaktive Spezies wird Nitrylchlorid ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) vermutet [247]. Auch LDL (*low density lipoprotein*) wird durch  $\text{HOCl}/\text{NO}_2^-$  modifiziert. Dies könnte Konsequenzen für die Aufnahme von Cholesterin aus LDL haben [248]. Bei der Oxidation von Proteinen mit  $\text{HOCl}/\text{NO}_2^-$  wird neben 3-Nitrotyrosin auch immer 3-Chlorotyrosin gebildet. 3-Chlorotyrosin entsteht auch bei Inkubation mit HOCl allein, jedoch in weitaus geringerem Umfang [247]. Wird 3-Nitrotyrosin neben 3-Chlorotyrosin in biologischen Geweben und Flüssigkeiten gebildet, so ist dies folglich ein Hinweis auf die Beteiligung von HOCl. Paradoxe Weise führt HOCl *in vitro* auch zur Abnahme der Konzentration von bereits gebildetem 3-Nitrotyrosin [249]. Die Bildung von HOCl bei entzündlichen Prozessen ist bekannt [250]. Die Myeloperoxidase (MPO, *EC 1.11.1.7*) spielt hier eine Rolle.

### Myeloperoxidase

Die Bedeutung des Enzyms MPO für die *in vivo*-Nitrierung von Tyrosin wird von A. J. Kettle kommentiert [251]; methodische Ansätze werden von S. L. Hazen gegeben [252]. Die MPO ist eine unspezifische Peroxidase, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat u.a. für die Oxidation von Cl<sup>-</sup> und  $\text{NO}_2^-$  nutzt. Sowohl die Oxidation von Cl<sup>-</sup> als auch von  $\text{NO}_2^-$  wird als möglicher Mechanismus der Nitrierung von Tyrosin durch die MPO diskutiert [253-255]. Die Zwei-Elektronen-Oxidation von Cl<sup>-</sup> führt zur Bildung von  $\text{Cl}^+$ , welches sich mit Wasser in sehr schneller Reaktion zu Hypochloriger Säure und  $\text{H}^+$  umsetzt. Als reaktive Spezies bildet sich mit Nitrit Nitrylchlorid ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) [253]. Bei der Ein-Elektron-Oxidation von  $\text{NO}_2^-$  durch MPO entsteht als reaktive Spezies  $\text{NO}_2$  [254]. Ein Zusammenhang zwischen der durch die MPO katalysierten Nitrierung von Tyrosin und der Aktivität der SOD ist denkbar. Das durch die SOD abgebaute Radikalanion Superoxid könnte die Radikale  $\cdot\text{NO}_2$  oder  $\text{Tyr-O}\cdot$  abfangen und so die Nitrierung verhindern [255]. Neben der MPO kommen noch weitere Peroxidasen für die Nitrierung von Tyrosin in Frage: Die in eosinophilen Granulozyten gebildete Peroxidase (EPO) [256] und die im Pflanzenreich verbreitete Peroxidase des Meerrettichs (HPO) [257].



## Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid

Sowohl das Radikal  $\cdot\text{NO}$  als auch das Radikal  $\cdot\text{NO}_2$  reagieren leicht mit anderen Radikalen. Im Unterschied dazu reagiert  $\cdot\text{NO}$  nur langsam mit nicht-radikalischen Molekülen. Die Reaktion von  $\cdot\text{NO}$  mit Tyrosin setzt daher die Bildung des Tyrosyl-Radikals voraus (Abb. 6). Die Bildung des Tyrosyl-Radikals spielt bei einigen enzymatisch katalysierten Reaktionen eine Rolle, u.a. bei der Prostaglandin-Synthese und der Desoxyribonucleotid-Bildung durch Ribonucleotid-Reduktasen [258]. Die Reaktion von  $\cdot\text{NO}$  mit dem Tyrosyl-Radikal verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  sehr schnell [259]. Zunächst werden *O*-Nitrosotyrosin gebildet, welche zum stabileren 3-Nitrosotyrosin weiter oxidiert werden ([258], Abb. 6).

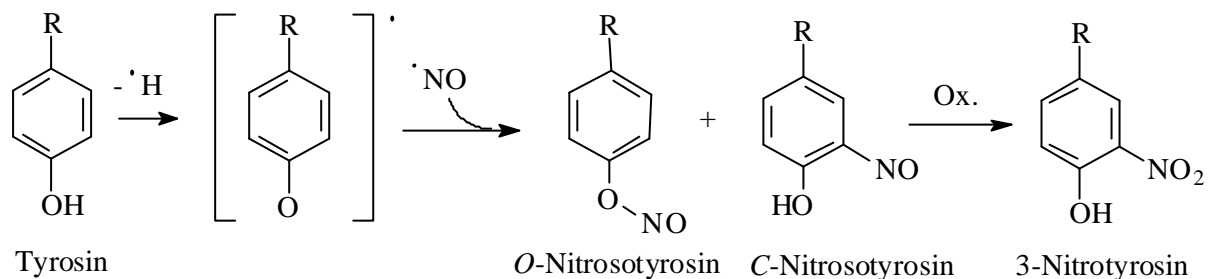


Abb. 6. Mechanismus der Reaktion von Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ) und Tyrosin.

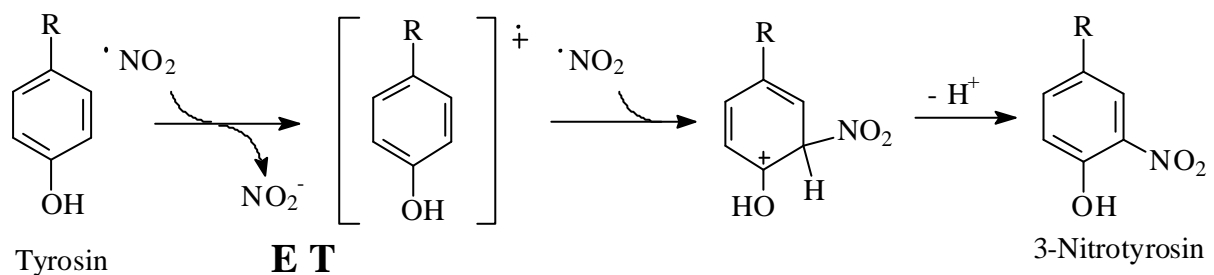


Abb. 7. Mechanismus der Reaktion von Stickstoffdioxid ( $\cdot\text{NO}_2$ ) und Tyrosin

Auch  $\cdot\text{NO}_2$  reagiert *in vitro* mit Tyrosin unter Bildung von 3-Nitrosotyrosin [260,261]. Die Reaktion setzt kein Tyrosyl-Radikal voraus und verläuft nach dem  $\text{S}_{\text{RN}}1$ -Mechanismus mit Elektronentransfer (ET) (Abb. 7). Für die Reaktion werden Konzentrationen an  $\cdot\text{NO}_2$  benötigt, wie sie u.a. in Zigarettenrauch zu finden sind [262,263].

### 1.4.1 3-Nitrotyrosin als Aminosäure in Proteinen

Für eine Reihe von Proteinen konnte gezeigt werden, dass Tyrosin-Reste *in vitro* nitriert werden. Unter den der Nitrierung zugänglichen Proteinen finden sich Gerüstproteine ( $\alpha$ -Tubulin [264]), Transportproteine (Albumin und Oxyhämoglobin [241]) und Enzyme. Die Nitrierung von Tyrosin-Resten in Proteinen spielt eine wichtige Rolle für die Funktionalität von Cytochrom P450 [265], RNase [266], SOD und Prostacyclin-Synthase.

*Pathologie.* 3-Nitrotyrosin-Reste finden sich vermehrt in Proteinen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen [226,227]. Insbesondere bei neurodegenerativen Erkrankungen ist die Nitrierung von Tyrosin-Resten in Proteinen ein pathologisch relevanter Vorgang, u.a. bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), dem Parkinson Syndrom [267], dem Alzheimer Syndrom [268] und der Multiplen Sklerose [269]. Weitere Erkrankungen, für die vermehrt 3-Nitrotyrosin-Reste in Proteinen gefunden wurden, sind Arteriosklerose [270,271] und Diabetes [272]. Auch nach Transplantation [273], bei entzündlichen Prozessen [274] und Hepatitis [275] wird die Nitrierung von Tyrosin-Resten berichtet.

*Denitrase-Aktivität.* Bei der Abschätzung der Nitrierung von Proteinen ist ein möglicher *in vivo*-Abbau von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen zu beachten. Ferid Murad *et al.* fanden 1998 eine Aktivität im Gewebehomogenat der Milz von Ratten, welche zeit- und konzentrationsabhängig zum Verschwinden von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen führt und nannten diese "Nitrotyrosin-Denitrase" [276]. Dabei handelt es sich jedoch nicht um ein Enzym aus der Familie der Nitro-Reduktasen [277]. Auch in der Haut von Ratten findet ein Abbau von 3-Nitrotyrosin-Resten statt [278]. Eine mögliche Erklärung ist die nicht-enzymatische Reduktion von 3-Nitrotyrosin zu 3-Aminotyrosin [279].

*Selektivität der Nitrierung.* Unterschiedliche Proteine werden in unterschiedlichem Ausmaß von RNS nitriert [280-283]. Proteine reagieren unterschiedlich auf Peroxynitrit [281]. So wird Phospholipase A<sub>2</sub> bevorzugt von Peroxynitrit nitriert, während RNase eher durch die MPO (MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nitriert wird [282]. Neben C-Nitro-Verbindungen können auch N-Nitro- und N-Nitroso-Verbindungen entstehen [283]. Nicht alle Tyrosin-Reste in einem Protein werden in gleichem Ausmaß nitriert [241]. Im Folgenden wird die Nitrierung einiger besonderer Proteine und Enzyme diskutiert.

---

## Albumin

Die Nitrierung von Albumin wurde mit einer Reihe von RNS *in vitro* untersucht [239,240, 247,254,261,280,284]. Wird BSA (10 mg/ml, 151  $\mu$ M) mit 1 mM Peroxynitrit inkubiert, so beträgt die gebildete Konzentration an 3-Nitrotyrosin  $21 \pm 2$   $\mu$ mol/mmol Tyrosin (2,1 %) [261]. Wird mit 1,5 mM Peroxynitrit inkubiert, so beträgt sie bereits  $54,8 \pm 8,5$   $\mu$ mol/mmol Tyrosin (5,5 %) [284]. Bei Verringerung des Verhältnisses von Peroxynitrit zu BSA auf äquimolare Mengen nimmt die Ausbeute der Nitrierung deutlich ab [280]. Ein Vergleich der Ausbeute der Nitrierung von BSA (10 mg/ml) für verschiedene Stickstoffspezies ergibt folgende Reihenfolge: Peroxynitrit >  $\text{NaNO}_2/\text{HOCl}$  >  $\text{NaNO}_2$  > NO > GSNO [284]. Über die Selektivität der Nitrierung der 19 Tyrosin-Reste in BSA ist bisher nichts bekannt.

## Superoxid-Dismutase

Die SOD wandelt das Superoxid-Anion in Wasserstoffperoxid um, welches durch Katalase oder Glutathion-Peroxidase abgebaut wird [285]. Damit konkurriert die SOD mit Stickstoffmonoxid um das Superoxid-Anion und verringert die Peroxynitrit-Bildung. Vier Klassen der SOD wurden bisher identifiziert. Relevant für den menschlichen Organismus sind die cytosolische Cu,Zn-SOD, die mitochondriale Mn-SOD und die extrazelluläre SOD (EC-SOD) [286].

*Cu,Zn-SOD*. Mutationen der Cu,Zn-SOD spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) [287]. Durch Punktmutation veränderte Cu,Zn-SOD in Mäusen führt zur erhöhten Nitrierung von Proteinen und freiem Tyrosin im Kortex [288,289].

*Mn-SOD*. Trotz der geringen Ausbeute der Nitrierung von Tyrosin-Resten bewirkt die Nitrierung von Tyrosin-Resten in der Mn-SOD die Inhibierung der Katalyse [290,291]. Die Nitrierung des Tyrosin-Rests Y34 in der Nähe des katalytisch aktiven Zentrums der Mn-SOD führt zur Inaktivierung des Enzyms [291].

*EC-SOD*. Die EC-SOD verhindert unter bestimmten Voraussetzungen die Inaktivierung von endothelial gebildetem  $\cdot\text{NO}$  durch  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [292,293].

---

## Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase und Prostacyclin-Synthase

Das Enzym PGH<sub>2</sub>-Synthase katalysiert die Bildung von PGH<sub>2</sub> aus Arachidonsäure. Die PGH<sub>2</sub>-Synthase ist ein Dimer, wobei jede Untereinheit zwei katalytisch aktive Zentren besitzt: die Cyclooxygenase (COX)-Funktion und die Peroxidase-Funktion [294]. Zwei Isoformen sind bekannt: PGH<sub>2</sub>-Synthase-I (COX-I) und PGH<sub>2</sub>-Synthase-II (COX-II) [295]. Weitere Enzyme der Prostanoid-Synthese sind die Thromboxan-Synthase und die Prostacyclin-Synthase.

*Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase.* Die Interaktionen von RNS mit der PGH<sub>2</sub>-Synthase sind vielfältig [296].  $\cdot$ NO hat stimulierende und inhibierende Wirkung auf die Aktivität der PGH<sub>2</sub>-Synthase [297-299]. NO-Donatoren aktivieren die PGH<sub>2</sub>-Synthase und Inhibitoren der NO-Synthase verringern die Prostaglandin-Synthese *in vivo* [297]. Bei der Cyclooxygenase-Reaktion wird intermediär ein Tyrosyl-Radikal aus Y385 gebildet. Dieses Radikal reagiert naturgemäß mit dem NO-Radikal, was zu einer Inhibierung der Cyclooxygenase-Reaktion *in vitro* führt [298,299]. Auch die Reaktion von  $\cdot$ NO mit Cystein-Resten in der PGH<sub>2</sub>-Synthase ist beschrieben worden [300]. Ähnlich differenziert wird die Wirkung von Peroxynitrit auf die PGH<sub>2</sub>-Synthase betrachtet: Als Peroxid aktiviert Peroxynitrit die Cyclooxygenase-Funktion der PGH<sub>2</sub>-Synthase [301]. Nitrierung von Tyrosin-Resten durch Peroxynitrit führt jedoch auch zur Inaktivierung des Enzyms [302].

*Prostacyclin-Synthase.* Die Prostacyclin-Synthase nimmt eine Sonderstellung unter den Enzymen der Prostanoid-Synthese ein. Während für die Inaktivierung der PGH<sub>2</sub>-Synthase-I und -II Peroxynitrit-Konzentrationen von 1 mM bzw. 100  $\mu$ M nötig sind, beträgt die IC<sub>50</sub>-Konzentration (IC = *inhibitor concentration*, Konzentration, bei der die Hälfte der maximal möglichen Inhibition erreicht wird) von Peroxynitrit für die Prostacyclin-Synthase nur 50 nM [303]. Die Nachbarschaft zum Häm-Zentrum der Peroxidase-Funktion ist hier möglicherweise entscheidend.

### 1.4.2 3-Nitrotyrosin als freie Aminosäure

3-Nitrotyrosin findet sich als freie Aminosäure in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten. Für unterschiedliche pathologische Veränderungen wurde die Bildung von 3-Nitrotyrosin gezeigt [227].

*Metabolismus.* Der erste Schritt der Metabolisierung von L-Tyrosin ist die Desaminierung zu *p*-Hydroxyphenylpyruvat durch die Tyrosin-Aminotransferase. Weitere Enzyme katalysieren die Oxidation zu Homogentisat, die Decarboxylierung zu *p*-Hydroxyphenylacetat oder die Reduktion zu *p*-Hydroxyphenyllactat [304]. Ohshima *et al.* konnten zeigen, dass 3-Nitrotyrosin in der Ratte zu 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure (43,7 %) und 3-Nitro-4-hydroxymilchsäure (5,3 %) metabolisiert wird [225]. *o*-Hydroxyphenylelessigsäure ist auch der Hauptmetabolit von *o*-Tyrosin in der Ratte [305]. Pharmakokinetische Untersuchungen zum Metabolismus von 3-Nitrotyrosin wurden von Tabrizi-Fard *et al.* durchgeführt [306].

*Pathologie.* Abhängig von der Detektionsmethode wurden sehr unterschiedliche Konzentrationen von freiem 3-Nitrotyrosin in biologischen Flüssigkeiten gemessen. Sowohl bei chronisch als auch bei akut entzündlichen Prozessen wurde eine Erhöhung der Konzentration von freiem 3-Nitrotyrosin gefunden [307-310]. Die Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis enthält hohe Konzentrationen an 3-Nitrotyrosin (0,1 – 1,2  $\mu\text{M}$  [307]). Die Ergebnisse sind aufgrund der unselektiven Detektion mit HPLV-UV/vis umstritten [308]. Bei septischem Schock und akutem Nierenversagen wurden noch weitaus höhere Konzentrationen mit der gleichen Methode in humanem Plasma gemessen [309]. Auch bei Zöliakie werden hohe Plasmakonzentrationen an freiem 3-Nitrotyrosin berichtet (1,3  $\mu\text{M}$  [310]). Die Detektion erfolgte mit einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Wird unter der Therapie mit organischen Nitraten eine Nitrattoleranz entwickelt, so werden erhöhte Konzentrationen an freiem 3-Nitrotyrosin mit GC-TEA (TEA = *thermal energy analyzer*) im Urin gemessen (186  $\mu\text{g/Tag}$  [311]). Bemerkenswert niedrige Konzentrationen an freiem 3-Nitrotyrosin wurden mit elektrochemischer Detektion detektiert. Bei Patienten mit ALS wurden  $9,0 \pm 4,2$  nM 3-Nitrotyrosin in Cerebrospinalflüssigkeit gemessen, während die mittlere Konzentration für eine gesunde Kontrollgruppe bei  $1,4 \pm 0,7$  nM 3-Nitrotyrosin lag [312].

## 1.5 Analytik von 3-Nitrotyrosin

Die erste analytische Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Plasmaproteinen der Ratte wurde 1990 von Hiroshi Ohshima und Mitarbeitern vorgestellt [225]. Aufgrund der Bedeutung für pathologische Veränderungen wurden seither eine Reihe von analytischen Methoden zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin entwickelt. Eine Einführung geben C. Herce-Pagliai *et al.* [313].

---

Grundsätzlich eignen sich Methoden zur quantitativen Bestimmung von freiem 3-Nitrotyrosin auch zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen. Aminosäure-Reste in Proteinen können durch saure Hydrolyse oder enzymatisch aus dem Polypeptid-Verband gelöst werden [314]. Zur Trennung von Aminosäuren und 3-Nitrotyrosin wurden HPLC- und GC-Techniken verwendet. Zur Detektion wurden UV-, elektrochemische (EC)- und Fluoreszenz (FL)-Methoden sowie thermische Zersetzung (TEA) und MS eingesetzt [313]. Ein Vergleich verschiedener HPLC-Detektionsmethoden findet sich bei H. Liu *et al.* [315].

*Immunologische Verfahren.* Als immunohistochemisches Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten wurde ein Antikörper gegen 3-Nitrotyrosin in Proteinen von J. S. Beckmann entwickelt [270]. Der Antikörper von Beckmann fand seither breite Anwendung. Der ursprüngliche Antikörper ist gegen Nitro-BSA gerichtet und wurde aufgrund seiner geringen Spezifität weiterentwickelt [316]. Andere monoklonale [317] und polyklonale [310] Antikörper wurden zur Entwicklung von ELISAs eingesetzt.

*HPLC-UV.* Die ersten Methoden zur HPLC-Bestimmung von freiem 3-Nitrotyrosin nutzten die Absorption phenolischer Aminosäuren bei 274 nm [233,262,307]. Das Detektionslimit lag jedoch mit 0,2  $\mu\text{M}$  recht hoch [307]. Ein weiteres Problem ist die Detektion von anderen coeluierenden Substanzen bei der recht unspezifischen Absorptionsmessung [318]. 3-Nitrotyrosin zeigt pH-Wert-abhängig weitere Absorptionsmaxima: 356 nm bei pH 5 und 430 nm bei pH 10. Der Vergleich der Absorptionsmessung der unterschiedlichen Wellenlängen erlaubt eine etwas spezifischere Messung, ist jedoch auch von der Beschaffenheit der biologischen Matrix abhängig [319].

*HPLC-EC.* Die elektrochemische Detektion basiert auf der Oxidation oder Reduktion des Analyten in der Detektionszelle bei konstantem Potential. Sowohl Reduktion als auch Oxidation wurden zur elektrochemischen Detektion von 3-Nitrotyrosin eingesetzt [273,320-323]. Eine Kombination von mehreren Detektionszellen erhöht die Selektivität der Methode. So wurden Methoden mit dualen Zellen [273,320], mit 8 Zellen [321,322] und mit 16 Zellen entwickelt [314,323]. Während K. A. Skinner *et al.* zwei oxidierende Potentiale anlegten [273], wählten R. S. Sodom *et al.* je ein reduzierendes und ein oxidierendes Potential [320]. Die Sensitivität ist bei beiden Methoden sehr hoch und liegt bei einem Detektionslimit von 50 bis 62 fmol. Trotz der größeren Selektivität wurde diese Sensitivität bei 8 – 16 Zellen bisher nicht erreicht [321,323]. Von M. K. Shigenaga *et al.* wurde eine indirekte Methode zur

elektrochemischen Detektion von 3-Nitrotyrosin vorgestellt [274,324]. Dazu wird 3-Nitrotyrosin vor der chromatographischen Trennung *N*-acetyliert und zu *N*-Acetyl-3-aminotyrosin reduziert. Das erhaltene Derivat lässt sich leichter oxidieren und ist weniger polar. Das Detektionslimit der Methode liegt bei 20 fmol. Ebenfalls die bessere Oxidierbarkeit von 3-Aminotyrosin nutzten H. Ohshima und Mitarbeiter bei der *on-line* Reduktion von 3-Nitrotyrosin auf einer Platinsäule mit anschließender EC-Detektion [284]. Das Detektionslimit dieser Methode liegt bei 100 fmol. Noch weiter konnte das Detektionslimit von H. Liu *et al.* gesenkt werden. Durch die Kombination von Photolyse und elektrochemischer Detektion wurde ein Detektionslimit von 10 fmol (0,5 nM in Microdialysat von Rattenblut) erreicht [325]. Einige HPLC-EC-Methoden wurden zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin in Humanplasma nach Inkubation mit RNS [273,284] sowie zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Plasmaproteinen eingesetzt [273,274,284,320,322]. Mit anderen HPLC-EC-Methoden wurde 3-Nitrotyrosin nach Hydrolyse der Proteine in Gewebehomogenaten von Leber [273] und Gehirn [323] oder in der Zellkultur von Makrophagen [274] und Gliazellen [321] bestimmt.

*HPLC-FL.* 3-Nitrotyrosin selbst besitzt keine fluoreszierenden Eigenschaften. Es kann jedoch mit geeigneten Reagenzien zu fluoreszenzaktiven Derivaten umgesetzt werden. Als solche eignen sich *o*-Phthalaldehyde (OPA) und 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F). Y. Kamisaki *et al.* wählten letzteren Weg und erreichten so ein Detektionslimit von 100 fmol bzw. 6 nM in Humanplasma [326].

*GC-TEA.* H. Ohshima *et al.* verwendeten für ihre ersten Untersuchungen über die Nitrierung von Tyrosin GC-TEA [225]. 3-Nitrotyrosin wurde in das *tert*-Butyldimethylsilyl-Derivat überführt und bei 700 °C pyrolysiert. Das relativ hohe Detektionslimit der Methode von 2,2 pmol konnte von Petruzelli *et al.* durch weitere Probenvorbereitung auf 80 fmol gesenkt werden [263]. Dazu wurden die Proben mit SPE extrahiert und mit HPLC aufgereinigt. 3-Nitrotyrosin wurde mit dieser Methode in Humanplasma bei Rauchern bestimmt [263].

*GC-MS.* Als weitaus empfindlicher erweist sich die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektroskopie. Im Gegensatz zur LC-MS ist die Derivatisierung des Analyten nötig. Unterschiedliche Derivatisierungstechniken wurden für die GC-Trennung von 3-Nitrotyrosin eingesetzt, als interner Standard diente jeweils 3-Nitro- $^{13}\text{C}_6$ tyrosin. [308,327,329-331]. Neben dem *n*-Propyl-*N*-heptafluorobutyryl (HFB)- und dem *n*-Propyl-*N*-pentafluoro-

---

propionyl (PFP)-Derivat [327] wurde auch das Trifluoroethyl-*N*-trifluoroacetyl-Derivat von 3-Nitrotyrosin generiert [308]. Als Detektionslimit wird 1 fmol angegeben [308]. Durch Reduktion von 3-Nitrotyrosin zu 3-Aminotyrosin (nach [328]) konnte das Detektionslimit auf 400 amol gesenkt werden [329]. Unter den gewählten Bedingungen wurde das *n*-Propyl-tri-PFP-Derivat von 3-Aminotyrosin gebildet, welches bessere chromatographische Eigenschaften aufweist [329]. Statt zum *n*-Propyl-Ester setzten M. T. Frost *et al.* das HFB-Amid von 3-Nitrotyrosin zum tert-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Ester-TBDMS-Ether-Derivat um [330]. H. Jiang und M. Balazy wählten eine andere Derivatisierungstechnik. Sie setzten 3-Nitrotyrosin mit Pentafluorobenzyl (PFB)-Bromid zum tri-PFB-Derivat um. Das Detektionslimit wurde mit 13 fmol angegeben [331]. Mit den beschriebenen GC-MS-Methoden wurde 3-Nitrotyrosin in Humanplasma [330], in Proteinen aus Humanplasma [330], in Proteinen aus humanen Blutplättchen [331] und humanem LDL bestimmt [332]. Daneben erfolgte die Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin-Resten aus Gewebehomogenaten der Ratte [329,333].

*LC-Tandem-MS.* Eine LC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten wurde von D. Yi *et al.* entwickelt [281,308]. Die Methode garantiert die zuverlässige Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin, bei der auf eine Derivatisierung des Analyten verzichtet werden kann [308]. Das Detektionslimit der Methode liegt bei 4,4 nM 3-Nitrotyrosin weshalb sie zur Detektion von freiem 3-Nitrotyrosin nicht geeignet ist.

*Elektrophoretische Bestimmung.* Die Kapillarelektrophorese eignet sich als weitere Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in kleinen Peptiden. Bisher ist diese Methode jedoch eher unempfindlich (eingesetzte Peptidkonzentration  $\approx 1$  mM [334]).



---

## 2 Zielsetzung

Der oxidative Stress resultiert aus einer Störung des biologischen Gleichgewichtes zwischen der pro- und antioxidativen Kapazität der Zelle [1,6]. Sind an der Entstehung des oxidativen Stresses freie Radikale beteiligt, so ist die direkte Messung der Radikale über *spin-traps* mit ESR möglich [12,13]. Alle anderen analytischen Methoden vermögen jedoch lediglich indirekt den oxidativen Stress abzuschätzen. Dabei wird versucht, den Schaden, der an Proteinen, Lipiden und der DNA entsteht, durch Markermoleküle zu erfassen [7]. Eine der wichtigsten Aufgaben für das Forschungsgebiet des oxidativen Stresses ist es, Referenzmethoden zu schaffen, um sowohl für die Diagnose als auch die pharmakologische Intervention verlässliche Parameter des oxidativen Stresses zu erhalten [5,7-9]. Eine ganze Reihe von Biomarkern des oxidativen Stresses wurde diskutiert [8,335,336]. Es zeigt sich jedoch, dass unter diesen nur diejenigen Bestand haben werden, die die geforderte Stabilität und Spezifität erreichen [337]. TBARS, konjugierte Diene und flüchtige Alkane erscheinen aufgrund ihrer unspezifischen Herkunft eher als ungeeignete Biomarker für die oxidativen Veränderungen an Lipiden [338]. Im Gegensatz dazu erfüllen Isoprostane die geforderten Kriterien von Stabilität und Spezifität [122,200,339]. Unter den Oxidationsprodukten der Aminosäuren wird insbesondere 3-Nitrotyrosin als stabiles Endprodukt für den an Proteinen entstandenen Schaden diskutiert [61,313,340]. Für die Oxidation der DNA ist 8-OHdG der gebräuchlichste Biomarker [52].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, für Isoprostane und 3-Nitrotyrosin analytische Methoden zu entwickeln, die sich mit hoher Zuverlässigkeit zur Erfassung des oxidativen Stresses eignen. Die Eignung sollte insbesondere für klinische Fragestellungen, also *in vivo*, gegeben sein. Kriterien der Zuverlässigkeit sollten Reproduzierbarkeit, Interferenzfreiheit und Genauigkeit der entwickelten Methode sein. Als Methode der Wahl sollte die Massenspektrometrie eingesetzt werden, die sich für viele analytische Fragestellungen als Referenzmethode etabliert hat, so auch zur Bestimmung von Prostaglandinen [341]. Bisherige auf der Massenspektrometrie basierende Methoden setzten einfache GC-MS zur Quantifizierung ein. Sie erfüllen jedoch nicht die geforderten Kriterien von Selektivität und Sensitivität bzw. erreichen diese nur nach zeit- und materialaufwendiger Probenvorbereitung. Für die Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin schließen bisher eingesetzte GC-MS-Methoden die artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin nicht aus. Insbesondere der Einsatz der GC-tandem MS kombiniert mit einer geeigneten Probenvorbereitung sollte hier die geforderte Selektivität und Sensitivität bieten.

---

## 3 Methoden

### 3.1 Festphasenextraktion (SPE)

#### 3.1.1 Festphasenextraktion von Prostaglandinen und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-essigsäure

Die zu extrahierenden Proben wurden mit 5 M HCOOH auf pH 2 - 3 angesäuert, gevortext und 30 min auf Eis gelagert. Die Octadecylsilica (C<sub>18</sub>)-SPE-Kartuschen (500 mg, Chromabond, Macherey-Nagel, Düren) wurden wie folgt vorkonditioniert: 10 ml Methanol und 10 ml 0,2 %iger (0,05 M) HCOOH. Nach Aufgabe der angesäuerten Proben sind sie mit 10 ml 0,2 %iger HCOOH und 2 ml Heptan gewaschen und kurz mit Luft getrocknet worden. Die Elution erfolgte mit 2 ml Ethylacetat in 4 ml Polypropylen (PP)-Röhrchen. Die Eluate wurden bis zu einem Volumen von ca. 0,5 ml unter N<sub>2</sub> eingengt, in silanisierte Spitzvials (1 ml) überführt und unter einem N<sub>2</sub>-Strom zur Trockene eingengt.

#### 3.1.2 Festphasenextraktion von 3-Nitrotyrosin

HR-P SPE-Kartuschen (100 mg, Chromabond, Macherey-Nagel, Düren) wurden wie folgt vorkonditioniert: 5 ml Methanol, 5 ml Methanol/0,5 %ig NH<sub>3</sub> (aq), 90/10 (v/v), und 5 ml H<sub>2</sub>O. Nach Aufgabe der 3-ml HPLC-Fraktion wurde mit 5 ml 0,3 mM HCl gewaschen und kurz mit Luft getrocknet. Zur Elution wurden 2 ml Methanol/0,5 %ig NH<sub>3</sub> (aq), 90/10 (v/v), verwendet. Lösemittel wurden unter N<sub>2</sub> abgeblasen und der Rückstand zur massenspektrometrischen Analyse derivatisiert.

### 3.2 Derivatisierungsprozeduren

#### 3.2.1 Veresterung mit Pentafluorobenzylbromid (PFB-Bromid)

Die zur Trockene eingengten Proben wurden mit 100 µl Acetonitril, 10 µl Methanol und 10 µl *N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt. Nach Zugabe von 10 µl PFB-Bromid (33 Vol.% in

---

Acetonitril) derivatisierten die Proben 1 h bei 30° C im Thermoblock. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt.

### **3.2.2 Veresterung mit 4-Fluorobenzylester (4FB-Bromid)**

Die zur Trockene eingengten Proben wurden mit 100 µl Acetonitril, 10 µl Methanol und 10 µl *N*-Ethyldiisopropylamin versetzt. Nach Zugabe von 10 µl 4FB-Bromid (33 Vol.% in Acetonitril) wurden die Proben 1 h bei 30° C derivatisiert und anschließend wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt.

### **3.2.3 Veresterung mit Diazomethan**

Die zur Trockene eingengten Proben wurden 3x mit jeweils 100 µl ätherischer Diazomethanlösung inkubiert. Die ätherische Diazomethanlösung wurde immer frisch angesetzt [342].

### **3.2.4 Methoximierung mit *O*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid (MOX)**

Die zur Trockene eingengten Proben wurden mit 100 µl einer gesättigten, wasserfreien MOX-Lösung in Pyridin versetzt und 1 h bei 60° C im Thermoblock erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoff eingengt. Der Rückstand wurde mit 200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und zweimal mit je 500 µl Diethylether extrahiert. Die obere Phase wurde in ein Spitzvial überführt und der Ether unter Stickstoff eingengt.

### **3.2.5 Methoximierung mit *O*-2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylhydroxylamin Hydrochlorid (PFBOX)**

Die zur Trockene eingengten Proben wurden mit 100 µl einer gesättigten, wasserfreien PFBOX-Lösung in Pyridin versetzt und 1 h bei 60° C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoff eingengt. Der Rückstand wurde mit 200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und zweimal mit je 500 µl Diethylether extrahiert. Die obere Phase wurde in ein weiteres silanisiertes Gefäß überführt und der Ether unter Stickstoff eingengt.

### 3.2.6 Veretherung mit *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)

Mit 50  $\mu\text{l}$  BSTFA wurden die zur Trockene eingengten Proben aufgenommen und anschließend 1 h bei 60° C im Thermoblock erhitzt. So wurden die Trimethylsilyl (TMS)-Ether erhalten. Ein 1- $\mu\text{l}$  Aliquot des Reaktionsgemisches wurde direkt in das GC-MS- bzw. GC-Tandem-MS-Gerät injiziert.

### 3.2.7 Veresterung mit propanolischer HCl

Die zur Trockene eingengten Proben wurden in 100  $\mu\text{l}$  3 M HCl in n-Propanol aufgenommen, nach 1 h bei 65 °C unter N<sub>2</sub> eingengt und weiter derivatisiert.

### 3.2.8 Amidierung mit Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFPA)

Die zur Trockene eingengten Proben wurden in 100  $\mu\text{l}$  PFPA in Ethylacetat (1:4, v/v) gelöst und 30 min auf 65 °C erhitzt. Lösemittel und überschüssiges Reagenz wurden unter N<sub>2</sub> abgeblasen und der Rückstand mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat in ein weiteres silanisiertes Gefäß überführt. Das Ethylacetat wurde unter N<sub>2</sub> verdampft.

## 3.3 Dünnschichtchromatographie (TLC)

### 3.3.1 TLC-System für Prostaglandine als freie Säuren

Zur TLC-Trennung der freien Säuren der Prostaglandine wurden Silicagel-Platten (20x20 cm, Merck, Darmstadt) mit einem TLC Applikator AS 30 und einer DC-MAT Entwicklungskammer (Desaga, Wiesloch) verwendet. Die Proben wurden in 10  $\mu\text{l}$  Ethanol aufgetragen (15 mm, 30 s/ $\mu\text{l}$ ). Ein Gemisch von Ethylacetat/*iso*-Octan/CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O, 55:25:10:50 (v/v), diente als Laufmittel. Zur Trennung wurde 5 min vorkonditioniert, 120 min entwickelt (Front 14 cm) und 5 min getrocknet. Geeignete, 0,6 cm breite Banden wurden ausgekratzt, mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol extrahiert, zentrifugiert (4000 g, 10 min) und der weiteren Analyse zugeführt. Die Bestimmung der *R<sub>f</sub>*-Werte erfolgte durch massenspektrometrische Analyse oder Szintillationszählung der einzelne Banden für radioaktiv markierte Verbindungen.

### 3.3.2 TLC-System für Prostaglandine und 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure als PFB-Ester

Zur TLC-Trennung der PFB-Ester der Prostaglandine wurden diese auf 20 x 20 cm Silicagel-Platten mit dem TLC-Applikator AS 30 aufgetragen und in einer DC-MAT Kammer entwickelt. Für 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure sind Silicagel-UV Platten (Merck) gleicher Dimension verwendet worden. Bei 30 s/ $\mu$ l Auftragesgeschwindigkeit wurden im Abstand von 20 mm mit einer Breite von 15 mm und einem Vorlauf von 15 mm die Proben aufgetragen. Ein Gemisch aus 92:8 (v/v) Ethylacetat/Methanol diente bei einer Laufhöhe von 16 cm und 5 min Vorkonditionierung unter Kammersättigung als Laufmittel. Zur Trennung der PFB-O-Methyl-hydroxylamin (MO)-Derivate wurde ein Gemisch aus 65:35 (v/v) Ethylacetat/*iso*-Octan bei gleicher Laufhöhe und Vorkonditionierung ohne Kammersättigung als Laufmittel eingesetzt. Zum Anfärben der einzelnen Banden der Referenzsubstanzen für Prostaglandine wurden die DC-Platten kurz in 66:33 (v/v) H<sub>2</sub>O/konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 60 g/l CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O getaucht und 15 min auf 150 °C erhitzt. 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure zeigt eine charakteristische Absorption bei 278 nm. Die Bestimmung der R<sub>F</sub>-Werte erfolgte mit UV-Licht gleicher Wellenlänge.

## 3.4 High-performance liquid chromatography (HPLC)

### 3.4.1 HPLC-System für Prostaglandine als freie Säuren

Die HPLC-Trennung von Prostaglandinen wurde mit einem HPLC-System der Serie 1050 (Hewlett-Packard, Waldbronn) durchgeführt. Als stationäre Phase der Trennsäule (250 x 4,6 mm ID) wurde 100-5C<sub>18</sub> Nucleosil, 5  $\mu$ m Korngröße, (Macherey-Nagel) verwendet. Die freien Säuren wurden isokratisch mit 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril/Isopropanol 67:21:12 (v/v), pH 3,5, bei einer Flussrate von 1,8 ml/min analysiert. Die Detektion erfolgte bei 205 nm. Wurde das HPLC-System zur Aufreinigung von Urinproben eingesetzt, so wurde wie folgt verfahren: Nach der SPE der Urine (siehe 3.1.1) wurden die Rückstände in 200  $\mu$ l der mobilen Phase aufgenommen und mit dem HPLC-System chromatographiert. Eine 1,8-ml Fraktion mit der Retentionszeit von 8-*iso*-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  wurde gesammelt, 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt und auf pH 2-3 mit 2,5 M HCOOH angesäuert. 8-*iso*-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  wurde mit einer weiteren SPE extrahiert (siehe 3.1.1). Das Elutionsmittel der SPE wurde unter N<sub>2</sub> abgeblasen, der

---

Rückstand mit PFB-Bromid zum PFB-Ester umgesetzt und weiter mit TLC aufgearbeitet (siehe 3.3.2).

### 3.4.2 HPLC-System für Prostaglandine als PFB-Ester

Für die HPLC-Trennung der PFB-Ester von Prostaglandinen wurde ein Hewlett-Packard HPLC-System der Serie 1050 verwendet. Als stationäre Phase der Trennsäule (250 x 4,6 mm ID) diente 100-5C<sub>18</sub> Nucleosil, 5 µm Korngröße, von Macherey-Nagel. Die PFB-Ester wurden isokratisch mit Wasser/Acetonitril, 50:50 (v/v), bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Die Detektion erfolgte bei 235 nm. Für quantitative Bestimmungen von Isoprostanen im menschlichen Urin wurde das beschriebene HPLC-System wie folgt eingesetzt: Die Urine wurden mit SPE extrahiert und zu den PFB-Estern umgesetzt. Die PFB-Ester wurden anschließend mit Eluent (Wasser/Acetonitril, 50:50 (v/v)) rekonstituiert und ein 100-µl Aliquot wurde mit der HPLC chromatographiert und fraktioniert gesammelt. Die Fraktion (2 ml) mit der gewünschten Retentionszeit wurde zweimal mit jeweils 2 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden unter N<sub>2</sub> eingengt und die Rückstände zu den TMS-Ethern umgesetzt.

### 3.4.3 HPLC-System für underivatisierte Aminosäuren

Zur Trennung der underivatisierten Aminosäuren ist folgendes HPLC-System verwendet worden: Autosampler (851-AS, Jasco, Tokyo, Japan), Pumpe (2150, LKB, Brommer, Schweden), UV-vis Detektor (Spectroflow 783, Kratos, Ramsey, NJ, USA) und Fraktions-sammler (FC 203, Gilson, Villiers le Bel, France). Stationäre Phase war ODS-3V (3 µm Korngröße) in einer Säule der Dimension 150 x 4,6 mm ID (Phenomenex, Aschaffenburg). Die mobile Phase bestand aus 70 mM Kaliumphosphat-Puffer/ Methanol, 92/8 (v/v), pH 2,5. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min. Die Detektion von Tyrosin, 3-Nitrotyrosin und *p*-Nitrophenylalanin (Sigma, Deisenhofen) erfolgte bei 278 nm oder 356 nm (nur 3-Nitrotyrosin und *p*-Nitrophenylalanin). Nitrat und Nitrit wurden bei 205 nm detektiert. Für die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin im Blutplasma wurden 200 µl Ultrafiltrat direkt injiziert. Für die Bestimmung von 3-Nitro-tyrosin-Resten wurden nach enzymatischer Hydrolyse 200 µl des Hydrolysates direkt injiziert. Zur entsprechenden Retentionszeit wurde eine 2-min Fraktion gesammelt. Die Quantifizierung für Konzentrationen < 1 µM erfolgte nach SPE und Derivatisierung mit GC-Tandem-MS. Die Quantifizierung für Konzentrationen > 1 µM

erfolgte photometrisch durch Peakflächenvergleich mit externem Standard (3-Nitrotyrosin). Für die Bestimmung von Tyrosin-Resten wurden nach enzymatischer Hydrolyse 1:100 verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch durch Peakflächenvergleich mit externem Standard (Tyrosin).

### 3.5 Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)

#### 3.5.1 GC-MS-System für derivatisierte Prostaglandine

Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analysen für Prostaglandine wurden mit einem *triple-stage* Quadrupol Massenspektrometer TSQ 7000 (ThermoQuest TSQ 7000, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) verbunden mit einem Gaschromatographen Trace 2000 (Thermoquest) durchgeführt. Zur Probenaufgabe wurde ein Autosampler (AS 2000, CE Instruments, Austin, TX, USA) verwendet, zur gaschromatographischen Trennung eine Kapillarsäule Optima 17 (Macherey-Nagel) der Dimension 30 m x 0,25 mm ID mit einer Filmdicke von 0,25 µm. Mit folgendem Temperaturprogramm wurde die Kapillarsäule erwärmt: 2 min bei 70 °C, Erhöhung der Temperatur auf 280 °C mit 25 °C/min und weitere Erhöhung auf 320 °C mit 4 °C/min. Helium war Trägergas bei konstantem Druck von 55 kPa. Interface, Injektor und Ionenquelle wurden konstant bei 280 °C, 290 °C und 180 °C gehalten. Unter EI-Bedingungen betrug die Ionisierungsenergie 70 eV. Unter NICI-Bedingungen betragen die Elektronenenergie 200 eV und der Elektronenstrom 600 µA. Methan diente der chemischen Ionisation in der Ionenquelle bei einem Druck von 65 Pa. Kollisionsgas im zweiten Quadrupol war für GC-Tandem-MS-Messungen Argon mit 0,15 Pa Kollisionsdruck. Die Kollisionsenergie lag bei 25 eV. Zur Detektion der Ionen wurde jeweils eine Spannung von 1-2 kV am Sekundärelektronen-Multiplier angelegt.

#### 3.5.2 GC-MS-System für derivatisierte phenolische Säuren

Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analysen von Tyrosin, 3-Nitrotyrosin, 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure und von mit stabilen Isotopen markierten Analoga wurden mit unter 3.5.1 beschriebenen GC-MS- und GC-Tandem-MS-System durchgeführt. Abweichend hiervon wurde zur gaschromatographischen Trennung eine Kapillarsäule Optima 5-MS der Dimension 30 m x 0,25 mm ID mit einer Filmdicke von 0,25 µm verwendet. Mit folgendem Tempera-

---

turprogramm wurde die Kapillarsäule erwärmt: 2 min bei 80 °C, Erhöhung der Temperatur auf 320 °C mit 25 °C/min und 5 min bei 320 °C. Methan diente der chemischen Ionisation in der Ionenquelle bei einem Druck von 530 Pa. Das Kollisionsgas im zweiten Quadrupol war für GC-Tandem-MS-Messungen Argon mit einem Kollisionsdruck von 0,13 Pa. Die Kollisionsenergie betrug 6 eV.



## 4 Ergebnisse

In diesem Kapitel erfolgt die Präsentation der Ergebnisse gegliedert nach einzelnen thematischen Gruppen. Am Beginn steht jeweils die analytische Methode, auf deren Grundlage die Ergebnisse erzielt werden konnten. Einen Großteil der entwickelten Methoden bilden dabei die quantitativen massenspektrometrischen Methoden, die die Synthese eines internen Standards voraussetzten. Um eine zuverlässige Quantifizierung der Messparameter zu gewährleisten, folgt die Validierung der massenspektrometrischen Methoden in den einzelnen Unterkapiteln. Spezielle und nur einmal verwendete Methoden werden in direktem Zusammenhang mit den durchgeführten Versuchen erläutert. Grundlegende Methoden, die mehrfach verwendet wurden, wurden bereits in Kapitel 3 dargestellt, um Wiederholungen zu vermeiden. Damit der enge thematische Zusammenhang mit den erzielten Ergebnissen aufrechterhalten bleibt, werden diese direkt anschließend erläutert und diskutiert. Eine übergreifende Diskussion und Bewertung der Ergebnisse erfolgt im anschließenden Kapitel 5.

### 4.1 Isoprostane

Zunächst wurde eine analytische Methode zur Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin entwickelt (4.1.1). Nach Untersuchungen zum Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Sandwich-Kultur von Schweinehepatozyten (4.1.2) wird eine quantitative Methode zur Bestimmung des Hautmetaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, vorgestellt (4.1.3). Neben 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sollte sich auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> in biologischen Proben nachweisen lassen. Sowohl eine GC- als auch eine TLC-Methode zur Trennung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> wurden hierfür entwickelt (4.1.4). Die entwickelten Methoden wurden zur Quantifizierung von Isoprostanen in *in vitro*-Ansätzen mit PGH<sub>2</sub>-Synthase (4.1.5), bei *in vivo*-Hemmung der PGH<sub>2</sub>-Synthese (4.1.6) und in klinischen Studien (5.1) eingesetzt. Daneben wurden auch Versuche zur biologischen Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> durchgeführt (4.1.7).

### 4.1.1 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub>

Einen Überblick über die entwickelte GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin gibt das Unterkapitel 4.1.1.1; ein möglicher interner Standard für die massenspektrometrische Quantifizierung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (4.1.1.2). Nicht nur die massenspektrometrische Analytik von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, sondern auch die von anderen Isoprostanen und Prostaglandinen erfolgt bei der sehr sensitiven negativ-chemischen Ionisation. Die NICI-Massenspektren von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und ihren mit stabilen Isotopen markierten Analoga sind daher in einem gemeinsamen Unterkapitel zusammengefasst (4.1.1.3). Nach der Validierung der GC-Tandem-MS-Methode für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (4.1.1.4) wurde die Variation der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den menschliche Urin untersucht (4.1.1.5). Für das Krankheitsbild des Zellweger-Syndroms kommt es zu einem starken Anstieg der urinären Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Dies wird im abschließenden Unterkapitel 4.1.1.6 behandelt.

#### 4.1.1.1 Analytische Methode (Abb. 8)

*Biologische Proben.* Die Sammlung des Urins erfolgte spontan in 2 l-Polypropylen-Gefäßen unter Zusatz von je 1 mM 5-Hydroxy-TEMPO (HTMP) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) als Antioxidantien. Der Urin wurde zu 5 ml aliquotiert und bei – 20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Kreatinin wurde in den Urinproben spektrophotometrisch nach Jaffe *et al.* bestimmt [343]. Die auf der alkalischen Pikrinsäurereaktion basierende Bestimmung wurde automatisiert mit einem Kreatinin-Analyser (Beckman, Galway, Irland) durchgeführt.

*Festphasenextraktion und Derivatisierung.* Zu 5 ml Urin wurden 5 ng 8-iso- [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-PGF<sub>2α</sub> als interner Standard zugesetzt (1 ng/ml). Die Urinproben wurden anschließend mit C<sub>18</sub>-SPE-Kartuschen aufgereinigt (siehe 3.1.1). Zur TLC-Trennung wurden die Proben mit PFB-Bromid verestert (siehe 3.2.1). Die zur Trockene eingeeengten PFB-Ester wurden in 70 µl Ethylacetat aufgenommen und mindestens 12 h bei –78 °C gekühlt. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 g bei 4 °C) wurde der Überstand unter einem N<sub>2</sub>-Strom eingeeengt und mit 20 µl Ethanol aufgenommen.

*Dünnschichtchromatographie.* Zur Trennung der PFB-Ester wurde das unter 3.3.2 beschriebene TLC-System entwickelt. Als Referenzsubstanz wurde der 4-Fluorobenzylester von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ -4FB) ( $R_f = 0,31 \pm 0,01$ ,  $n=5$ ) verwendet. Um eine mögliche Verunreinigung der Proben zu verhindern, wurde der 4-Fluorobenzylester von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  anstelle des PFB-Esters von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  als Referenzsubstanz in der TLC eingesetzt. Unter den genannten Bedingungen zeigten Referenzsubstanz und Analyt identische  $R_f$ -Werte.  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -4FB wurde durch Veresterung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mit 4-Fluorobenzylbromid erhalten (siehe Derivatisierungen, 3.2.2). Die Referenzsubstanz (1  $\mu\text{g}$ ) wurde für jede Silicagel-Platte auf eine separate Bahn neben den biologischen Proben aufgetragen. Im Bereich des  $R_f$ -Wertes der Referenz wurden 0,6-cm breite Banden für jede Probe ausgekratzt, mit 700  $\mu\text{l}$  Ethanol extrahiert (5 min vortexen) und zentrifugiert (30 min, 4000 g).

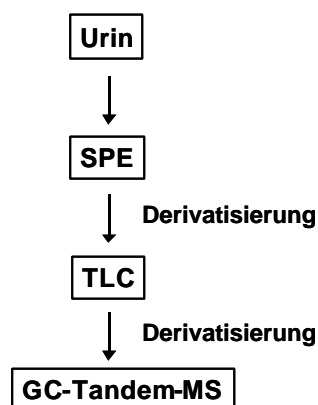


Abb. 8. Schematisches Diagramm der analytischen Methode zur Bestimmung von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  in menschlichem Urin mittels GC-Tandem-MS.

*Derivatisierung und massenspektrometrische Analyse.* Die unter  $\text{N}_2$  getrockneten Proben wurden mit BSTFA zu den TMS-Ethern umgesetzt (siehe 3.2.6). Die Stoßinduzierte Fragmentierung (*collision-activated dissociation*, CAD) der Ionen  $[\text{M} - \text{PFB}]^+$  mit  $m/z$  569 und  $m/z$  573 führte zu den Produktionen mit  $m/z$  299 und  $m/z$  303 für die PFB-TMS-Derivate von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  und 8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ] $\text{PGF}_{2\alpha}$ , welche zur selektiven Messung mit dem unter 3.5.1 beschriebenen GC-MS-System detektiert wurden (*selected-reaction monitoring*, SRM).

#### 4.1.1.2 Interner Standard

Als interner Standard für die massenspektrometrische Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eignen sich mit den stabilen Isotopen <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C oder <sup>18</sup>O markierte Analoga. Während die Markierung mit Deuterium oder <sup>13</sup>C meist nur durch chemische Totalsynthese möglich ist, erlaubt ein von Pickett und Murphy publiziertes Verfahren den Austausch der Sauerstoffatome in aliphatischen und aromatischen Carbonsäuren [344]. Die zunächst für PGF<sub>2α</sub> beschriebene enzymatische Hydrolyse fand für weitere Prostaglandine, Eicosanoide und Leukotriene Anwendung [345,346,347]. Die enzymatische Hydrolyse des Methylesters der Carbonsäure mit einer unspezifischen Esterase wird in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O durchgeführt. Dabei kommt es nicht nur zum Austausch eines Sauerstoffatoms, sondern auch zum Austausch beider Sauerstoffatome (90 % für PGF<sub>2α</sub> [345]). Der Anteil an unmarkiertem Produkt liegt dabei je nach isotopischer Reinheit des eingesetzten H<sub>2</sub><sup>18</sup>O unter 1 %. Daher wurde von Pickett und Murphy vorgeschlagen, dass nicht nur der Methylester, sondern auch die freie Säure als Substrat der Esterase dienen kann [345]. Eine weitere Erklärung bietet die Rückreaktion, bei der die Esterase die Veresterung der bereits ein <sup>18</sup>O-Atom enthaltenden Carbonsäure katalysiert. Möglicherweise spielen die zur Lösung der Carbonsäure beigesetzten nicht unerheblichen Mengen an Alkohol hier eine Rolle. Bei der <sup>18</sup>O-Markierung ist zu beachten, dass sich die mit <sup>18</sup>O markierte Carbonsäure nicht als interner Standard bei nativen Plasmaproben eignet. Es kommt zu einem schnellen Austausch der Sauerstoffatome durch ebenfalls unspezifische Esterasen im Blutplasma [348]. Als interner Standard für die massenspektrometrische Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde zunächst 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (enzymatische Synthese) verwendet und nach kommerzieller Verfügbarkeit 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> (Cayman) [349,350].

*Chemikalien und Reagenzien.* 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde von Cayman, Schweineleberesterase (PLE, EC 3.1.1.1) in 3,2 M Ammoniumsulfat, pH 8, von Sigma und H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (95 Atom % <sup>18</sup>O) von Isotec (Miamisburg, OH, USA) erhalten. Zur Herstellung von Li<sup>18</sup>OH (0,36 M) wurde eine entsprechende Menge Lithium in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O gelöst (weitere Chemikalien im Anhang).

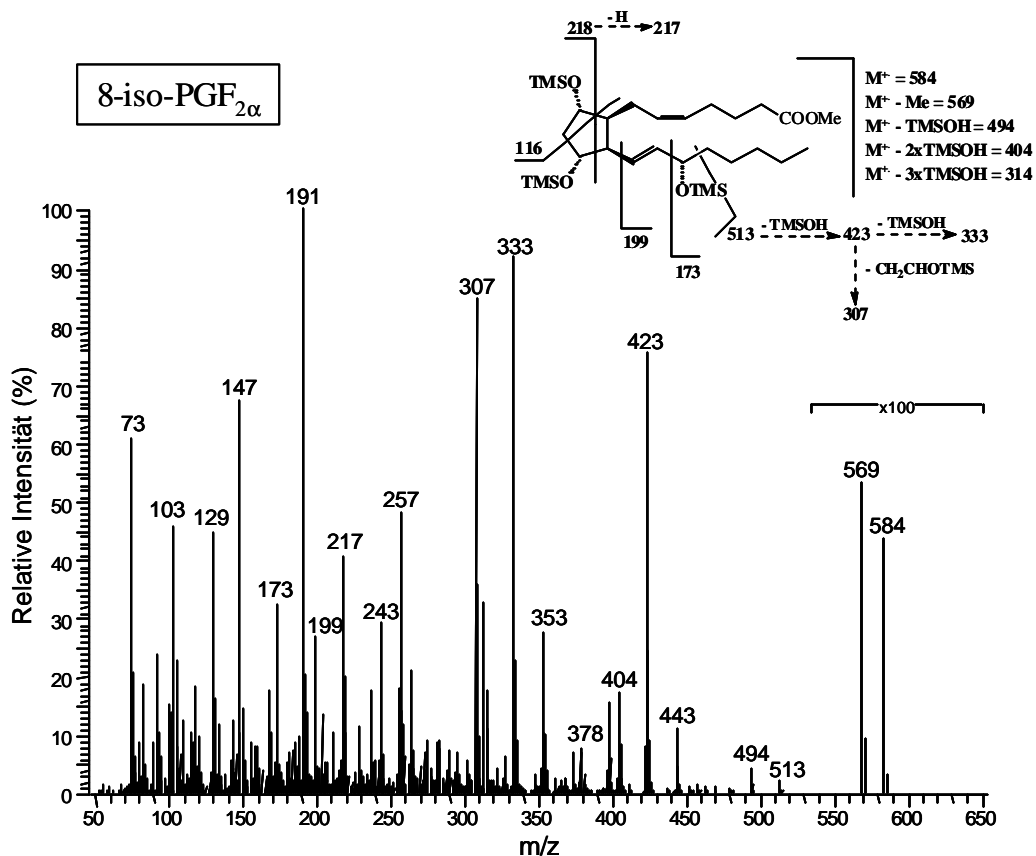
*Enzymatische Synthese von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub>* Zunächst wurde 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (500 µg) dreimal jeweils 5 min bei RT mit 100 µl frisch hergestellter ätherischer Lösung von Diazomethan inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter N<sub>2</sub> eingengt und in 10 µl Ethanol aufgenommen. Ein 200-µl Aliquot der PLE Suspension (1000 U) wurde unter N<sub>2</sub> zur Trockene eingengt und in 300 µl H<sub>2</sub><sup>18</sup>O resuspendiert. Der pH-Wert wurde mit Li<sup>18</sup>OH auf pH 7

eingestellt. Die resuspendierte PLE und das in Ethanol aufgenommene Reaktionsgemisch wurden zusammengegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde mit 5 M HCOOH auf pH 2 bis 3 angesäuert und 1:5 (v/v) mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Reaktionsprodukte wurden über Festphasenextraktion isoliert. Das Reaktionsprodukt wurde in 1 ml Ethanol gelöst (Stammlösung).

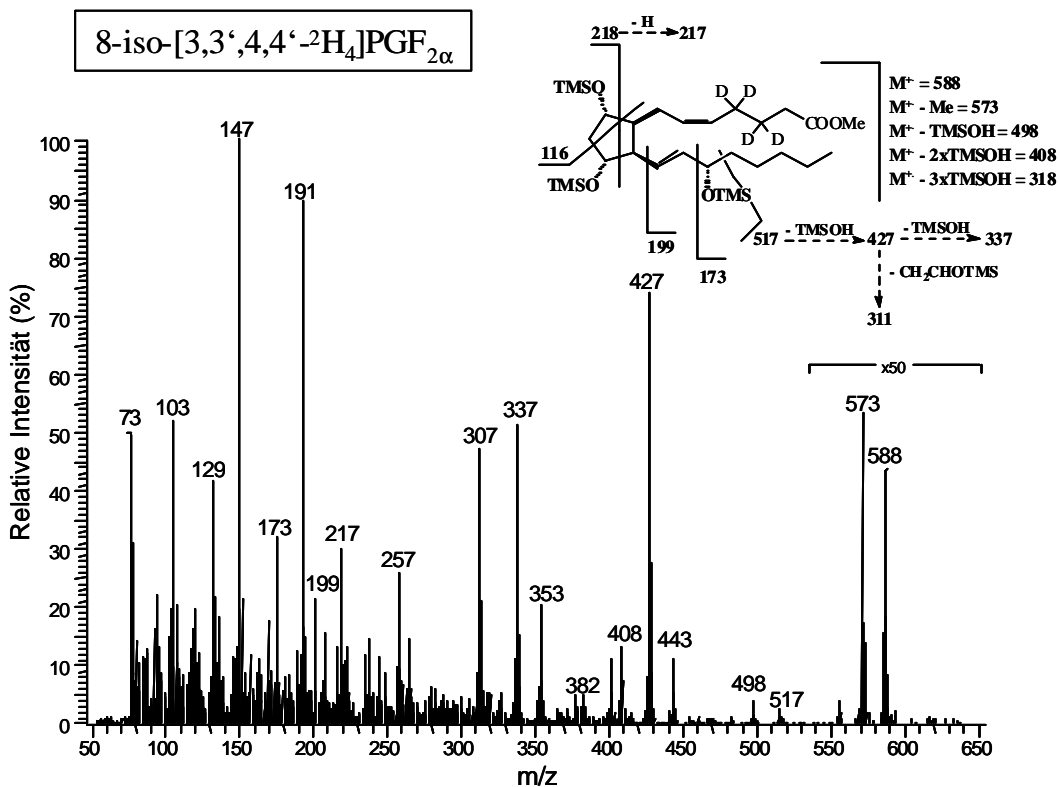
*Massenspektrometrische Charakterisierung des Produktes der enzymatischen Synthese.* Zur massenspektrometrischen Charakterisierung des Produktes der enzymatischen Synthese wurden die EI-Spektren der Methylester (Me)-TMS Ether-Derivate des Produktes der enzymatischen Synthese und zum Vergleich von (15*R*)- und (15*S*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> aufgenommen. Es wurde das GC-MS System für Prostaglandine unter EI- und GC-MS-Bedingungen verwendet (siehe 3.5.1).

Die GS-MS-Analyse des Me-TMS-Derivates des durch enzymatische Synthese erhaltenen <sup>18</sup>O-markierten 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigte nur einen einzigen Peak. Die Retentionszeiten (min) der einzelnen Me-TMS Derivate betragen: 11,98 für (15*S*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 11,99 für (15*R*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 11,95 für 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> und 11,98 für 8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub>. Sowohl 8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> als auch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eluierten zur gleichen Zeit von der GC-Säule. Beide Massenspektren zeigen das Molekulation (M<sup>+</sup>), *m/z* 584 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *m/z* 588 für 8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub>, wobei das *m/z*-Verhältnis für 8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> um 4 Da erhöht ist (Abb. 9). Alle Ionen, die durch Verlust von 1 bis 3 TMSOH-Gruppen entstanden sind, zeigen ebenfalls ein für 8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> um 4 Da erhöhtes *m/z*-Verhältnis. In intensiven Ionen unter *m/z* 307, die noch die Kohlenstoffatome C9, C11 oder C15 enthalten [351,352], finden sich keine <sup>18</sup>O-Atome mehr. Das Produkt des enzymatischen Isotopenaustausches konnte somit eindeutig als 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> identifiziert werden. Die Massenspektren von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> entsprechen denen von PGF<sub>2α</sub> und [1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> [345]. Auch für das Massenspektrum von 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> zeigen die Fragmente über *m/z* 307 ein um 4 Da erhöhtes *m/z*-Verhältnis, entsprechend den schweren Isotopen; es kommt zu keinem Isotopenaustausch in der Carboxyl-Kette [196]. Die Intensität der Fragmente ist geringfügig anders verteilt verglichen mit 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub>. Die Retentionszeit von 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> ist aufgrund des relativ großen Isotopeneffekts von Deuterium verkürzt [353]. Die Massenspektren von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und (15*R*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigten identische Fragmentierung und Intensität der Fragmente (Daten nicht gezeigt).

A



B



(Legende nächste Seite)

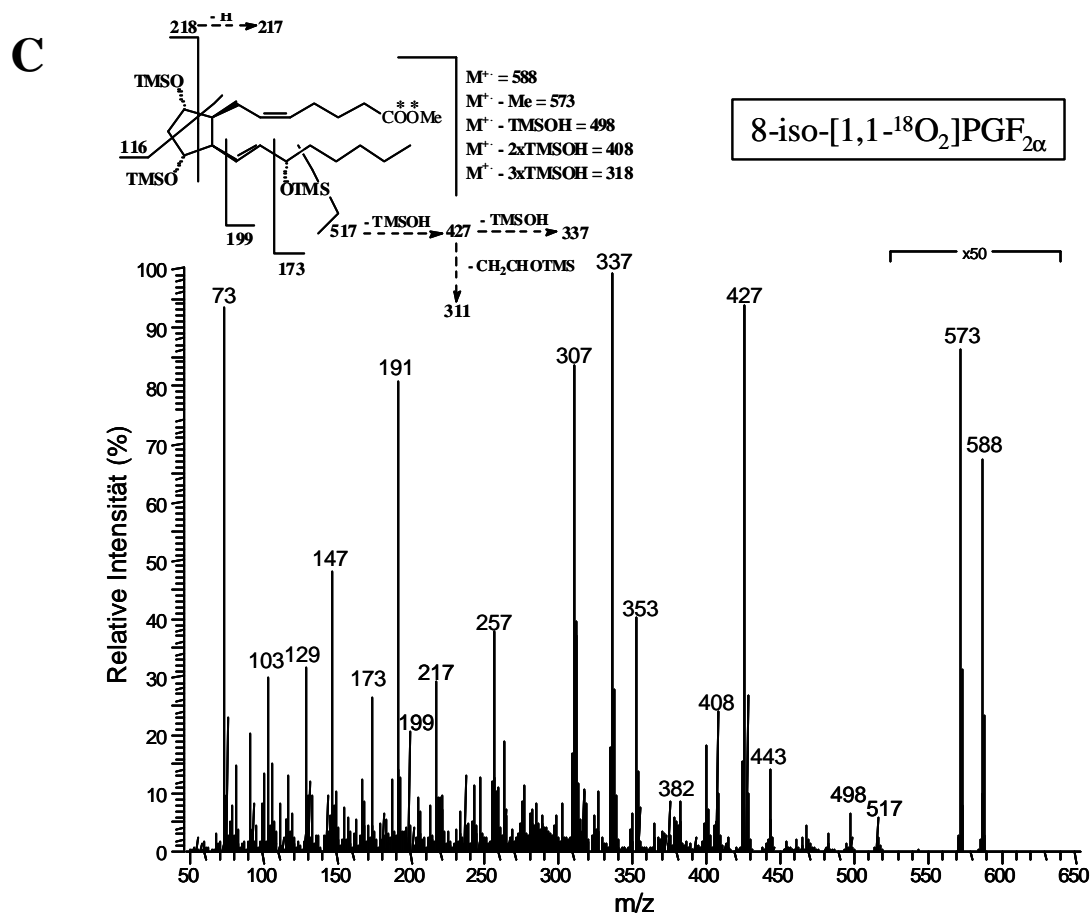


Abb. 9. EI-Massenspektren der Me-TMS-Derivate von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (A), 8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  (B) und 8-iso-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]PGF $_{2\alpha}$  (C). Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV. \* = Markierung der  $^{18}\text{O}$ -Atome, TMSOH = Trimethylsilanol.

*Bestimmung der Ausbeute und der isotopischen Reinheit des Produktes der enzymatischen Synthese.* Zur Bestimmung von Ausbeute und isotopischen Reinheit wurde zum PFB-Ester-TMS-Ether umgesetzt. Es wurde das GC-MS System für Prostaglandine unter NICI- und GC-Tandem-MS-Bedingungen verwendet. Die Ausbeute der enzymatischen Isotopenmarkierung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  wurde bestimmt, indem die erhaltene Stammlösung von 8-iso-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]PGF $_{2\alpha}$  massenspektrometrisch standardisiert wurde. Dazu wurden jeweils 10 ng 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  einer eingewogenen Stammlösung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  mit unterschiedlichen Mengen an 8-iso-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]PGF $_{2\alpha}$  versetzt und zu den entsprechenden PFB-TMS-Ethern umgesetzt (n=2). Zur quantitativen Analyse mit GC-MS wurden im SIM-Modus die Intensität der Ionen [M - PFB] $^+$  mit m/z 569 für 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und m/z 573 für 8-iso-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]PGF $_{2\alpha}$  bestimmt. Die lineare Regression der Peakflächenverhältnisse (SIM von m/z 573 zu m/z 569) (y) und das Verhältnis der eingesetzten Menge von 8-iso-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]PGF $_{2\alpha}$  zu 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (x) ergab eine Gerade der Gleichung:  $y = 0,046 + 0,8575x$  ( $r^2=0,998$ ). Aus der Steigung der Geraden resultierte eine sehr hohe mittlere Gesamtausbeute der Isotopenmarkierung von 85,7 %.

Die isotopische Reinheit von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> wurde durch SIM der Ionen mit  $m/z$  569 für nichtmarkiertes 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie  $m/z$  571 für einfach <sup>18</sup>O-markiertes und  $m/z$  573 für zweifach <sup>18</sup>O-markiertes 8-iso-PGF<sub>2α</sub> bestimmt. Der Anteil an nicht markiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> betrug 2,0 %. Der Anteil an 8-iso-[1,1'-<sup>16</sup>O<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> betrug 17,7 % und der an 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> 80,3 %.

*Zusammenfassung.* Bei der Umsetzung des Methylesters von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit unspezifischer Schweineleberesterase in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O kommt es zum Austausch beider <sup>18</sup>O-Atome der Carboxyl-Gruppe. Die Gesamtausbeute der enzymatischen Isotopenmarkierung ist mit über 85 % sehr hoch. Sie wurde erreicht durch Verwendung eines relativ großen Volumens an H<sub>2</sub><sup>18</sup>O, hohe PLE-Aktivität und einfache Aufreinigung des Produktes. Die vergleichsweise hohe isotopische Unreinheit mit 2 % an nicht <sup>18</sup>O-markiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist auf den <sup>16</sup>O-Gehalt des eingesetzten <sup>18</sup>O-markierten Wassers zurückzuführen [344] und kann daher weiter verbessert werden.

#### 4.1.1.3 NICI-Massenspektren

*Derivate.* Die Massenspektren der Substanzen (15*R*)- und (15*S*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Cayman), *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (Synthese siehe 4.1.3.3) und (15*R*)- und (15*S*)-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Synthese siehe 4.1.3.2) wurden von den entsprechenden PFB-TMS-Derivaten aufgenommen. Dazu wurden jeweils 1 µl-Aliquots der Lösungen der fertigen Derivate in BSTFA (10 ng Substanz/µl BSTFA) splitlos in das GC-MS-System injiziert.

*Gaschromatographie-(Tandem) Massenspektrometrie.* Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Spektren wurden unter NICI-Bedingungen mit dem GC-MS-System für Prostaglandine (siehe 3.5.1) generiert. Die Retentionszeiten (min) der einzelnen PFB-TMS-Derivate betragen: 26,17 für (15*R*)- und (15*S*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 26,09 für 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub>, 26,20 für 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-PGF<sub>2α</sub>, 22,59 für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 22,60 für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> und 22,54 für (15*R*)- und (15*S*)-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>.



Tab. 1. Verteilung der Massenfragmente in den NICI-Spektren verschiedener F<sub>2</sub>-Isoprostane als PFB-TMS-Derivate<sup>a</sup>

| Massenfragment / Verbindung <sup>a</sup>   | 8-iso-PGF <sub>2α</sub> <sup>b</sup> | [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-8-iso-PGF <sub>2α</sub> | [ <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ]-8-iso-PGF <sub>2α</sub> | 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF <sub>2α</sub> | ent-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF <sub>2α</sub> <sup>b</sup> | [ <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ]-ent-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF <sub>2α</sub> |
|--|--------------------------------------|---|--|---|--|--|
| <i>GC-MS-Massenspektren</i>  |                                      |   |  |   |  |  |
| [M – PFB] <sup>–</sup>   | 569 (100)                            | 573 (100)   | 573 (100)  | 543 (100)                                     | 543 (100)  | 547 (100)  |
| [M – PFB – TMSOH] <sup>–</sup>   | 479 (15)                             | 483 (15)  | 483 (14)   | 453 (4)                                       | 453 (3)  | 457 (5)  |
| [M – PFB – TMSOH – (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> ] <sup>–</sup>   | 407 (12)                             | 411 (13)  | 411 (12)   | 381 (6)                                       | 381 (5)  | 385 (5)  |
|  | -                                    | -   | -  | -   | -  | -  |
|  | -                                    | -   | -  | -   | -  | -  |
| <i>GC-Tandem-MS-Massenspektren</i>   |                                      |   |  |   |  |  |
| [P] <sup>–</sup>   | 569 (53)                             | 573 (44)  | 573 (80)   | 543 (8)                                       | 543 (10)   | 547 (14)   |
| [P – TMSOH] <sup>–</sup>   | 479 (8)                              | 483 (11)  | 483 (6)  | 453 (5)                                       | 453 (4)  | 457 (1)  |
| [P – TMS <sup>18</sup> OH] <sup>–</sup>  | -                                    | -   | 481 (8)  | -   | -  | 455 (7)  |
| [P – 2xTMSOH] <sup>–</sup>   | 389 (12)                             | 393 (12)  | 393 (11)   | 363 (4)                                       | 363 (5)  | 367 (5)  |
| [P – TMSOH – TMS <sup>18</sup> OH] <sup>–</sup>  | -                                    | -   | 391 (6)  | -   | -  | 365 (3)  |
| [P – 2xTMSOH – (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> ] <sup>–</sup>   | 317 (14)                             | 321 (17)  | 321 (19)   | 291 (12)                                      | 291 (14)   | 295 (15)   |
| [P – TMSOH – TMS <sup>18</sup> OH – (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> ] <sup>–</sup>                              | -                                    | -   | 319 (5)  | -   | -  | 293 (6)  |
| [P – 3xTMSOH] <sup>–</sup>   | 299 (100)                            | 303 (100)   | 303 (68)   | 273 (100)                                     | 273 (100)  | 277 (45)   |
| [P – 2xTMSOH – TMS <sup>18</sup> OH] <sup>–</sup>  | -                                    | -   | 301 (100)  | -   | -  | 275 (100)  |
| [P – 2xTMSOH – (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> – CO <sub>2</sub> /C <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ] <sup>–</sup> | 273 (37)                             | 277 (20)  | 273 (52)   | 247 (22)                                      | 247 (21)   | 247 (25)   |
| [P – 3xTMSOH – CO <sub>2</sub> /C <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ] <sup>–</sup>  | 255 (62)                             | 259 (52)  | 255 (100)  | 229 (35)                                      | 229 (31)   | 229 (50)   |

<sup>a</sup>Massenfragmente *m/z* (Intensität %) der GC-NICI-Massenspektren der PFB-TMS-Derivate verschiedener F<sub>2</sub>-Isoprostane und ihrer mit stabilen Isotopen markierten Analoga. CAD der Ionen [P]<sup>–</sup> = [M – PFB]<sup>–</sup> für die GC-Tandem-MS-Massenspektren.

<sup>b</sup>Gezeigt sind die Massenspektren von (15*S*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und (15*R*)-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Die (15*R*)- und (15*S*)-Isomere zeigten jedoch keinen Unterschied in der Fragmentierung.

*Ergebnisse und Diskussion.* Die Massenspektren (GC-MS) und die Tochtterspektren (GC-Tandem-MS) von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (PFB-TMS-Derivate) und ihren mit stabilen Isotopen markierten Analoga unter NICI-Bedingungen sind in Tab. 1 wiedergegeben. Als prominente Ionen in den GC-MS-NICI-Massenspektren finden sich  $m/z$  569 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und  $m/z$  573 für 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub>. Der Verlust des PFB-Esters unter NICI-Bedingungen ist typisch für die PFB-TMS-Derivate der Prostaglandine [197]. Die Erhöhung des  $m/z$ -Verhältnisses für 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> gegenüber 8-iso-PGF<sub>2α</sub> um 4 Da trägt den schwereren Isotopen Rechnung. Die PFB-TMS-Derivate der Dinor-dihydro-Verbindungen zeigen eine entsprechende Fragmentierung. Prominente Ionen finden sich bei  $m/z$  543 für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie bei  $m/z$  547 für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub>. Die PFB-TMS-Derivate der beiden Enantiomere von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigen sowohl nahezu identisches chromatographisches als auch massenspektrometrisches Verhalten. Eine Trennung bzw. Unterscheidung ist unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

Die prominenten Ionen  $[P]^- = [M - PFB]^-$  der untersuchten Isoprostane sind mit Argon weiter fragmentiert (CAD) worden. Intensive Produktionen finden sich in den GC-Tandem-MS-NICI-Massenspektren bei  $m/z$  299 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und bei  $m/z$  303 für 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-PGF<sub>2α</sub> (Tab. 1). Dies entspricht dem Verlust der drei TMSOH-Gruppen ( $[P - 3xTMSOH]^-$ ) [193]. Die Fragmentierung von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> unterscheidet sich jedoch von derjenigen des 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub>: Als Fragmente finden sich Produktionen, die sowohl durch den Verlust von TMSOH (90 Da) als auch von TMS<sup>18</sup>OH (92 Da) entstanden sind. So zeigt das GC-Tandem-MS-Spektrum von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> neben dem Fragment  $m/z$  303 ( $[P - 3xTMSOH]^-$ ) auch  $m/z$  301 ( $[P - 2xTMSOH - TMS^{18}OH]^-$ ). Die Intensität der Fragmente ist vergleichbar, jedoch von den gewählten Bedingungen der Kollision mit Argon abhängig. So ist auch das Ion mit  $m/z$  303 als intensivstes Ion bei der CAD von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> gefunden worden [349]. Die PFB-TMS-Derivate der Dinor-dihydro-Verbindungen zeigen eine entsprechende Fragmentierung unter CAD-Bedingungen. Prominente Ionen finden sich bei  $m/z$  273 ( $[P - 3xTMSOH]^-$ ) für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie bei  $m/z$  275 ( $[P - 2xTMSOH - TMS^{18}OH]^-$ ) und  $m/z$  277 ( $[P - 3xTMSOH]^-$ ) für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (Tab. 1). Diese Beobachtungen legen nahe, dass es zu einer Umlagerung der TMS-Gruppe von den

Hydroxyl-Gruppen zur Carboxyl-Gruppe während des CAD-Prozesses kommt. Auch für andere mit  $^{18}\text{O}$ -markierte Eicosanoide zeigt sich eine solche Umlagerung für die Dissoziation der  $[\text{M} - \text{PFB}]^-$  Ionen der PFB-TMS-Derivate (unveröffentlichte Ergebnisse).

#### 4.1.1.4 Validierung der quantitativen Methode

Für die Probenvorbereitung, wird einfache GC-MS zur quantitativen Analyse von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  eingesetzt, wurden bisher neben Immunoaffinitätschromatographie mehrere dünn-schichtchromatographische Verfahren hintereinander durchgeführt oder mit HPLC zur Probenvorbereitung kombiniert [149,208,217,354]. GC-Tandem-MS sollte hier den Vorzug einfacherer Probenvorbereitung bei höherer Akkuratheit bieten. Während Schweer *et al.* eine Kombination von TLC mit HPLC und GC-Tandem-MS vorstellten [150], erlaubt die hier entwickelte und im Folgenden validierte Methode die quantitative Bestimmung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in humanem Urin mit GC-Tandem-MS nach einfacher TLC-Aufreinigung der Proben.

*8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  als interner Standard für 8-iso-PGF $_{2\alpha}$*  Die Eignung von 8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  als interner Standard in der GC-Tandem-MS-Analytik wurde mit einer Verdünnungsreihe überprüft. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (0-200 pg/ $\mu\text{l}$ , n=7) mit jeweils 50 pg/ $\mu\text{l}$  8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  zum PFB-TMS-Derivat umgesetzt. Zur Standardisierung für die GC-Tandem-MS wurden die Ionen mit  $m/z$  299 für 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und  $m/z$  303 für 8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  im SRM-Modus detektiert. Die lineare Regression des gemessenen Peakflächenverhältnisses zwischen  $m/z$  299 und  $m/z$  303 (y) und dem Verhältnis des Analyten zum internen Standard ergab die Regressionsgleichung:  $y = 0,006 + 0,985x$  ( $r=0,999$ ). Die gute Übereinstimmung zwischen gemessenem Peakflächenverhältnis und zugesetztem Mengenverhältnis zeigt die Eignung von 8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  als interner Standard in der GC-Tandem-MS-Analytik von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ .

*Akkuratheit, Präzision, Reproduzierbarkeit, Detektionslimit und Nachweisgrenze der Methode.* Zur Bestimmung der Akkuratheit und Präzision der Methode wurden der gepoolte Urin von drei Probanden verwendet. Als interner Standard wurde jeweils 1 ng/ml 8-iso-[3,3',4,4'- $^2\text{H}_4$ ]PGF $_{2\alpha}$  addiert. Die einzelnen 5 ml-Aliquots wurden mit unterschiedlichen Mengen an 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  versetzt (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 und 2 ng/ml, n=3). Nach Festphasenextraktion wurde zu den PFB-Estern umgesetzt. Anschließend wurden die Proben mit TLC

aufgereinigt. Nach Derivatisierung zu den TMS-Ethern erfolgte die GC-Tandem-MS-Analyse zur Quantifizierung der PFB-TMS-Derivate von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> (SRM der Ionen mit *m/z* 299 und *m/z* 303).

Die basale Exkretion an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> betrug 350 ±77 pg/ml (Proband A, n=3), 440 ±167 pg/ml (Proband B, n=3) und 730 ±25 pg/ml (Proband C, n=3). Die lineare Regressionsanalyse zwischen den gefundenen (*y*) und den zugesetzten Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in ng/ml Urin (*x*) ergab für Proband A die Geradengleichung  $y = 0,368 + 0,958x$  ( $r = 0,997$ ), für Proband B die Gleichung  $y = 0,358 + 0,936x$  ( $r = 0,992$ ) und für Proband C die Gleichung  $y = 0,750 + 1,149x$  ( $r = 0,997$ ). Die mittleren gemessenen Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> für die verschiedenen zugesetzten Mengen an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und deren Standardabweichung (SD) dienten als Berechnungsgrundlage der Präzision und der Akkuratheit der Methode. Die in Tab. 2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass sich die analytische Methode zur Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> durch gute Präzision und Akkuratheit auszeichnet. Die mittlere Präzision liegt bei 6,2 ± 1,3 % (RSD) und die mittlere Akkuratheit der Methode liegt bei 95±3,0 %.

Die instrumentelle Präzision und die Reproduzierbarkeit der Methode wurde mit 5 ml-Aliquots gepoolten Urins überprüft, denen jeweils 1 ng/ml 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> als interner Standard zugesetzt wurden. Alle Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet und mit GC-Tandem-MS quantifiziert. Die instrumentelle Präzision betrug für endogenes 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 97,9 % (n=5). Die Reproduzierbarkeit der Methode lag bei 94 % für Proben, die am gleichen Tag aufgearbeitet wurden (n=3) und bei 93 % für Proben, die an aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet wurden (n=5).

Das Detektionslimit (LOD) für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde durch GC-Tandem-MS-Analyse (1 µl) von Verdünnungen einer Stammlösung des PFB-TMS-Derivates von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in BSTFA ermittelt. SRM des Ions *m/z* 299 zeigte für das PFB-TMS-Derivat von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 20:1 für 250 fg. Bei einer quantitativen Ausbeute würde dieses LOD einer Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> von 5 pg/ml Urin (5 ml) entsprechen.

Tab. 2. Validierung der Methode zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin von Menschen mittels GC-Tandem-MS.<sup>a</sup>

| 8-iso-PGF <sub>2α</sub> zugegeben <sup>b</sup> | Proband A   |                         | Proband B   |                         | Proband C   |                         | Mittel±S.D.             |
|--|---|-------------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
|  | 8-iso-PGF <sub>2α</sub> gemessen abzüglich Basal-konzentration <sup>c</sup> | R.S.D./ Akkuratheit (%) | 8-iso-PGF <sub>2α</sub> gemessen abzüglich Basal-konzentration <sup>c</sup> | R.S.D./ Akkuratheit (%) | 8-iso-PGF <sub>2α</sub> gemessen abzüglich Basal-konzentration <sup>c</sup> | R.S.D./ Akkuratheit (%) | R.S.D./ Akkuratheit (%) |
| 0  | 0   | 4,2/n.a.                | 0   | 5,1/n.a.                | 0   | 9,8/n.a.                | 6,4±3,0/n.a.            |
| 100  | 86  | 7,7/86                  | 92  | 7,1/92                  | 90  | 7,8/90                  | 7,5±0,3/89±3,1          |
| 200  | 202   | 8,1/99                  | 204   | 1,2/98                  | 188   | 7,8/94                  | 5,7±3,9/97±2,6          |
| 500  | 474   | 8,8/95                  | 529   | 4,6/94                  | 504   | 4,5/99                  | 5,9±2,4/96±2,7          |
| 1000   | 1010  | 8,3/99                  | 989   | 6,6/99                  | 1142  | 9,7/86                  | 8,2±1,5/95±7,6          |
| 1500   | 1496  | 3,9/100                 | 1571  | 3,9/95                  | 1543  | 8,1/97                  | 5,3±2,4/97±2,2          |
| 2000   | 2020  | 6,1/94                  | 2050  | 1,1/97                  | 2238  | 5,7/88                  | 4,3±2,8/94±5,1          |
| Mittel±S.D. der R.S.D.                         |   | 6,7±2,0                 |   | 4,2±2,4                 |   | 7,6±1,9                 | 6,2±1,3                 |
| Mittel±S.D. der Akkuratheit (%)                |   | 96±5,2                  |   | 96±2,6                  |   | 92±5,3                  | 95±3,0                  |

<sup>a</sup> Die Methode stellt eine Kombination aus SPE, TLC und GC-Tandem-MS dar. Zur Validierung wurde die Additionsmethode verwendet. Dazu wurden zu 5-ml Aliquots gepooltem Urin von drei Probanden 0 – 2000 pg/ml 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zugesetzt (n=2). Interner Standard war 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> (1 ng/ml). n = 3 für jeden Proband und jede Konzentration.

<sup>b</sup> Alle Konzentrationen in pg/ml Urin.

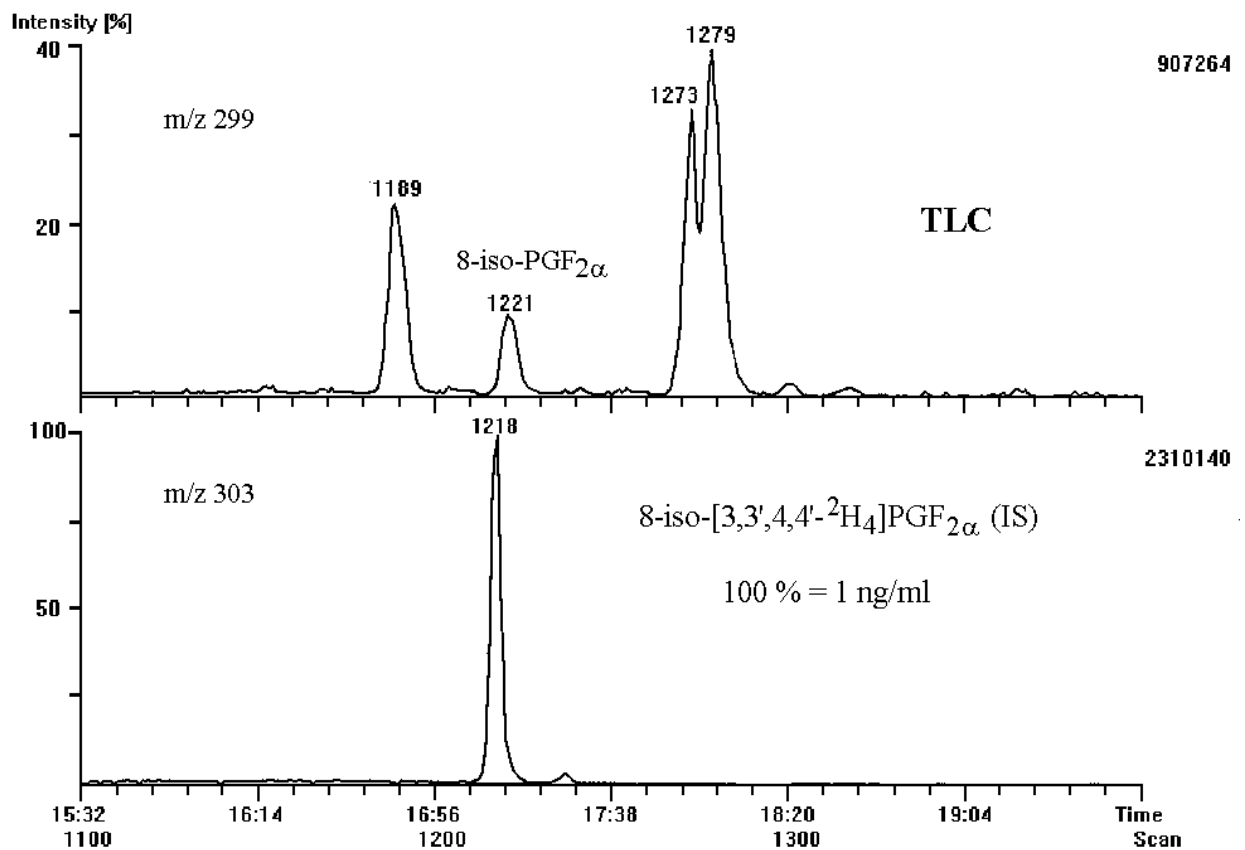
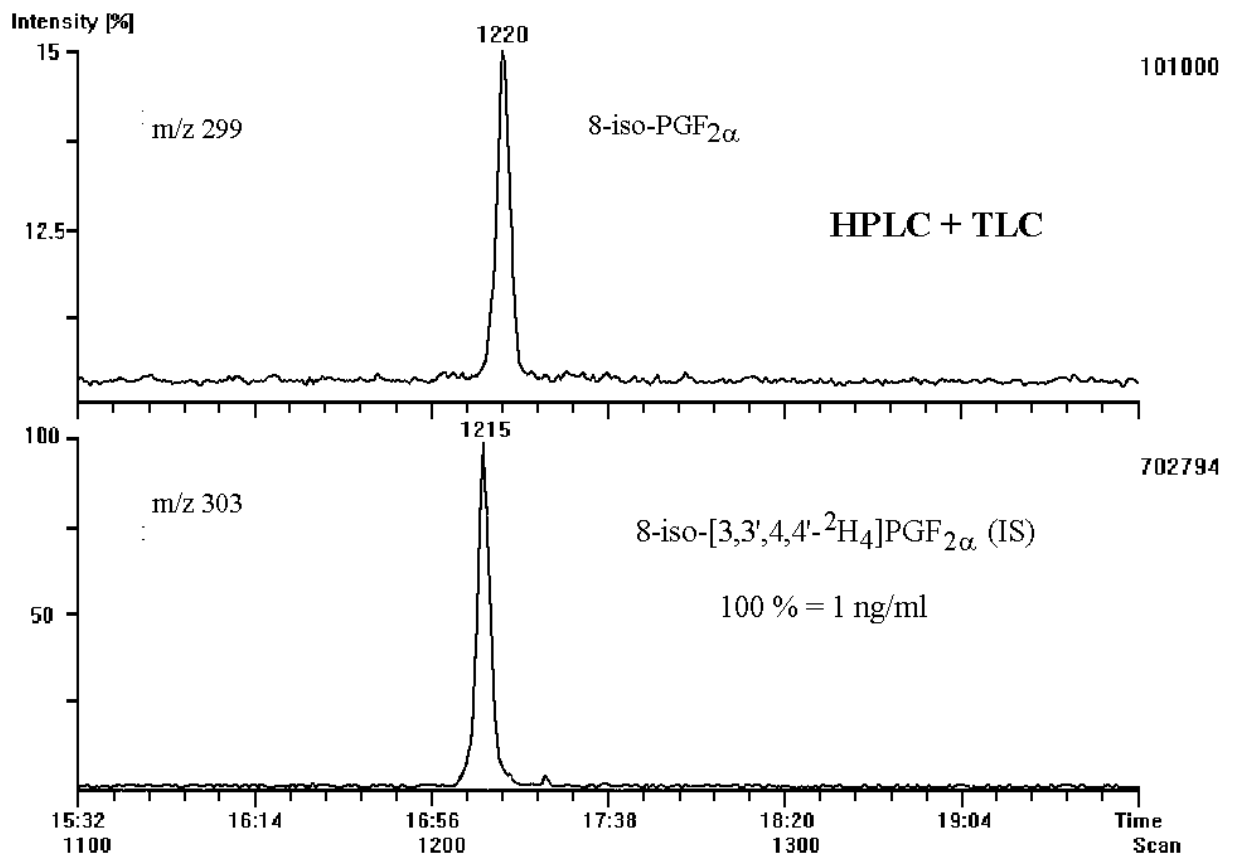
<sup>c</sup> Mittlere Basalkonzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> für Proband A: 350 pg/ml; für Proband B: 440 pg/ml; für Proband C: 730 pg/ml.

*Kombination von HPLC und TLC zur Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin.*

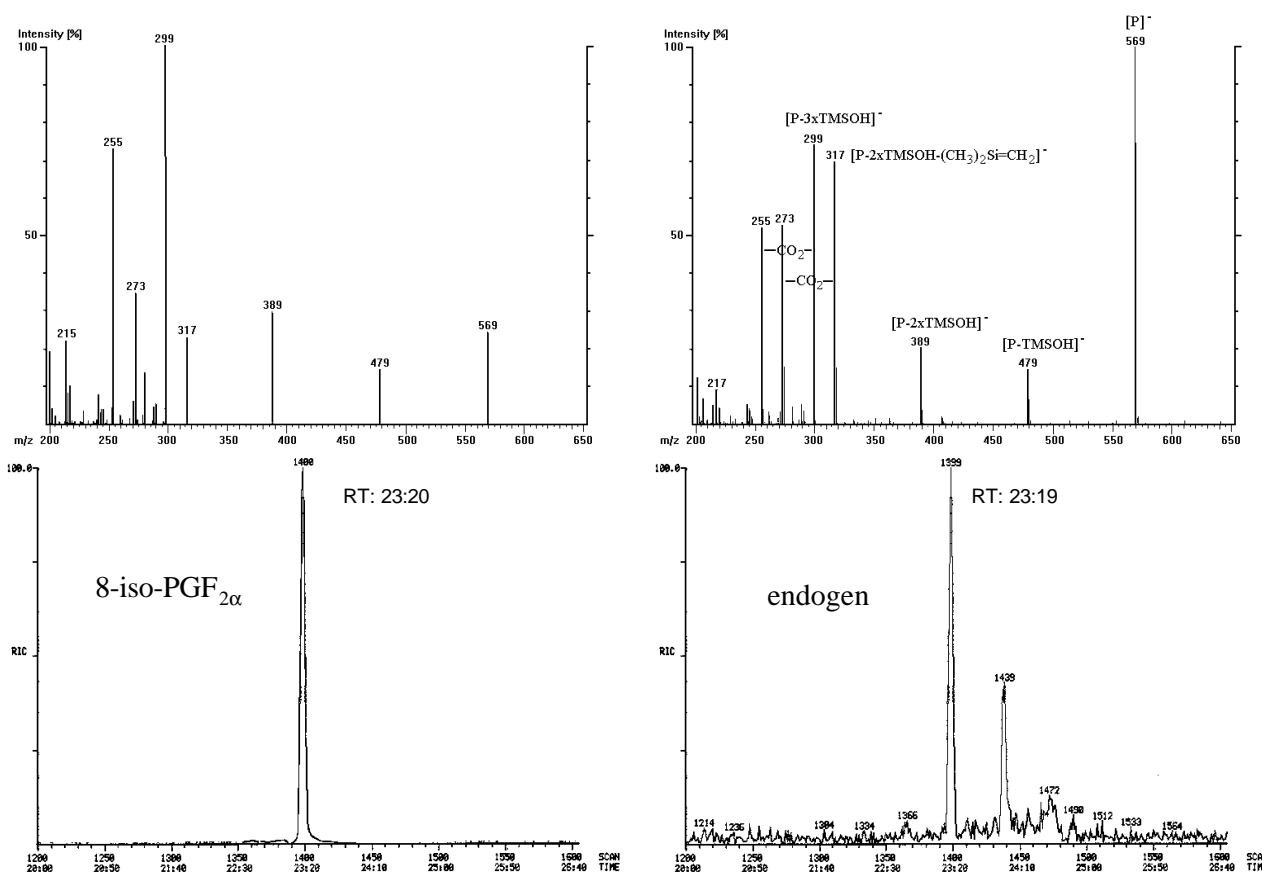
Ein typisches Chromatogramm für die unter 4.1.1.1 beschriebene GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in humanem Urin ist in Abb. 10 (A) gezeigt. Für den internen Standard 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> (SRM von *m/z* 303) zeigt sich ein einziger Peak. Neben einem Peak mit der Retentionszeit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigt das Chromatogramm für die endogene Substanz (SRM von *m/z* 299) jedoch weitere intensive Peaks. Um eine mögliche Interferenz dieser Peaks (Scans 1189, 1273 und 1279) und coeluerender Substanzen bei der quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auszuschließen, wurde 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowohl nach TLC-Aufreinigung als auch nach einer kombinierten Aufreinigung mit HPLC und TLC in gepooltem Urin mittels GC-Tandem-MS quantifiziert (SRM der Ionen mit *m/z* 299 und 303, n=5). Es wurde hierfür das HPLC-System zur Trennung von Prostaglandinen als freie Säuren nach 3.4.1 verwendet. Die Analyse von jeweils 1 µg der freien Säuren ergab folgende Retentionszeiten (min) für dieses HPLC-System: 11,45 ±0,21 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 15,79 ±0,19 für PGF<sub>2α</sub> (n=5). Abb. 10 (B) zeigt das GC-Tandem-MS-Chromatogramm der gleichen Urinprobe wie in Abb. 10 (A), jedoch nach zusätzlicher Aufreinigung des Urins mit HPLC. Die zusätzlichen Peaks im Chromatogramm für das endogene 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (*m/z* 299) sind nach Aufreinigung mit HPLC und TLC nicht mehr nachzuweisen. Das Peakflächenverhältnis zwischen endogenem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (*m/z* 299) und internem Standard (*m/z* 303) bleibt jedoch unverändert. So beträgt die nach TLC-Aufreinigung gemessene Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im gepoolten Urin 148 ±12 pg/ml (n=5), während nach der kombinierten Aufreinigung mit HPLC und TLC 152 ±13 pg/ml 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin mit GC-Tandem-MS gemessen wurden (n=5).

Auf der Basis dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die TLC-Aufreinigung der Urinproben die spezifische quantitative Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin mit GC-Tandem-MS erlaubt. Zusätzlich durchgeführte HPLC-Aufreinigung erhöht nicht die Selektivität der Methode. Die akkurate Quantifizierung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist somit durch einfache TLC-Trennung gewährleistet (vergleiche auch 4.1.3.5).

*Abb. 10. (nächste Seite) GC-Tandem-MS-Analytik von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Gezeigt sind typische Chromatogramme aus der Analyse einer Urinprobe eines gesunden Probanden. SRM der Ionen mit *m/z* 299 für endogenes 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *m/z* 303 für den internen Standard 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> der PFB-TMS-Derivate. Es sind die Chromatogramme der GC-Tandem-MS-Analyse nach TLC (A) und nach HPLC gefolgt von TLC (B) gezeigt.*

**A****B**

*Identifikation von endogenem 8-iso-PGF<sub>2α</sub>* Zur Identifikation des gaschromatographischen Peaks mit der Retentionszeit von synthetischem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde ein Tochtterspektrum der endogenen Substanz aufgenommen. Die in Urinproben von gesunden Probanden enthaltenen Mengen an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> reichten jedoch aufgrund der Nachweisgrenze der Methode nicht zur Aufnahme eines Tochtterspektrums aus. Wie unter 4.1.1.6 noch gezeigt wird, kann es unter pathologischen Umständen zu einer 124-fachen Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den Urin kommen. Diese Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung bei Kindern mit Zellweger-Syndrom machte die Aufnahme eines Tochtterspektrums aus dem nach 4.1.1 aufgearbeiteten Urin möglich. Dazu wurde das Ion  $m/z$  569 durch CAD fragmentiert (Abb. 11, rechts).



**Abb. 11.** CAD NICI-Massenspektren von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Vergleich der GC-Tandem-MS-Tochtterspektren (oben) der PFB-TMS-Derivate von käuflichem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (links) und der endogenen Komponente aus dem Urin eines Kindes mit Zellweger-Syndrom mit der Retentionszeit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (rechts) nach CAD des Ions  $m/z$  569 ( $P^- = [M - PFB]^-$ ). Die GC-Tandem-MS-Chromatogramme (RIC, unten) zeigen die Retentionszeiten der Peaks, die zu den Massenspektren gehören (oben). Zu den Ionen des Tochtterspektrums gehören  $m/z$  479 ( $[P - TMSOH]^-$ ),  $m/z$  389 ( $[P - 2x TMSOH]^-$ ),  $m/z$  317 ( $[P - 2x TMSOH - (CH_3)_2Si=CH_2]^-$ ),  $m/z$  299 ( $[P - 3x TMSOH]^-$ ),  $m/z$  273 ( $[P - 2x TMSOH - (CH_3)_2Si=CH_2 - CO_2]^-$ ) und  $m/z$  255 ( $[P - 3x TMSOH - CO_2]^-$ ).



Abb. 11 (links) zeigt das entsprechende Tochtterspektrum, das durch CAD des Ions  $m/z$  569 des PFB-TMS-Derivates von synthetischem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> erhalten wurde. Die fünf charakteristischen Produktionen des PFB-TMS-Derivates von synthetischem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> finden sich im Tochtterspektrum der endogenen Substanz wieder (Abb. 11, rechts). Damit konnte der Peak mit der Retentionszeit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (23:19 min) in der Urinprobe eines Kindes mit Zellweger-Syntrom eindeutig als 8-iso-PGF<sub>2α</sub> identifiziert werden.

*Dünnschichtchromatographie nach [150].* Als Modifikation der unter 3.3.2 beschriebenen Methode ist auch ohne Kammersättigung gearbeitet worden, um ein Standardgemisch von F<sub>2</sub>-Isoprostanen als PFB-Ester dünn-schichtchromatographisch zu trennen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Ethylacetat/Hexan, 90:10 (v/v). Folgende R<sub>f</sub> –Werte wurden ermittelt: 0,25 für PGF<sub>2α</sub>, 0,19 – 0,23 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 9α,11β-PGF<sub>2α</sub> sowie 0,13 für 9β,11α-PGF<sub>2α</sub>.

*Diskussion.* Bisher sind einige massenspektrometrische Methoden zur Quantifizierung der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Humanurin beschrieben worden [149,150,208,217]. Diese Methoden setzen zur Probenvorbereitung die Kombination von SPE mit HPLC und TLC [208] oder TLC underivatisierter mit anschließender TLC derivatisierter Isoprostane voraus [149]. Eine andere Möglichkeit bietet der Einsatz der Immunoaffinitätschromatographie [217]. Die Verwendung der selektiveren GC-Tandem-MS hat bisher nicht zu einer Verringerung der Probenvorbereitung beigetragen [150]. Im Gegensatz dazu erlaubt die hier entwickelte GC-Tandem-MS-Methode die spezifische und akkurate Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit vereinfachter Probenvorbereitung. Auf eine zusätzliche HPLC-Trennung der Analyten kann verzichtet werden, da sie keine größere Selektivität gewährt. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> konnte eindeutig als Analyt in einer endogenen Probe identifiziert werden. Möglich wird diese Vereinfachung der Probenvorbereitung durch eine höhere Effizienz sowohl der TLC- als auch der GC-Trennung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> von anderen F<sub>2</sub>-Isoprostanen. Die Effizienz TLC-Trennung wird dabei von der Wahl der TLC-Zone beeinflusst. So ist die Trennung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> für eine kleine TLC-Zone (R<sub>f</sub> 0,19-0,23) von anderen F<sub>2</sub>-Isoprostanen erzielbar. Die bei gleichem Elutionsmittel von Schweer *et al.* gewählte breite TLC-Zone (R<sub>f</sub> 0,02-0,16) erfasst eine ganze Reihe von F<sub>2</sub>-Isoprostanen [150]. Auch die GC-Trennung von zumindest einigen F<sub>2</sub>-Isoprostanen ist bei der Wahl einer GC-Säule geeigneter Polarität erreichbar. Anders als GC-Säulen mit geringer Polarität (DB 1, DB 5, DB 5-MS von J & W Scientific oder HP-5MS von Hewlett Packard) erlaubt der Einsatz einer Phase mittlerer Polarität wie z.B. SPB-1701 (Supelco) oder Optima 17 (Macherey-Nagel) die Trennung mehrerer F<sub>2</sub>-

Isoprostane. So konnte ein Gemisch von  $F_2$ -Isoprostanen, bestehend aus 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 9α,11β-PGF<sub>2α</sub> und 9β,11α-PGF<sub>2α</sub>, das auf der SPB-1701 getrennt wurde [201], auf einer HP-5MS nicht vollständig getrennt werden [216]. Die Kombination einer effizienteren TLC- und GC-Trennung macht so eine weitere Probenvorbereitung mit HPLC überflüssig.

#### 4.1.1.5 Variation der 24-Stunden-Ausscheidung

Durch die Standardisierung der Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf den Kreatinin-Gehalt des Urins sollen mögliche tageszeitabhängige Schwankungen in der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> verringert werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Sammlung von 24-Stunden Urinen. Dazu war die Abhängigkeit der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Humanurin von der Tageszeit zu untersuchen.

Die Exkretion von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin wurde bei zwei gesunden Probanden untersucht. Für die Aufreinigung der biologischen Proben vor der Quantifizierung mit GC-Tandem-MS diente die unter 4.1.1.1 beschriebene Methode (TLC). Tab. 3 zeigt die um die glomeruläre Filtrationsrate bereinigten Werte der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Die Verteilung der Tagesausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> über acht verschiedene Zeitpunkte ist in Abb. 12 wiedergegeben.

Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mittleren ausgeschiedenen Menge an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Morgenurin und in 24-Stunden Urin ( $p > 0,05$ ). Auch die mittlere Ausscheidung an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu verschiedenen Zeitpunkten unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen in den Morgenurin oder den 24-Stunden Urin ( $p > 0,05$ ). Diese Ergebnisse werden von Helmersson *et al.* bestätigt [355]. Sowohl die Mittelwerte als auch die Einzelwerte für die in den 24-Stunden Urin ausgeschiedenen Menge an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sind fast identisch mit der mittleren Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu verschiedenen Zeitpunkten. Sie unterscheiden sich kaum von der im Morgenurin ausgeschiedenen Menge an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Tab. 3). Im Gegensatz zu Richelle *et al.* [119] ist allerdings die Verteilung der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> über die Tageszeit nicht einheitlich (Abb. 12). Somit gibt das im Morgenurin bestimmte Verhältnis der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu Kreatinin in guter Näherung die in 24 Stunden glomerulär filtrierte Menge an 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, bezogen auf Kreatinin wieder.

Tab. 3. Mittlere Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> über 24 Stunden bei zwei gesunden Probanden.

| Proband       | 8-iso-PGF <sub>2α</sub> (pmol/mmol Kreatinin)              |                         |           |
|---------------|--|-------------------------|-----------|
|               | Verschiedene<br>Zeitpunkte<br>(Mittel ± S.D.) <sup>a</sup> | Morgenurin <sup>b</sup> | 24-h-Urin |
| 1             | 134 ± 21   | 128                     | 132       |
| 2             | 82 ± 24  | 103                     | 78        |
| Mittel ± S.D. | 108 ± 20   | 116 ± 13                | 105 ± 27  |
| R.S.D. (%)    | 18   | 11                      | 26        |

<sup>a</sup>Alle Angaben für Urin. <sup>b</sup>Gesammelt zwischen 8 und 11 Uhr.

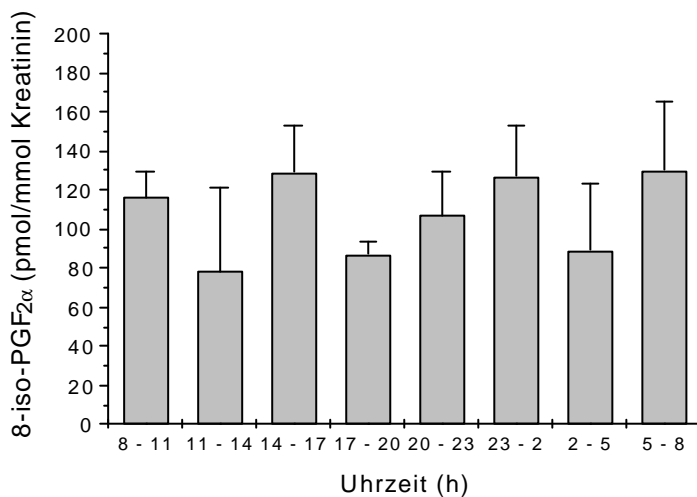


Abb. 12. Verteilung der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin über die Tageszeit bei zwei gesunden Probanden (Mittel ± S.D., n=2)

#### 4.1.1.6 Zellweger-Syndrom

Die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren findet nicht nur in den Mitochondrien statt, sondern auch in den Peroxisomen. Die Enzyme der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation zeigen jedoch eine höhere Affinität zu langkettigen Fettsäuren. Eine Störung der Biogenese der Peroxisomen liegt beim Zellweger-Syndrom (cerebrohepatorenales Syndrom) vor. Die Schwere der Erkrankung führt frühzeitig zum Tod [356]. Sowohl die Produkte des cyclischen Weges des Arachidonsäurestoffwechsels (PGH<sub>2</sub>-Synthase) als auch die des linearen Weges des Arachidonsäurestoff-

wechsels (Lipoxygenasen) werden im Organismus über  $\beta$ - und  $\omega$ -Oxidation in der Leber abgebaut. Bei Patienten mit Zellweger-Syndrom konnten weder die Hauptmetabolite der Prostaglandine PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin) noch des Thromboxans A<sub>2</sub> im Urin gefunden werden [357]. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Metabolite bei gesunden Menschen durch peroxisomale  $\beta$ -Oxidation und mikrosomale  $\omega$ -Oxidation entstehen. Auch das  $\beta$ - und  $\omega$ -Oxidationsprodukt des Leukotriens LTE<sub>4</sub>,  $\omega$ -Carboxy-tetranor-LTE<sub>4</sub>, war im Urin von Zellweger-Patienten nicht nachweisbar [358]. Im Gegensatz dazu konnten PGE<sub>2</sub>, 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , Thromboxan B<sub>2</sub>, LTE<sub>4</sub>, N-Acetyl-LTE<sub>4</sub> sowie die beiden Lipoxygenaseprodukte 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) und 15-HETE im Urin von Kindern mit Zellweger-Syndrom in bis zu 80-fach höheren Konzentrationen gemessen werden [357,358,359].

Die Exkretion von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in den Urin wurde bei fünf Kindern mit Zellweger-Syndrom im Alter zwischen 2 Monaten und 10 Jahren (Mittel  $\pm$  SD: 3,1  $\pm$  3,9 Jahre) und einer Kontrollgruppe (6,4  $\pm$  1,9 Jahre, n=5) untersucht. Die fünf erkrankten Kinder wiesen die klinischen und biochemischen Veränderungen des cerebrohepatorenales Syndroms auf [350,358]. Zur Aufreinigung der biologischen Proben vor der Quantifizierung mit GC-Tandem-MS wurde die unter 4.1.1.1 beschriebene Methode (TLC) verwendet. Die gemessenen Werte für 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in der Gruppe der Kinder mit Zellweger-Syndrom lagen mit 20,2  $\pm$  5,3 nmol/mmol Kreatinin 124-fach über denen der gesunden Kontrollgruppe mit 0,163  $\pm$  0,052 nmol/mmol Kreatinin (n=5) bei vergleichbarer Kreatinin-Ausscheidung in den Urin.

Für Thromboxan B<sub>2</sub> (80-fach), 6-Keto-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (30-fach) und PGE<sub>2</sub> (60-fach) wurden ähnlich erhöhte Werte beschrieben [357]. Die starke Erhöhung der Werte für 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  könnte ebenfalls auf eine verminderte peroxisomale  $\beta$ -Oxidation zurückzuführen sein [350]. Offensichtlich ist das Isoprostan 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in den gleichen katabolischen Stoffwechselweg der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation eingebunden wie die Prostanoiden.

#### **4.1.2 Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub> in der Zellkultur von Schweinehepatozyten**

Bisher ist lediglich der Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in der Kultur von Rattenhepatozyten untersucht worden [157]. Ein neuartiges Verfahren der Sandwich-Kultur von Hepatozyten erlaubt die Nachahmung der *in vivo* gegebenen Lebensbedingungen der kultivierten Zellen

[360]. Der Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde daher in der Sandwich-Zellkultur von Schweinehepatozyten untersucht.

*Isolation der Zellen.* Leberzellen wurden von weiblichen Schweinen mit einem Gewicht von 20 bis 25 kg gewonnen. Die Isolation erfolgte in Abwandlung der von Selgen *et al.* zur Isolation von Leberzellen der Ratte beschriebenen Methode [361]. Zunächst wurde die Leber in situ mit 1 l Ringer-Lactatlösung bei 4 °C perfundiert. Nach Resektion der Leber wurde mit Puffer (8,3 g/l NaCl, 0,5 g/l KCl, 2,4 g/l HEPES) bei 37 °C mit 80 ml/min 30 min perfundiert. Zur Ablösung der Leberzellen wurde anschließend unter Zusatz von Ca<sup>2+</sup> und Collagenase (3,9 g/l NaCl, 0,5 g/l KCl, 2,4 g/l HEPES, 0,7 g/l CaCl<sub>2</sub> und Collagenase Typ IV von Biochrom, Berlin) 18 min mit 70 ml/min bei 37 °C perfundiert. Die Leberkapseln wurden in eiskaltem Puffer (9,9 g/l Hanks Puffer Salz, 2,4 g/l HEPES, 2 g/l BSA) aufgelöst und durch ein Nylonnetz (100 µm) filtriert. Dreimal wurde zentrifugiert (800 rpm, 10 min) und in letztgenanntem Puffer resuspendiert. Die Vitalität der Hepatozyten betrug 90 bis 95 % und wurde mit Trypitan-Blau bestimmt. Bei der Isolation der Hepatozyten aus einer Leber wurden etwa 3x 10<sup>9</sup> Zellen gewonnen.

*Hepatozytenkultur.* Die Primärkultur der Hepatozyten erfolgte zwischen zwei Lagen Kollagen [362,363]. Frisch isolierte Schweinehepatozyten wurden in kollagenbeschichtete 6-Loch-Platten mit einer Zelldichte von 1,5x 10<sup>6</sup> Zellen pro Schale (9,6 cm<sup>2</sup>) oder in Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von 12x 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgebracht. Die 6-Loch-Platten oder Zellkulturflaschen waren zuvor mit 0,5 oder 4 ml Kollagen beschichtet worden. Eine zweite Kollagenschicht wurde nach 1 h aufgebracht. Die Zellen wurden für eine Woche kultiviert.

*Matrix und Medium.* Die Beschichtung mit der Kollagen-Matrix erfolgte nach Elsdale und Bard [364]. Der pH-Wert der Kollagenlösung (1,11 mg/ml) wurde direkt vor der Auftragung mit 10x Dulbecco's modified Eagle's medium (DEMEM) auf pH 7,4 eingestellt. Als Medium wurde Williams E (Biochrom, Berlin) verwendet. Das Medium enthielt zusätzlich 5 % fötales Kälberserum, 9,6 µg/ml Prednisolon, 0,014 µg/ml Glucagon, 0,16 U/ml Insulin, 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin. Der Medienwechsel erfolgte täglich (1 ml pro Schale und 8 ml pro Flasche). Die Zellen wurden bei 37 °C in einer 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre mit 95 %iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

*Metabolismus.* Von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub>, 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub> und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> wurden Stammlösungen folgender Konzentrationen in H<sub>2</sub>O/Ethanol, 8:2 (v/v), ange-  
setzt: 10 µg/µl 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 100 nCi/µl 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub>, 5 µg/µl 8-iso-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>2α</sub>  
und 10 µg/µl 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>. Die mit Medium verdünnten Stammlösungen wurden gegen das  
ursprüngliche Medium ausgetauscht und unterschiedliche Zeiten mit den Hepatozyten inku-  
biert. Die Konzentrationsangaben in den unterschiedlichen Ansätzen ergeben sich unter Be-  
rücksichtigung des jeweiligen Kollagenvolumens. Der Ethanol-Gehalt lag in allen Ansätzen  
unter 0,01 Vol% [365].

*Aufarbeitung der Zellen und Überstände.* Die Zellüberstände wurden 1:1 (v/v) mit Wasser  
verdünnt, mit 10 %iger HCOOH auf pH 2-3 eingestellt und nach 3.1.1 extrahiert. Die Ethyl-  
acetat-Phase wurde bei -80 °C gelagert. Die in der Kollagenschicht eingebetteten Hepato-  
zyten wurden aus dem Kollagenverband wie folgt herausgelöst: 1 ml Kollagenaselösung (1 g/l  
Kollagenase Typ IV Sigma, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 g/l Glucose, 7,15 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,6 g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,08 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, pH 7,5) pro ml Kollagen wurde für 20 min bei 37 °C  
inkubiert. Die erhaltene Lösung wurde mit Puffer (1 g/l Glucose, 7,15 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl,  
0,6 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,08 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, pH 7,5) 1:3 (v/v) verdünnt und anschließend bei  
620 rpm 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in 1 ml Puffer erfolgte  
die Bestimmung der Vitalität der Zellen mit Trypan Blau.

*High-performance liquid chromatography.* Für die Isolierung der Prostaglandine aus den Zell-  
überständen wurde das unter 3.4.1 beschriebene HPLC-System bei einer Flussrate von 1,2 ml/  
min verwendet. Die Detektion erfolgte durch photometrische Absorptionsmessung bei 205 nm  
oder durch Szintillationszählung und Erstellung eines Radiogramms.

*Zellkulturversuche.* Zunächst wurde mit 1,5x 10<sup>6</sup> Zellen der Metabolismus von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>  
in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden jeweils 6 µg 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> mit 1,5x  
10<sup>6</sup> Zellen für 0, 1, 4 und 18 h bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in  
den Kulturansätzen betrug dabei 2 µg/ml Medium. Ein Aliquot (1/20) der Ethylacetat-Fest-  
phasenextrakte der Zellüberstände wurde mit Deuterium markierten Analoga von 6-Keto-  
PGF<sub>1α</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> versetzt und massenspektrometrisch analysiert. Dazu  
wurden 50 ng 6-Keto-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>1α</sub> und 10 ng 2,3-Dinor-6-keto-[3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGF<sub>1α</sub>  
zugesetzt. Die Aufarbeitung der Proben und die anschließende Quantifizierung mit GC-  
Tandem-MS erfolgte wie beschrieben [195].

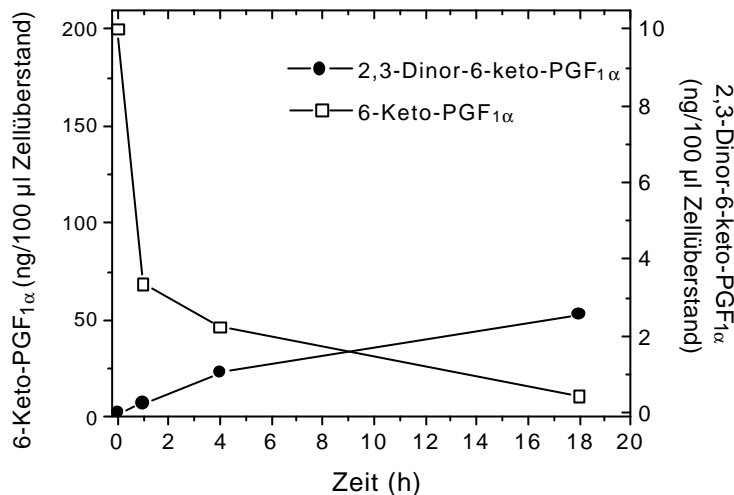


Abb. 13. Zeitlicher Verlauf der Metabolisierung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> (◻) und der Bildung von 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> (●) bei Inkubation von 2 µg/ml Medium 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> mit  $1,5 \times 10^6$  Schweinehepatozyten in Sandwich-Kultur für die angegebenen Zeiten.

Abb. 13 vermittelt den zeitlichen Verlauf der Metabolisierung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> zu 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> durch kultivierte Schweinehepatozyten. Es zeigt sich zunächst ein initial starker Abfall der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration, der sich im weiteren Verlauf abschwächt. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration, der mit der Zeit schwächer wird. Während die Konzentration von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> von initial 2 µg/ml Medium auf 105 ng/ml Medium abfällt, ist ein entsprechender Anstieg der 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration nicht zu verzeichnen. Dies lässt auf die Bildung anderer nicht erfasster Metabolite von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> schließen. Die Aufnahme von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> vollzieht sich schnell, so sind nur noch 35 % der ursprünglichen Menge an 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> nach 1 h im Medium vorhanden. Die Bildung von 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> dauert jedoch länger. Größere Mengen an 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> wurden von den Zellen aufgenommen und auch nach 18 h nicht als 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> ausgeschieden. Möglicherweise konnten sie in der Zelle gespeichert oder anderen metabolischen Wegen zugeführt werden.

*Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>* Nachdem die Kinetik des Metabolismus von Prostaglandinen am Beispiel von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in der Kultur von Schweinehepatozyten gezeigt worden war, wurde der Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden jeweils 6 µg 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zusammen mit 120 nCi 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen für 0, 1, 4, 18 und 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den

Kulturansätzen betrug 2 µg/ml Medium. Die anfängliche Konzentration von 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> in den Kulturansätzen betrug 40 nCi/ml entsprechend 26,5 kcpm/ml Medium und Matrix.

Ein Aliquot (1/5) der Ethylacetat-Festphasenextrakte der Zellüberstände wurde chromatographisch analysiert. Die HPLC-Fractionen wurden 40 min im Abstand von 0,5 min gesammelt und durch Szintillationszählung auf Radioaktivität hin untersucht.

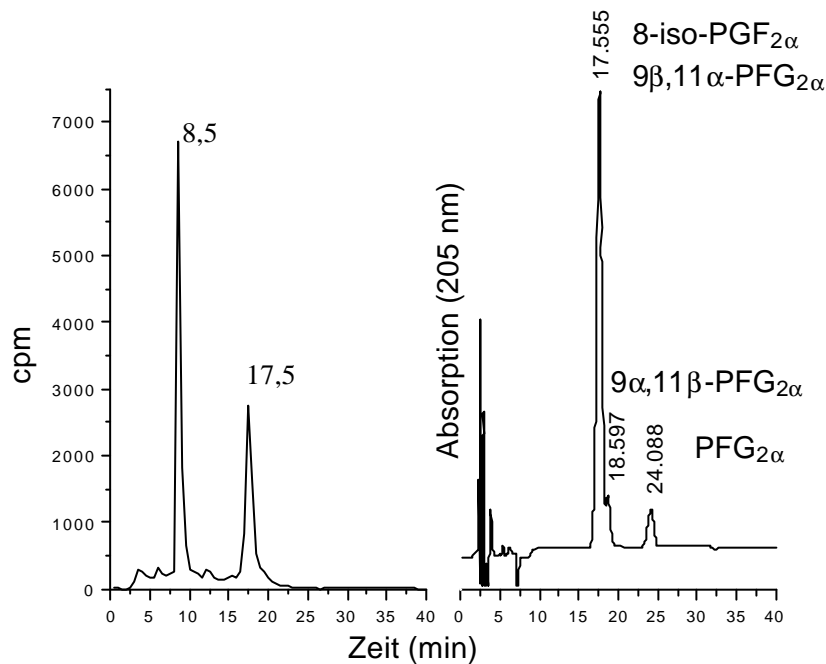


Abb. 14. Radiogramm aus der HPLC-Analyse des Zellüberstandes von  $1,5 \times 10^6$  kultivierten Schweinehepatozyten nach 18-h Inkubation mit einem Gemisch aus 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (links). Es wurden 19,2 kcpm analysiert. Zum Vergleich ist das HPLC-Chromatogramm eines Standard-Gemisches von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 9β,11α-PGF<sub>2α</sub>, 9α,11β-PGF<sub>2α</sub> und PGF<sub>2α</sub> (jeweils 1 µg) gezeigt (rechts). Eluent ist H<sub>2</sub>O/Acetonitril/1-Propanol, 67:21:12 (v/v), 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,5, bei einer Flussrate von 1,2 ml/min. Absorptionsmessung bei 205 nm (rechts).

Das in Abb. 14 dargestellte Radiogramm (links) zeigt neben 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> (17,5 min), welches die gleiche Retentionszeit wie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (rechts) aufweist, eine weitere Verbindung. Diese muss aus 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> hervorgegangen sein, weist dabei jedoch eine kürzere Retentionszeit (8,5 min) im Vergleich zu 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> auf. Die kürzere Retentionszeit impliziert eine höhere Polarität und/oder ein geringeres Molekulargewicht für die in der Hepatozytenkultur entstandene Verbindung. Der zeitliche Verlauf der Bildung der neu entstandenen Ver-



bindung (2,3-Dinor-8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$ , siehe 4.1.2.1) und des Abbaus von 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  sind in Abb. 15 dargestellt.

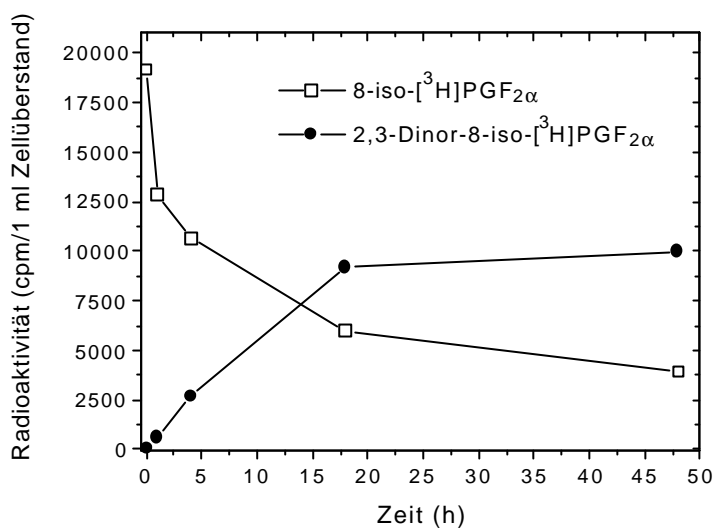


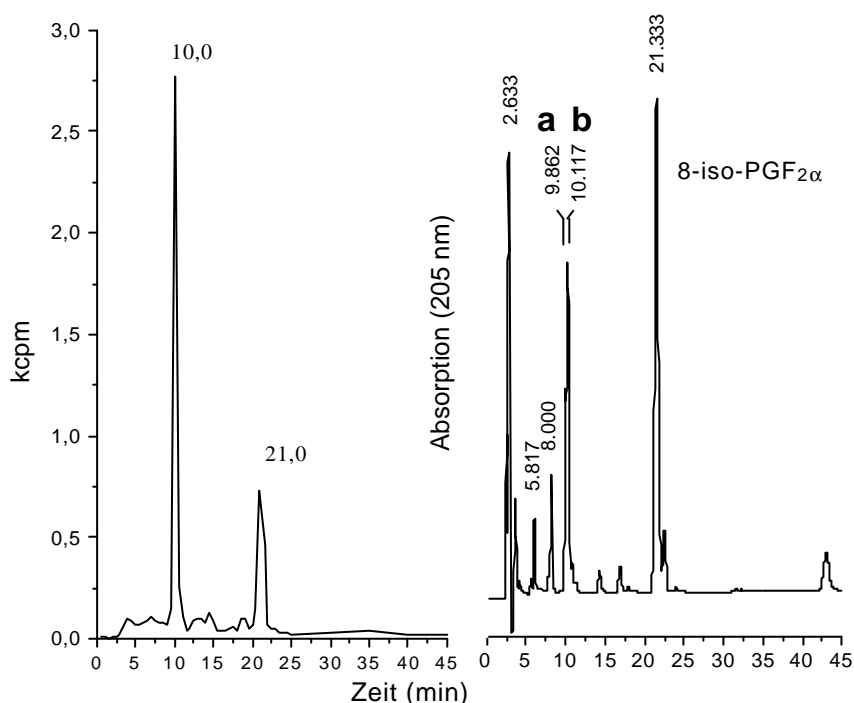
Abb. 15. Zeitlicher Verlauf der Metabolisierung von 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  (◻) und der Bildung von 2,3-Dinor-8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  (●) bei Inkubation von 120 nCi 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  und 6  $\mu\text{g}$  8-iso-PGF $_{2\alpha}$  mit  $1,5 \times 10^6$  Schweinehepatozyten in Sandwich-Kultur. Es wurden 19,2 kcpm analysiert. Die Trennung von 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  und 2,3-Dinor-8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  erfolgte mit dem in Abb. 14 beschriebenen HPLC-System.

Es zeigt sich ein exponentieller Abfall der 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration. Während nach 18 h noch 31 % des ursprünglichen 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  vorhanden sind, verringert sich diese innerhalb der nächsten 20 h lediglich um weitere 10 %. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der 2,3-Dinor-8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration innerhalb der ersten 18 h auf 48 % der initialen 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration. Die Bildung des Metaboliten stagniert bei weiterer Inkubation (48 h). Die Menge des gebildeten Metaboliten liegt in der gleichen Größenordnung wie der Abbau von 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$ . Der untersuchte Metabolit scheint daher der einzig entstandene Metabolit von 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  zu sein.

#### 4.1.2.1 Strukturaufklärung des Metaboliten von 8-iso- $^3\text{H}$ Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in der Zellkultur von Schweinehepatozyten

*Schweinehepatozytenkultur.* Zur Strukturaufklärung des Metaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  wurden größere Mengen von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in einem größeren Ansatz von Schweinehepatozyten metabolisiert. Dazu wurden  $12 \times 10^6$  Zellen 18 h mit 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (48  $\mu\text{g}$ ) allein und mit 8-iso-

PGF<sub>2α</sub> (48 µg) und 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> (960 nCi) zusammen inkubiert. Die Konzentration von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Kulturansätzen betrug jeweils 2 µg/ml Medium. Die Konzentration von 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> in den Kulturansätzen betrug 40 nCi/ml entsprechend 26,5 kcpm/ml in Medium und Matrix. Nach 18 h Inkubation fanden sich noch 25,5 kcpm/ml Medium. Dies entspricht 96 % der ursprünglichen Radioaktivität. Bei der Festphasenextraktion des Zellüberstandes (3.1.1) entfielen 114 cpm/100 µl Medium auf den Durchlauf und die Waschphase und 1940 cpm/100 µl Medium auf das Eluat. Damit entfallen 5 % der nach 18 h im Medium verbliebenen Radioaktivität auf niedermolekulare, polare und nicht retenierende Metabolite von 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub>. 76 % der Radioaktivität eluierten als 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> und Metabolit.



*Abb. 16.* Radiogramm aus der HPLC-Analyse des Zellüberstandes von  $12 \times 10^6$  kultivierten Schweinehepatozyten nach 18 h Inkubation mit 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (links). Es wurden 6,4 kcpm analysiert. Die rechte Graphik zeigt zum Vergleich das HPLC-Chromatogramm eines Gemisches von (a) 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, (b) 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (jeweils 1 µg). Eluent ist H<sub>2</sub>O/Acetonitril/1-Propanol, 67:21:12 (v/v), 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,5, bei einer Flussrate von 1,2 ml/min. Es wurde eine Vorsäule verwendet. Absorptionsmessung bei 205 nm (rechts).

Das in Abb. 16 dargestellte Radiogramm (linke Graphik) der HPLC-Analyse des Zellüberstandes nach 3.4.1 zeigt neben 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> (21 min), welches die gleiche Retentionszeit wie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> aufweist (21,3 min, rechte Graphik), eine weitere Verbindung mit einer Retentionszeit von 10 min. Diese muss aus 8-iso-[<sup>3</sup>H]PGF<sub>2α</sub> hervorgegangen sein und weist eine

kürzere Retentionszeit als 8-iso- $[\text{}^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$  auf. Die Retentionszeit des in der Kultur von Schweinehepatozyten entstandenen Metaboliten (linke Graphik) ist vergleichbar mit der Retentionszeit von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (9,9 min) bzw. 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (10,1 min, rechte Graphik), die praktisch coeluierten. Nach 18 h liegen noch 23 % des ursprünglichen 8-iso- $[\text{}^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$  unverändert vor. Im Vergleich zum Ansatz mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen erfolgt der Abbau von 8-iso- $[\text{}^3\text{H}]\text{-PGF}_{2\alpha}$  im Ansatz mit größerer Zellzahl schneller.

Die Inkubationsansätze mit  $12 \times 10^6$  Schweinehepatozyten, die mit 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  versetzt worden waren, wurden zur Strukturaufklärung des Metaboliten eingesetzt. Zur Aufreinigung wurden nach SPE (3.1.1) die freie Säure mit HPLC (3.4.1) isoliert. Zur Aufnahme der EI-Spektren folgte als weiterer chromatographischer Trennungsschritt die TLC nach 3.3.1. Folgende  $R_f$ -Werte ergaben sich:  $0,23 \pm 0,01$  für 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  ( $n = 2$ ),  $0,21 - 0,25$  für 8-iso- $[\text{}^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$  (6 mm breite Bande),  $0,12 - 0,17$  für 2,3-Dinor-8-iso- $[\text{}^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$  (6 mm breite Bande) und  $0,28 \pm 0,01$  für PGF $_{2\alpha}$  ( $n = 2$ ). Es wurden 5  $\mu\text{g}$  8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und PGF $_{2\alpha}$  sowie 10 kcpm 8-iso- $[\text{}^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$  analysiert. Der  $R_f$ -Wert des Metaboliten ließ sich durch die Analyse von 10 kcpm mit Tritium markiertem Metaboliten ermitteln.

*EI-Massenspektroskopie.* Die EI-Spektren wurden von den Me-TMS-Derivaten von *ent*-2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (Dr. Thierry Durand, Faculty of Pharmacy, Montpellier, France) und von dem Metaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in der Zellkultur von Schweinehepatozyten mit dem unter 3.5.1 beschriebenen GC-MS-System aufgenommen. Die Retentionszeit (min) der Me-TMS-Derivate betrug: 10,99 für *ent*-2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und 11,00 für den Metaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ .

Die GS-MS Analyse des Me-TMS-Derivates des in der Schweinehepatozytenkultur erhaltenen Metaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  wies nach der aufwendigen Aufreinigung nur einen einzigen Peak auf (Daten nicht gezeigt). Der Metabolit von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  eluiert zur gleichen Zeit von der GC-Säule wie *ent*-2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$ . Beide Massenspektren zeigen das gleiche Molekülion ( $\text{M}^+$ ) bei  $m/z$  556 für 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  (Abb. 17). Alle Ionen, die durch Verlust von TMSOH-Gruppen entstanden sind, zeigen ebenfalls identische  $m/z$ -Verhältnisse. Das Ion mit  $m/z$  541, das aus dem Molekülion durch Verlust der Methyl-Gruppe entstanden ist, findet sich ebenfalls in beiden Massenspektren. Somit handelt es sich bei dem Metaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in der Schweinehepatozytenkultur um 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$ .

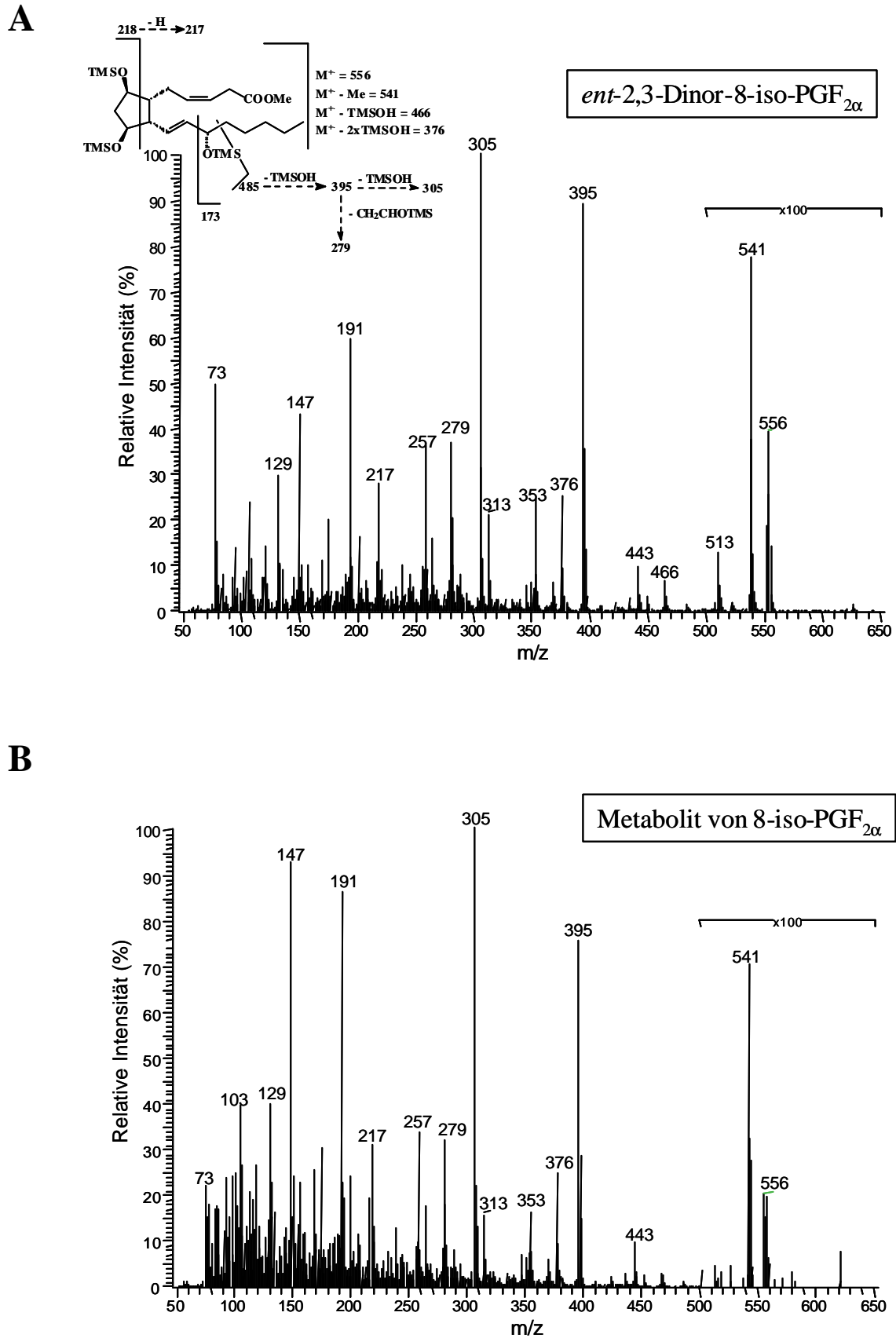


Abb. 17. EI-Massenspektren der Me-TMS-Derivate von (A) *ent*-2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und (B) des Metaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Zellkultur von Schweinehepatozyten. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV. TMSOH, Trimethylsilanol.

Das Massenspektrum des Metaboliten entspricht dem von C. Chiabrando *et al.* publizierten EI-Massenspektrum für 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> aus der Zellkultur von Rattenhepatozyten [157]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte neben 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin von Menschen nachweisen. L. J. Roberts *et al.* konnten zeigen, dass es sich bei 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> um den Hauptmetaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin handelt [156]. Daher, obwohl 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Sandwich-Kultur von Schweinehepatozyten als Metabolit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> identifiziert werden konnte, wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin entwickelt. Diese wird nachfolgend vorgestellt.

### 4.1.3 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub>

Einen Überblick über die entwickelte GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin gibt das Unterkapitel 4.1.3.1. Nach der Synthese des internen Standards *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (4.1.3.2 und 4.1.3.3) folgt die Validierung der GC-Tandem-MS-Methode für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (4.1.3.5). Im nachfolgenden Unterkapitel 4.1.3.6 wird ein Vergleich der GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analytik von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> durchgeführt. Unterkapitel 4.1.3.7 gibt Auskunft über die mit den entwickelten Methoden 4.1.1.1 und 4.1.3.1 im menschlichen Urin bestimmten Basalwerte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und anderen Dinor-dihydro-Metaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

#### 4.1.3.1 Analytische Methode

*Biologische Proben.* Die Sammlung des Urins erfolgte wie für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> beschrieben (4.1.1.1).

*Festphasenextraktion und Derivatisierung.* Zu 5 ml Urin wurden 10 ng *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> als interner Standard zugesetzt (2 ng/ml). Die Urinproben wurden anschließend mit C<sub>18</sub>-SPE-Kartuschen nach 3.1.1 extrahiert. Der PFB-Ester des Analyten wurde zur Trockene eingengt, in 70 µl Ethylacetat aufgenommen und mindestens

12 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 g bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand unter einem  $\text{N}_2$ -Strom eingengt und mit 20  $\mu\text{l}$  Ethanol aufgenommen.

*Dünnschichtchromatographie.* Die Trennung der PFB-Ester erfolgte mit dem unter 3.3.2 beschriebenen TLC-System. Als Referenzsubstanz wurde der Methyl ester von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-Me}$ ) ( $R_f = 0,26 \pm 0,01$ ,  $n=5$ ) verwendet. Unter den genannten Bedingungen zeigten Referenzsubstanz und Analyt identische  $R_f$ -Werte.  $\text{PGF}_{2\alpha}\text{-Me}$  wurde durch Methylierung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mit Diazomethan erhalten (siehe 3.2.3). Die Referenzsubstanz wurde für jede Silicagel-Platte auf eine separate Bahn neben den biologischen Proben aufgetragen. Im Bereich des  $R_f$ -Wertes der Referenz wurden 0,6-cm breite Banden für jede Probe ausgekratzt, mit 700  $\mu\text{l}$  Ethanol extrahiert (5 min vortexen) und zentrifugiert (30 min, 4000 g).

*Derivatisierung und massenspektrometrische Analyse.* Die unter  $\text{N}_2$  getrockneten Proben wurden mit BSTFA (100  $\mu\text{l}$ ) zum TMS-Ether umgesetzt. CAD der Ionen mit  $m/z$  543 und  $m/z$  547 führte zu den Produktionen mit  $m/z$  273 und  $m/z$  277 für die PFB-TMS-Derivate von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  und *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ] $\text{PGF}_{2\alpha}$ , welche im SRM-Modus mit dem unter 3.5.1 beschriebenen GC-MS-System detektiert wurden.

#### 4.1.3.2 Synthese von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin $F_{2a}$

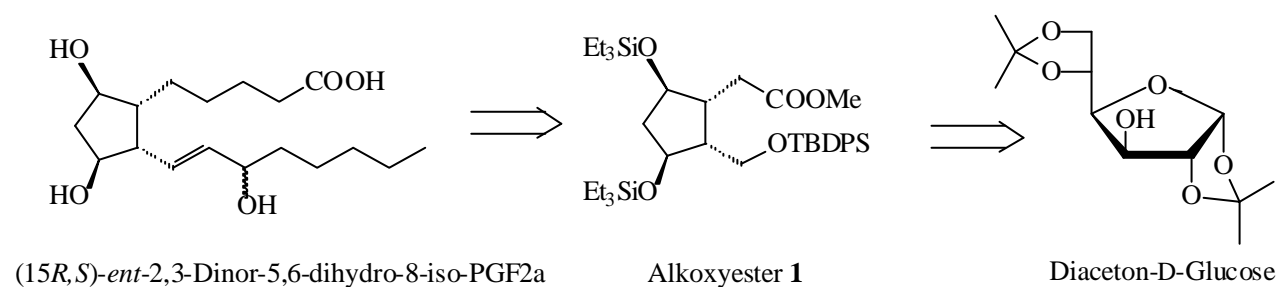


Abb. 18. Schematisches Diagramm der Retrosynthese von  $(15R,S)\text{-ent-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF}_{2\alpha}$ . TBDPS = Tertiärbutyldiisopropylsilyl.

Das Enantiomer von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  ist durch Totalsynthese aus Diaceton-D-Glucose zugänglich [366]. Die stereoselektive Synthese von  $(15R)$ - und  $(15S)$ -*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  verläuft über den Alkoxyester **1** (Abb. 18). Alkoxyester **1** wurde über eine neunstufige Synthese bei einer Gesamtausbeute von 27 % erhalten.

Beide Enantiomere von (*ent*)-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurden aus Alkoxyester **1** über 10 Zwischenstufen mit einer Gesamtausbeute von 32 % erhalten. Durch Methylierung der Säurefunktion von (15*R*)- und (15*S*)-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit Diazomethan konnten die beiden Enantiomere chromatographisch voneinander getrennt werden. Die Trennung erfolgte mit Flash-Chromatographie über Silicagel mit Cyclohexan/Ethylacetat, 30:70 (v/v).

#### 4.1.3.3 Interner Standard

Im Gegensatz zu 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zur Zeit kein deuteriertes Analogon verfügbar. Der enzymatische Isotopenaustausch der Sauerstoffatome der Carboxyl-Gruppe des über Totalsynthese zugänglichen *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> bietet daher einen einfachen und eleganten Weg, einen geeigneten internen Standard zu gewinnen [367].

*Enzymatische Synthese von ent-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2a</sub>* Zunächst wurde *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (200 µg) mit Diazomethan zum Methylester umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter N<sub>2</sub> eingeeengt und in 10 µl Ethanol aufgenommen. Ein 200-µl Aliquot der PLE Suspension (1000 U) wurde unter N<sub>2</sub> eingeeengt und in 300 µl H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (99 Atom % <sup>18</sup>O von Campro Scientific, Berlin) resuspendiert. Der pH-Wert wurde mit Li<sup>18</sup>OH auf pH 7,5 eingestellt. Die resuspendierte PLE und das in Ethanol aufgenommene Reaktionsgemisch wurden zusammengegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation ist das Produkt der enzymatischen Synthese mit Festphasenextraktion nach 3.1.1 aufgereinigt und mit dem HPLC-System für Prostaglandine als freie Säuren (siehe 3.4.1) isoliert worden. Das aufgereinigte Produkt wurde in 1 ml Acetonitril gelöst und bei – 78 °C gelagert (Stammlösung).

*Massenspektrometrische Charakterisierung des Produktes der enzymatischen Synthese.* Es wurden die EI-Spektren der Me-TMS-Derivate des Produktes der enzymatischen Synthese und zum Vergleich von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Cayman) sowie (15*S*)- und (15*R*)-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> aufgenommen. Es wurde das GC-MS-System für Prostaglandine unter EI- und GC-MS-Bedingungen verwendet (siehe 3.5.1).

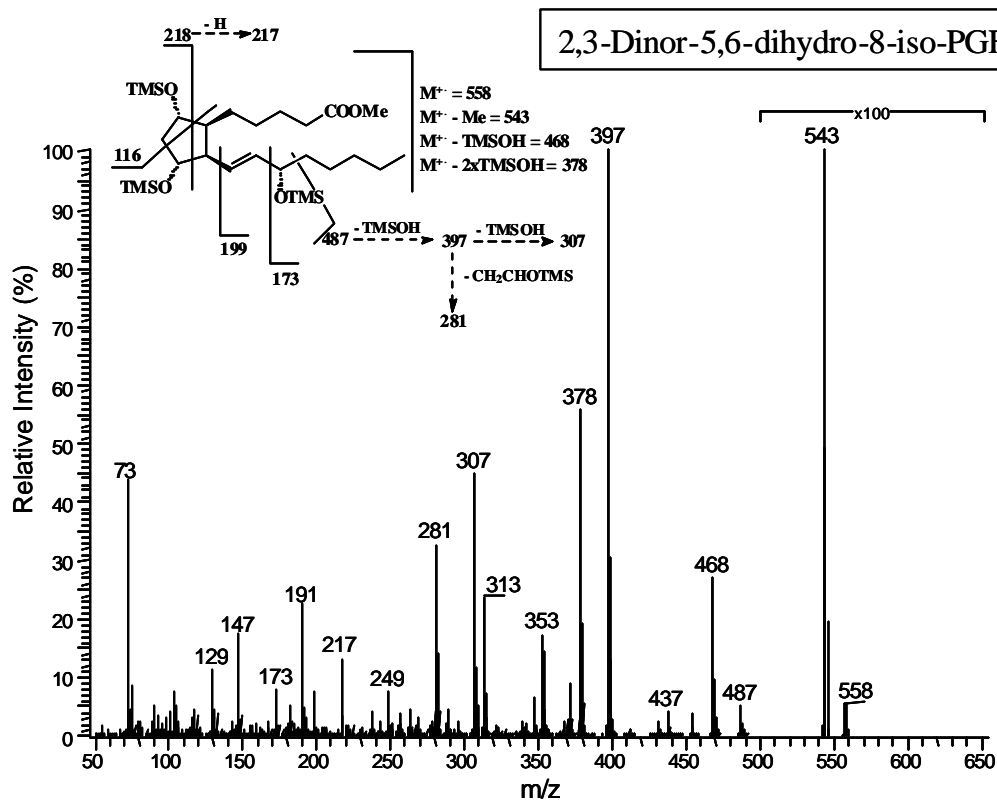
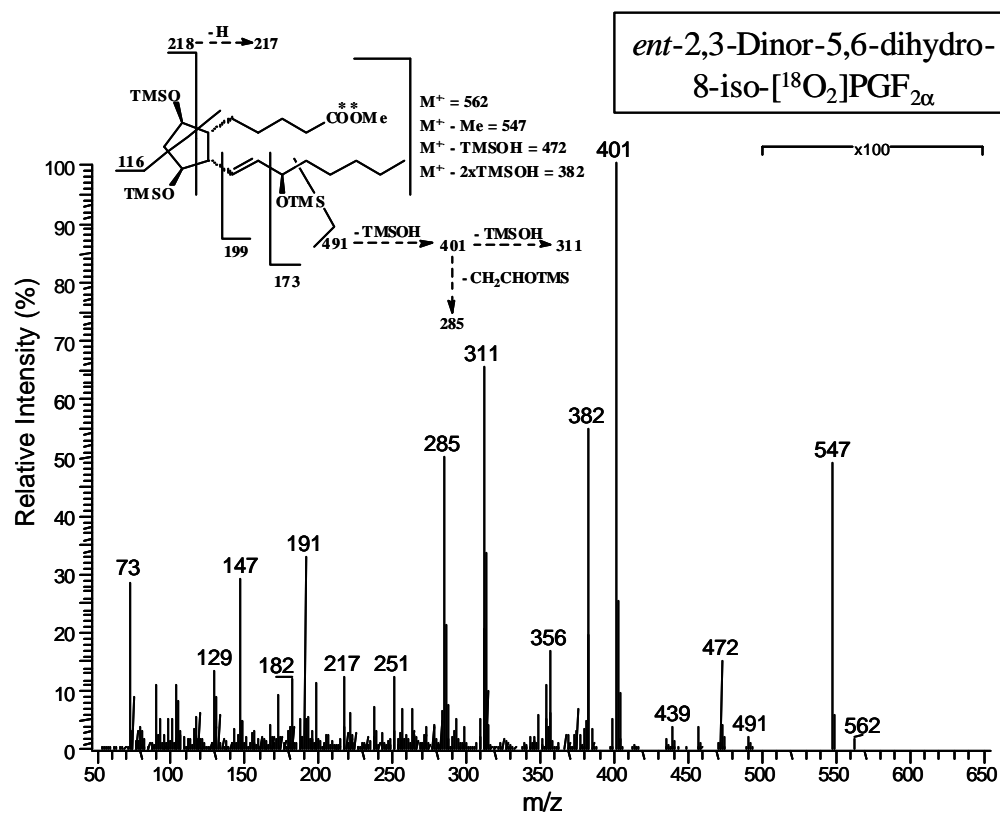
**A****B**

Abb. 19. EI-Massenspektren der Me-TMS-Derivate von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (A) und *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (B). Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV. Für (B): \*-Markierung der <sup>18</sup>O-Atome.



Die GS-MS-Analyse des Me-TMS-Derivates des erhaltenen *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> zeigte nach HPLC-Aufreinigung nur einen einzigen Peak. Die Retentionszeiten (min) der Me-TMS-Derivate betragen: 10,98 für (15*S*)-, (15*R*)-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 10,97 für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub>. Sowohl *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> als auch 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> eluierten zur gleichen Zeit von der GC-Säule. Eine Differenz von jeweils 4 Da zeigen die Molekülonen M<sup>+</sup> (*m/z* 558 und 562), die Fragmentionen [M – 90]<sup>+</sup> (*m/z* 468 und 472), [M – 90 – 71]<sup>+</sup> (*m/z* 397 und 401), [M – 2x90]<sup>+</sup> (*m/z* 378 und 382) und [M – 2x90 – 71]<sup>+</sup> (*m/z* 307 und 311) sowie die Ionen mit *m/z* 281 und 285 (Abb. 19). In Ionen unter *m/z* 249 finden sich keine <sup>18</sup>O-Atome mehr. Das Produkt des enzymatischen Isotopenaustausches konnte somit eindeutig als *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-PGF<sub>2α</sub> identifiziert werden. Die charakteristischen Ionen von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, die die Carboxyl-Kette enthalten (z.B. M<sup>+</sup>, [M – 90]<sup>+</sup> und [M – 90 – 71]<sup>+</sup>), zeigen ein um 2 Da erniedrigtes *m/z*-Verhältnis im Vergleich zu 2,3-Dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (4.1.2.1). Das Massenspektrum von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> entspricht dem von L. J. Roberts *et al.* für den Hauptmetaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Humanurin publizierten Massenspektrum [156]. Die Massenspektren von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie von (15*R*)- und (15*S*)-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigen identische Fragmentierung und Intensität der Fragmente (Daten nicht gezeigt). Die Elutionszeiten von der GC-Säule unter den gewählten Bedingungen sind ebenfalls identisch, so dass eine Trennung nicht möglich ist.

*Bestimmung der Ausbeute und der isotopischen Reinheit des Produktes der enzymatischen Synthese.* Die synthetisierte Verbindung wurde zum PFB-TMS-Derivat umgesetzt. Es wurde das GC-MS System für Prostaglandine unter NICI- und GC-Tandem-MS-Bedingungen verwendet (siehe 3.5.1). Die Ausbeute der enzymatischen Isotopenmarkierung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde bestimmt, indem die erhaltene Stammlösung von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> massenspektrometrisch standardisiert wurde. Dazu wurden jeweils 10 ng *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit unterschiedlichen Mengen an *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> versetzt (0, 5, 10, 20 und 40 ng, jeweils n=2) und zu den entsprechenden PFB-TMS-Derivaten umgesetzt. Zur quantitativen Analyse mit GC-MS wurden im SIM-Modus die Intensität der Ionen mit *m/z* 543 für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und mit *m/z* 547 für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> bestimmt. Die lineare Regression der Peakflächenverhältnisse (SIM von *m/z* 547 zu *m/z* 543) (*y*) und das

Verhältnis der eingesetzten Menge von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> zu *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (x) ergab eine Gerade der Gleichung:  $y = 0,028 + 0,683x$  ( $r^2=0,997$ ). Die aus der Steigung der Geraden erhaltene mittlere Gesamtausbeute der Isotopenmarkierung beträgt 68,3 %.

Die isotopische Reinheit von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> wurde durch SIM der Ionen mit  $m/z$  543 für nichtmarkiertes *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> sowie  $m/z$  545 für einfach und  $m/z$  547 für zweifach <sup>18</sup>O-markiertes *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> bestimmt. Der Anteil an nicht markiertem *ent*-2,3-Dinor-5,6-di-hydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> betrug 0,1 %. Der Anteil an *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>16</sup>O<sup>18</sup>O]PGF<sub>2α</sub> betrug 5,3 % und der an *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> 94,6 %.

*Zusammenfassung.* Bei der Umsetzung des Methylesters von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit unspezifischer Schweineleberesterase in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O kommt es zum Austausch beider <sup>18</sup>O-Atome der Carboxyl-Gruppe. Die im Vergleich zur enzymatischen Synthese von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (4.1.1.2) geringere Gesamtausbeute von 68,3 % ist auf Verluste bei der chromatographischen Aufreinigung mit HPLC zurückzuführen. Aufgrund der Verunreinigung im neu synthetisierten *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> war jedoch eine solche Aufreinigung angezeigt. Die isotopische Reinheit (0,1 % an nicht <sup>18</sup>O-markiertem *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>) ist im Vergleich zur isotopischen Reinheit von 8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-PGF<sub>2α</sub> (4.1.1.2) sehr hoch. Sie ist auf die höhere isotopische Reinheit des eingesetzten H<sub>2</sub><sup>18</sup>O zurückzuführen (98 % gegenüber 95 % an <sup>18</sup>O).

#### 4.1.3.4 NICI-Massenspektren

Die NICI-Massenspektren der Dinor-dihydro-Metabolite von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurden zusammen mit 8-iso-PGF<sub>2α</sub> unter 4.1.1.3 dargestellt und besprochen.

#### 4.1.3.5 Validierung der quantitativen Methode

Die vorgestellte GC-Tandem-MS-Methode erlaubt bei vergleichsweise geringem Aufwand die genaue und spezifische Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in humanem Urin (siehe auch

[350]). Durch Modifikation dieser Methode sollte auch die Bestimmung des Hauptmetaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin, d.h. 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, möglich sein. Als interner Standard wird *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> verwendet.

*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> als interner Standard für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> Die Eignung von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> als interner Standard in der GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analytik wurde durch eine Verdünnungsreihe überprüft. Dazu wurden verschiedene Mengen an 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (1, 2, 5, 10 und 20 ng, n=2) mit jeweils 10 ng *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> zu den PFB-TMS-Derivaten umgesetzt. Zur Standardisierung für die GC-MS wurden die Ionen mit *m/z* 543 für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *m/z* 547 für *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> im SIM-Modus detektiert. Zur Standardisierung für die GC-Tandem-MS wurden die Ionen mit *m/z* 273 für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *m/z* 277 für [1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-*ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> im SRM-Modus detektiert. Die lineare Regression der gemessenen Peakflächenverhältnisse zwischen *m/z* 543 und *m/z* 547 (*y*) und dem Mengenverhältnis des Analyten zum internen Standard ergab die Regressionsgleichung:  $y = 0,001 + 0,977x$  ( $r=0,999$ ). Die Steigung der Regressionsgeraden aus der GC-MS-Analyse (SIM) bestätigt mit 0,977 das angenommene Verhältnis vom Analyten zum internen Standard. Die lineare Regression der gemessenen Peakflächenverhältnisse zwischen *m/z* 273 und *m/z* 277 (*y*) und dem Mengenverhältnis des Analyten zum internen Standard ergab die Regressionsgleichung:  $y = 0,005 + 3,984x$  ( $r=0,999$ ). Vergleicht man die Regressionsgeraden aus der GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analyse miteinander, so ist die Steigung der Regressionsgeraden aus der GC-Tandem-MS-Analyse (SRM) um den Faktor 4,08 größer. Der Verlust von TMS<sup>18</sup>OH aus *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> beim CAD-Prozess ist die Ursache für die höhere Steigung der Regressionsgeraden für das SRM von *m/z* 273 und *m/z* 277. Der Faktor von 4,08 muss folglich bei quantitativen Analysen mit GC-Tandem-MS in die Berechnung der Konzentration des Analyten eingehen.

*Akkuratheit, Präzision, Reproduzierbarkeit, Detektionslimit und Nachweisgrenze der Methode.* Zur Aufreinigung der biologischen Proben vor der Quantifizierung mit GC-Tandem-MS wurde TLC (Methode A) oder HPLC (Methode B) verwendet. Die Akkuratheit und Präzision wurde sowohl für Methode A als auch für die Methode B evaluiert. Methode A ist unter 4.1.3.1 beschrieben worden. Methode B entspricht Methode A, wobei die TLC-

Trennung der PFB-Ester der Isoprostane durch eine HPLC-Trennung der PFB-Ester der Isoprostane nach 3.4.2 ersetzt wurde. Die Analyse von jeweils 1 µg der PFB-Ester ergab folgende Retentionszeiten (min):  $6,02 \pm 0,05$  für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB und  $12,08 \pm 0,1$  für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB (n=5).

Zur Bestimmung der Akkuratheit und Präzision der Methoden A und B wurden zum gleichen gepoolten Urin verschiedene Mengen an exogenem 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zuge-  
setzt. Dazu sind Aliquots zu 5 ml Urin mit jeweils 2 ng/ml *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-  
[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> als internem Standard versetzt worden. Die einzelnen 5 ml-Aliquots wurden  
mit unterschiedlichen Mengen an 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> versetzt (0, 0,1, 0,2, 0,5,  
1 und 2 ng/ml, jeweils n=2). Nach der Festphasenextraktion wurden die PFB-Ester mit TLC  
(Methode A) oder mit HPLC (Methode B) aufgereinigt. GC-Tandem-MS wurde anschließend  
zur Quantifizierung der Isoprostane eingesetzt (SRM der Ionen mit *m/z* 273 und *m/z* 277).

Tab. 4. Präzision und Akkuratheit der Methoden A und B zur quantitativen Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Urin von Menschen mittels GC-Tandem-MS.<sup>a</sup>

| 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF <sub>2α</sub><br>zugegeben <sup>b</sup> | Methode A <sup>a</sup>   |                               | Methode B <sup>a</sup>   |                               |
|---|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
|   | 2,3-Dinor-5,6-<br>dihydro-8-iso-<br>PGF <sub>2α</sub> gemessen<br>abzüglich Basal-<br>konzentration <sup>c</sup> | R.S.D./<br>Akkuratheit<br>(%) | 2,3-Dinor-5,6-<br>dihydro-8-iso-<br>PGF <sub>2α</sub> gemessen<br>abzüglich Basal-<br>konzentration <sup>c</sup> | R.S.D./<br>Akkuratheit<br>(%) |
| 0   | 0  | 1,0/n.a.                      | 0  | 1,7/n.a.                      |
| 100   | 108  | 6,0/92                        | 136  | 3,7/64                        |
| 200   | 179  | 3,9/89                        | 168  | 0,6/84                        |
| 500   | 504  | 4,8/99                        | 553  | 6,6/89                        |
| 1000  | 1074   | 2,4/93                        | 1005   | 1,9/99                        |
| 2000  | 2086   | 1,7/96                        | 2129   | 0,4/94                        |
| Mitte±S.D. der R.S.D.   |  | 3,3±1,8                       | 2,5±2,2  |                               |
| Mitte±S.D. der Akkuratheit (%)  |  | 94±6                          | 86±12  |                               |

<sup>a</sup>Methode A stellt eine Kombination aus SPE, TLC und GC-Tandem-MS, und Methode B eine Kombination aus SPE, HPLC und GC-Tandem-MS dar. Zur Validierung wurde die Additionsmethode verwendet. Dazu wurden zu 5 ml-Aliquots gepoolten Humanurins 0 – 2000 pg/ml 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zugesetzt (n=2). Interner Standard war *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> (2 ng/ml).

<sup>b</sup>Alle Konzentrationsangaben in pg/ml Urin.

<sup>c</sup>Mittlere Basalkonzentration von 235 pg/ml Urin (Methode A) und von 681 pg/ml Urin (Methode B).

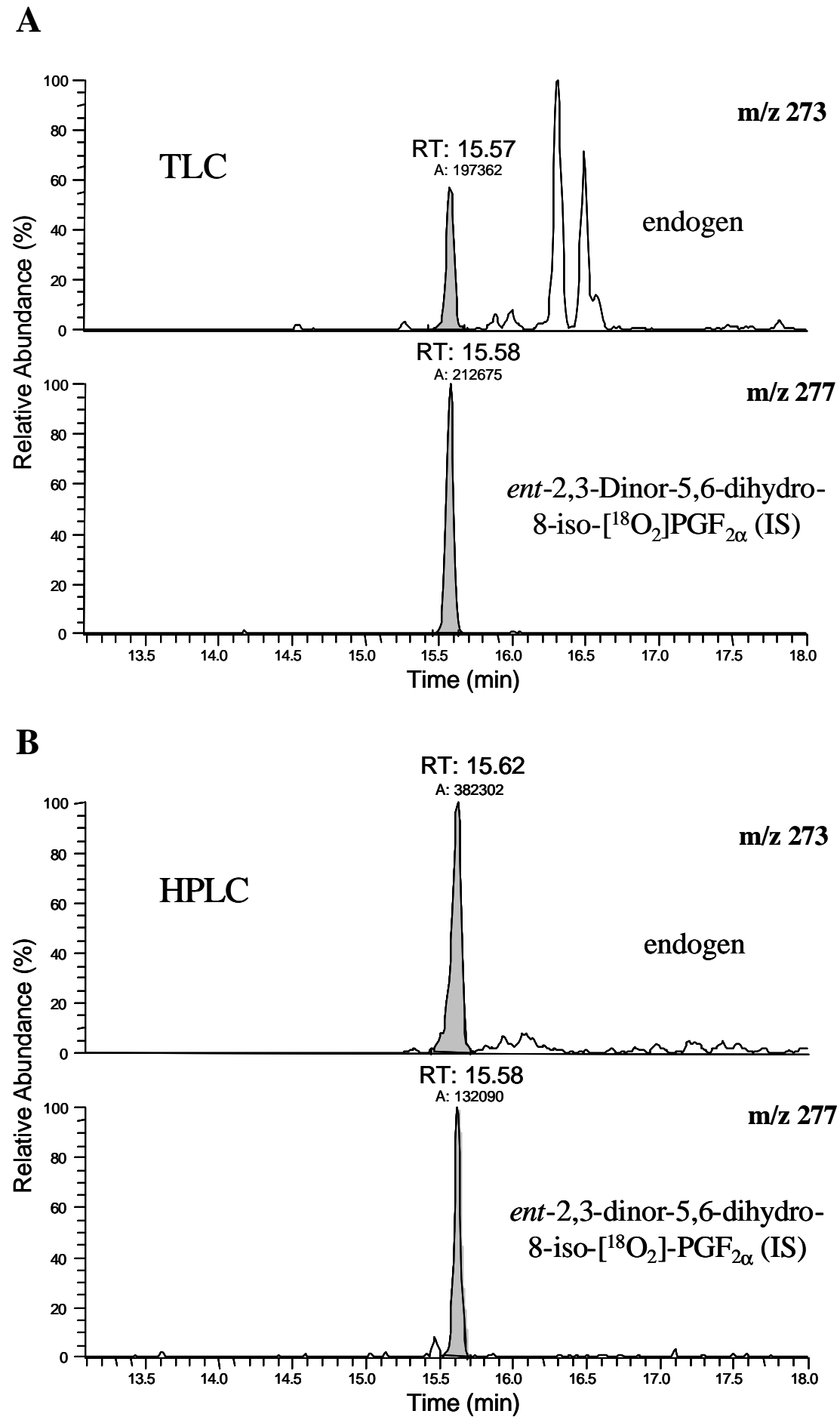
Die lineare Regressionsanalyse zwischen den gefundenen (y) und den zugesetzten Mengen an 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in ng/ml Urin (x) ergab für Methode A die Geradengleichung  $y = 0,227 + 1,05x$  ( $r^2 = 0,999$ ) und für Methode B die Gleichung  $y = 0,681 + 1,06x$  ( $r^2 = 0,998$ ). Die mittleren gemessenen Konzentrationen von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> für die verschiedenen zugesetzten Mengen an 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und deren Standardabweichung (SD) dienten als Berechnungsgrundlage der Präzision und der Akkuratheit der Methode. Die in Tab. 4 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass sich die analytische Methode zur Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> durch eine hohe Präzision und Akkuratheit auszeichnet. Die mittlere Präzision beider Methoden ist mit einer RSD von  $3,3 \pm 1,8$  % (Methode A) bzw.  $2,5 \pm 2,2$  % (Methode B) sehr ähnlich. Die mittlere Akkuratheit ist jedoch für Methode A ( $94 \pm 6$  %) höher als für Methode B ( $86 \pm 12$  %). Dennoch ist auch Methode B mit ihrer hohen Präzision und Akkuratheit valide.

Die instrumentelle Präzision und die Reproduzierbarkeit der Methode wurde mit 5 ml-Aliquots gepoolten Urins bestimmt, denen jeweils 2 ng/ml *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> als interner Standard zugesetzt wurden. Alle Proben wurden mit Methode A und Methode B aufgearbeitet und mit GC-Tandem-MS quantifiziert. Die instrumentelle Präzision betrug für endogenes 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> 98,8 % (n=5). Die Reproduzierbarkeit der Methode A lag bei 96 % für Proben, die am gleichen Tag aufgearbeitet wurden (n=2) und bei 94 % für Proben, die an aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet wurden (n=4). Die Reproduzierbarkeit der Methode B lag bei 97 % für Proben, die am gleichen Tag aufgearbeitet wurden (n=2) und bei 94 % für Proben, die an aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet wurden (n=4).

Das Detektionslimit (LOD) für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde durch GC-Tandem-MS-Analyse (1 µl) von Verdünnungen einer Stammlösung des PFB-TMS-Derivates von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in BSTFA ermittelt. SRM des Ions mit  $m/z$  273 zeigte für das PFB-TMS-Derivat von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 20:1 für 50 fg. Bei einer quantitativen Ausbeute würde dieses LOD einer Konzentration von 1 pg 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>/ml Urin (5 ml) entsprechen.

*Vergleich von TLC und HPLC sowie einer Kombination aus HPLC und TLC zur Aufreinigung biologischer Proben zur quantitativen Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in menschlichem Urin.* Die Exkretion von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und weiteren Dinor-dihydro-Metaboliten von F<sub>2</sub>-Isoprostanen in den menschlichen Urin wurde bei 14 gesunden Probanden untersucht. Zur Aufreinigung der biologischen Proben vor der Quantifizierung mit GC-Tandem-MS wurde nur TLC (Methode A), nur HPLC (Methode B) oder eine Kombination beider Methoden (HPLC vor TLC) verwendet. Abb. 20 zeigt die entsprechenden Chromatogramme aus den GC-Tandem-MS-Analysen einer Urinprobe. Das Peakflächenverhältnis von  $m/z$  273 zu 277 ist 0,928 für Methode A (Abb. 20A). Das Peakflächenverhältnis von  $m/z$  273 zu 277 bleibt unverändert für die gleiche Urinprobe, wenn eine Kombination von HPLC und TLC zur Aufreinigung der Probe verwendet wird (Abb. 20C; das Verhältnis  $m/z$  273 zu 277 ist 0,924). Ähnliche Ergebnisse werden für alle anderen Proben erhalten. Auch für die analytische Methode zur Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Humanurin zeigt die Kombination von HPLC mit TLC im Vergleich zur TLC-Aufreinigung alleine keine Änderung der gemessenen Peakflächenverhältnisse (siehe 4.1.1.4). Abb. 20B zeigt das GC-Tandem-MS-Chromatogramm für die Ionen mit  $m/z$  273 und 277 nach HPLC-Trennung der PFB-Ester der Isoprostane der gleichen Urinprobe (Methode B). Der GC-Peak ( $m/z$  273) mit der Retentionszeit des endogenen 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist hier breiter als in den Chromatogrammen der Abb. 20A und Abb. 20C. Das Peakflächenverhältnis von  $m/z$  273 zu 277 ist mit 2,894 größer als nach Aufarbeitung mit Methode A oder der Kombination der Methoden A und B.

Die Exkretion von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin von 14 gesunden Probanden, gemessen mit den Methoden A und B, ist in Tab. 5 wiedergegeben. Die gemessene Exkretion in den Urin ist für Methode B im Durchschnitt dreimal so groß wie für Methode A. Während Methode A die Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> wiedergibt, erlaubt Methode B offensichtlich die quantitative Bestimmung mehrerer Dinor-dihydro-Metabolite von verschiedenen F<sub>2</sub>-Isoprostanen. 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> macht somit etwa ein Drittel der mit Methode B quantifizierten Dinor-dihydro-Metabolite von F<sub>2</sub>-Isoprostanen aus. Dies erklärt auch die bei der Validierung beider Methoden angegebene, etwa dreimal höhere Basalkonzentration der Metabolite für Methode B (Tab. 4).



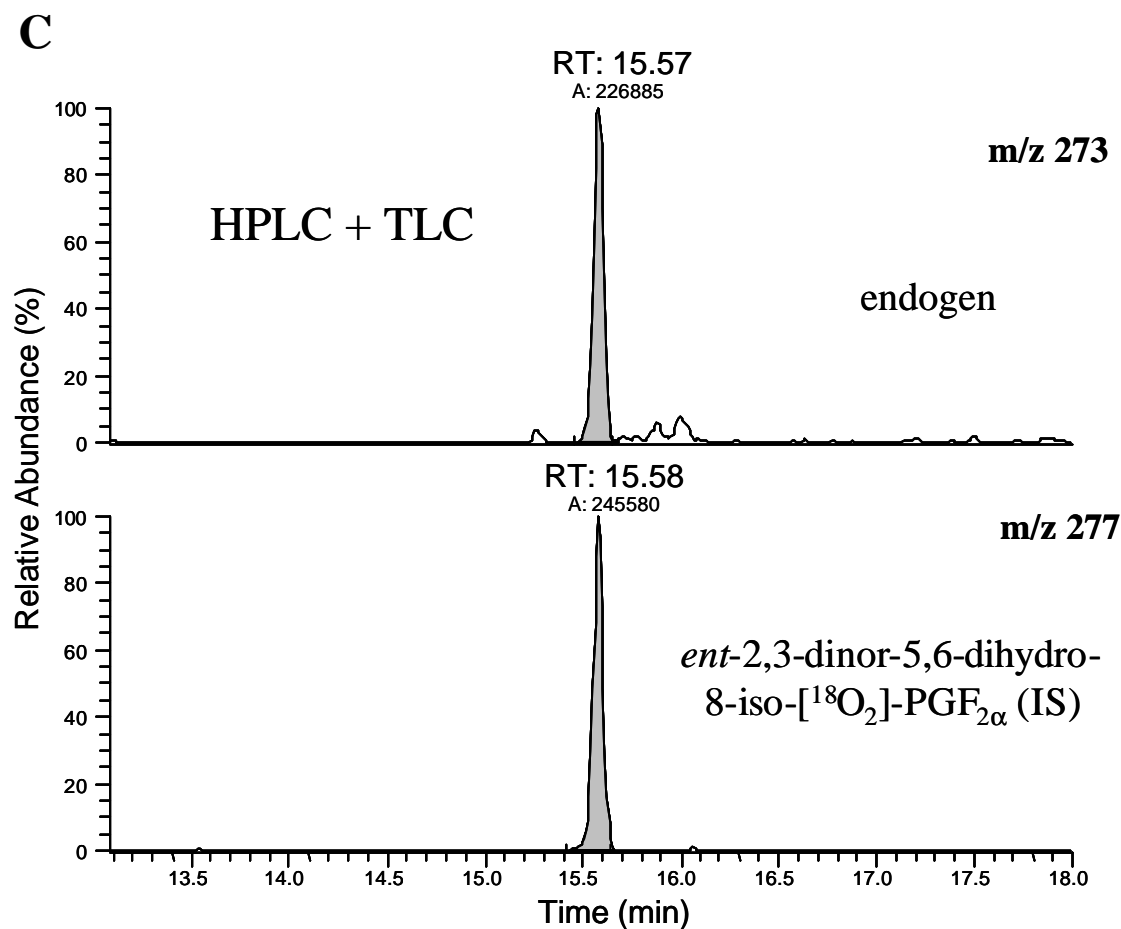


Abb. 20. GC-Tandem-MS-Analytik von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Gezeigt sind typische Chromatogramme aus der Analyse einer Urinprobe eines gesunden Probanden. SRM der Ionen mit *m/z* 273 für endogenes 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und *m/z* 277 für den internen Standard *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]PGF<sub>2α</sub> der PFB-TMS-Derivate. Es sind die Chromatogramme aus der GC-Tandem-MS-Analyse nach TLC (A), nach HPLC (B) und nach HPLC gefolgt von TLC (C) gezeigt.

Die Verteilung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigt keine Altersabhängigkeit ( $r = -0,099$ ) in der untersuchten Gruppe. Die Verteilung der Dinor-dihydro-Metabolite von F<sub>2</sub>-Isoprostanen zeigt in der untersuchten Gruppe ebenfalls keine Altersabhängigkeit ( $r = -0,064$ ). Der Korrelationskoeffizient zwischen der Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und der von Dinor-dihydro-Metaboliten der F<sub>2</sub>-Isoprostane in den Urin der einzelnen Probanden beträgt  $r = 0,489$ . Die mittlere Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> der weiblichen Probanden ist mit  $431 \pm 124$  pg/mg Kreatinin ( $n=8$ ) nicht signifikant niedriger als die der männlichen Probanden mit  $605 \pm 387$  pg/mg Kreatinin ( $n=6$ ,  $p=0,31$ , zweiseitiger *t*-Test). Die RSD der Gruppe der männlichen Probanden ist mit 56 % für die Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> deutlich größer als die der weiblichen



Probanden (29 %). Die mittlere Ausscheidung an Dinor-dihydro-Metaboliten von F<sub>2</sub>-Isoprostanen der weiblichen Probanden ist mit 1311 ±748 pg/mg Kreatinin nicht signifikant niedriger als die der männlichen mit 1814 ±813 pg/mg Kreatinin (p=0,30). Die RSD liegt für beide Gruppen bei 50%.

Tab. 5. Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und von Dinor-dihydro-Metaboliten von F<sub>2</sub>-Isoprostanen in den Urin von 14 gesunden Probanden.<sup>a</sup>

| Proband                 |                  | Methode A <sup>a</sup>  |  | Methode B <sup>a</sup>                                    |  |
|-------------------------|------------------|---|--|---|--|
| Geschlecht <sup>b</sup> | Alter<br>(Jahre) | 2,3-Dinor-5,6-dihydro-<br>8-iso-PGF <sub>2α</sub><br>(pg/mg Kreatinin) <sup>c</sup> | Dinor-dihydro Metabolite<br>von F <sub>2</sub> -Isoprostanen<br>(pg/mg Kreatinin) <sup>c</sup> | 8-iso-PGF <sub>2α</sub><br>(pg/mg Kreatinin) <sup>c</sup> |  |
| w                       | 31               | 273   | 821  | 103   |  |
| w                       | 44               | 674   | 1760   | 269   |  |
| w                       | 35               | 451   | 1262   | 218   |  |
| w                       | 27               | 452   | 567  | 249   |  |
| w                       | 27               | 456   | 1421   | 265   |  |
| w                       | 23               | 409   | 2961   | 247   |  |
| m                       | 33               | 328   | 951  | 120   |  |
| m                       | 28               | 788   | 2920   | 268   |  |
| m                       | 35               | 152   | 696  | 128   |  |
| m                       | 38               | 438   | 2674   | 91  |  |
| m                       | 28               | 1166  | 1875   | 908   |  |
| w                       | 29               | 488   | 1244   | 45  |  |
| m                       | 28               | 759   | 1766   | 400   |  |
| w                       | 28               | 245   | 450  | 37  |  |
| Mitte±S.D.              | 31±5             | 506±255   | 1526±816   | 223±135   |  |
| R.S.D. (%)              | 17               | 50  | 53   | 61  |  |

<sup>a</sup>Methode A stellt eine Kombination aus SPE, TLC und GC-Tandem-MS, und Methode B eine Kombination aus SPE, HPLC und GC-Tandem-MS dar.

<sup>b</sup>w, weiblich; m, männlich

<sup>c</sup>Alle Konzentrationsangaben für Urin. Die Ausscheidung ist auf den Kreatinin-Gehalt des Urines bezogen.

<sup>d</sup>Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> gemessen nach 4.1.1.1.

*Diskussion.* Diese Ergebnisse zeigen, dass Methode A (TLC) die spezifische quantitative Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit GC-Tandem-MS erlaubt. Eine zusätzlich durchgeführte HPLC-Aufreinigung erhöht nicht die Selektivität der Methode. Im Gegensatz dazu liegen die Messwerte dreimal höher, wenn Methode B (HPLC) zur Aufreinigung

eingesetzt wird. Dies lässt den Schluss zu, dass Dinor-dihydro-Metabolite anderer F<sub>2</sub>-Isoprostane sowohl in der HPLC als auch in der GC mit 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> coeluiieren. Auch für die Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Humanurin brachte eine zusätzlich zur TLC durchgeführte HPLC-Aufreinigung keinen Selektivitätsgewinn (siehe 4.1.1.4). Zwar unterscheiden sich die chromatographischen Eigenschaften vieler Isoprostane von denen der enzymatisch gebildeten Prostaglandine [189,200]. Einige F<sub>2</sub>-Isoprostane wie (15*R*)-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 9β,11α-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> weisen jedoch ein identisches chromatographisches Verhalten, sowohl bei der HPLC- als auch der GC-Trennung, auf [216]. Die akkurate Quantifizierung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist somit durch Methode A gewährleistet, während Methode B die Quantifizierung verschiedener Dinor-dihydro-Metabolite von F<sub>2</sub>-Isoprostanen ermöglicht.

#### ***4.1.3.6 Vergleich der Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> mit GC-MS und GC-Tandem-MS***

Wie gezeigt werden konnte, ermöglicht eine Kombination aus TLC-Trennung der PFB-Ester der Isoprostane mit anschließender GC-Tandem-MS-Analyse die spezifische Quantifizierung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Methode A). Ein Vergleich von GC-MS mit GC-Tandem-MS soll zeigen, ob auch einfache Massenspektroskopie die interferenzfreie und spezifische Detektion von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> erlaubt.

Dazu wurde 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit GC-MS (SIM der Ionen mit  $m/z$  543 und 547) und GC-Tandem-MS (SRM der Ionen mit  $m/z$  273 und 277) im selben Urin von 14 gesunden Probanden nach TLC-Trennung quantifiziert. Mit GC-MS wurde eine mittlere Ausscheidung an 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> von 529 ±315 pg/mg Kreatinin gemessen. Mit GC-Tandem-MS gemessen betrug die mittlere Ausscheidung 506 ±255 pg/mg Kreatinin. Die mit GC-MS gemessenen Werte zeigen eine hohe Korrelation zu den mit GC-Tandem-MS gemessenen Werten ( $r=0,89$ , Abb. 21). Die einzelnen Messwerte der GC-MS-Analyse unterscheiden sich jedoch z.T. erheblich von denen der GC-Tandem-MS-Analyse. Das Verhältnis der Messwerte von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> aus der GC-MS-Analyse zu denen aus der GC-Tandem-MS-Analyse beträgt 1,0745 ±0,5064. Dies entspricht einer recht großen RSD von 47 %.

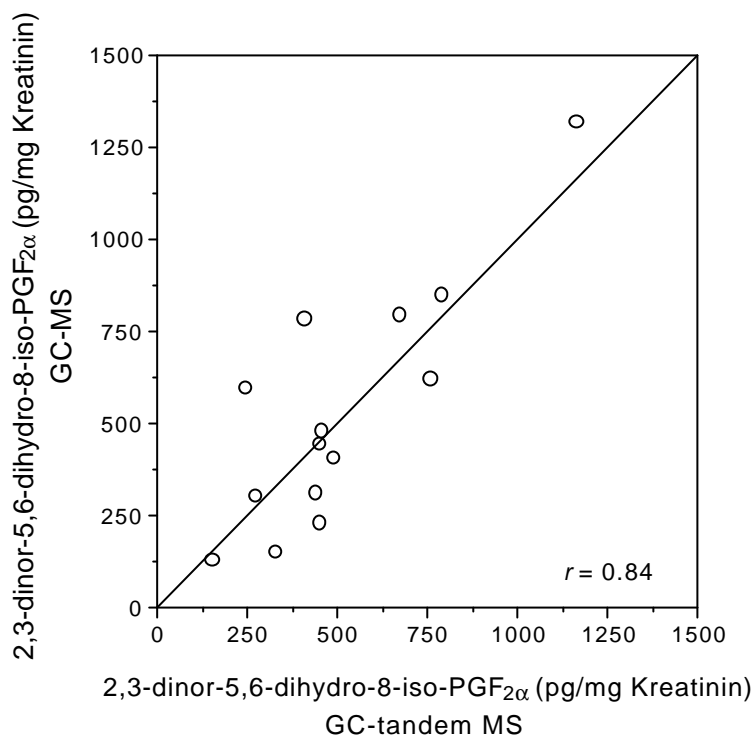


Abb. 21. Vergleich von GC-MS mit GC-Tandem-MS. Korrelation der gemessenen Werte von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Urinproben von 14 gesunden Probanden nach TLC-Aufreinigung der Proben und Quantifizierung mit GC-MS und GC-Tandem-MS.

#### 4.1.3.7 Simultane Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub> und 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub>

Sowohl für die massenspektrometrische Quantifizierung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> als auch von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> aus menschlichem Urin eignet sich die Kombination aus TLC und GC-Tandem-MS. Beide Substanzen sollten daher nach gemeinsamer TLC-Aufarbeitung der Proben zu quantifizieren sein. Eine weitere Vereinfachung würde die Kombination der jeweiligen TLC-Banden zu einer gemeinsamen GC-Tandem-MS-Analyse bedeuten.

Zunächst wurden daher mögliche Interferenzen beider Substanzen bei der GC-Tandem-MS-Analyse in der jeweilig anderen TLC-Bande untersucht. Auf der Grundlage der unterschiedlichen R<sub>f</sub>-Werte der PFB-Ester von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> bei der TLC-Trennung wurden beide TLC-Banden getrennt voneinander aufgearbeitet. Die massenspektrometrische Analyse (SRM der Ionen mit  $m/z$  299 und 303) der TLC-Bande

mit dem  $R_f$ -Wert von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB ( $R_f = 0,26$ ) zeigte weder bei  $m/z$  299 noch bei  $m/z$  303 ein Signal mit der Retentionszeit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Dies bedeutet, in der TLC-Bande von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB findet sich keine Substanz, die mit der Quantifizierung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> interferieren würde. Die massenspektrometrische Analyse (SRM der Ionen mit  $m/z$  273 und 277) der TLC-Bande mit dem  $R_f$ -Wert von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB ( $R_f = 0,31$ ) zeigte bei  $m/z$  273 mehrere Signale im Bereich der Retentionszeit von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (12. bis 20. min). Es fanden sich Peaks im GC-Tandem-MS-Chromatogramm mit den Retentionszeiten (min)  $14,11 \pm 0,01$ ,  $14,73 \pm 0,01$  und  $14,87 \pm 0,01$  (n=2). Ionen mit  $m/z$  277 wurden zur Retentionszeit von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> nicht detektiert. Dies bedeutet, dass sich in der TLC-Bande von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB zahlreiche Substanzen finden, die mit der Quantifizierung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> interferieren würden. Eine Kombination der beiden TLC-Banden mit anschließender gemeinsamer GC-Tandem-MS-Quantifizierung ist daher nicht möglich.

2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurden aus diesem Grund im Urin von 14 gesunden Probanden nach gemeinsamer TLC-Aufreinigung in den jeweiligen TLC-Banden mit GC-Tandem-MS separat bestimmt. Es ergab sich eine mittlere Ausscheidung von  $506 \pm 255$  pg/mg Kreatinin für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und von  $223 \pm 135$  pg/mg Kreatinin für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Die Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist signifikant höher als diejenige von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ( $p < 0,0001$ , abhängiger zweiseitiger t-Test). Die Korrelation zwischen der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und der seines Metaboliten betrug  $r = 0,86$  (Abb. 22). Die Verteilung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigt keine Alters- oder Geschlechterabhängigkeit in der untersuchten Gruppe (siehe 4.1.3.5, Tab. 5). Die Verteilung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> lässt ebenfalls keine signifikante Altersabhängigkeit ( $r = -0,206$ , n=14) in der untersuchten Gruppe erkennen. Die mittlere Ausscheidung an 8-iso-PGF<sub>2α</sub> der weiblichen Probanden ist mit  $179 \pm 94$  pg/mg Kreatinin (n=8) nicht signifikant niedriger als die der männlichen Probanden mit  $319 \pm 284$  pg/mg Kreatinin (n=6,  $p=0,33$ ). Die RSD für die Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist mit 89 % für die männlichen Probanden deutlich größer verglichen mit den weiblichen Probanden (52 %).

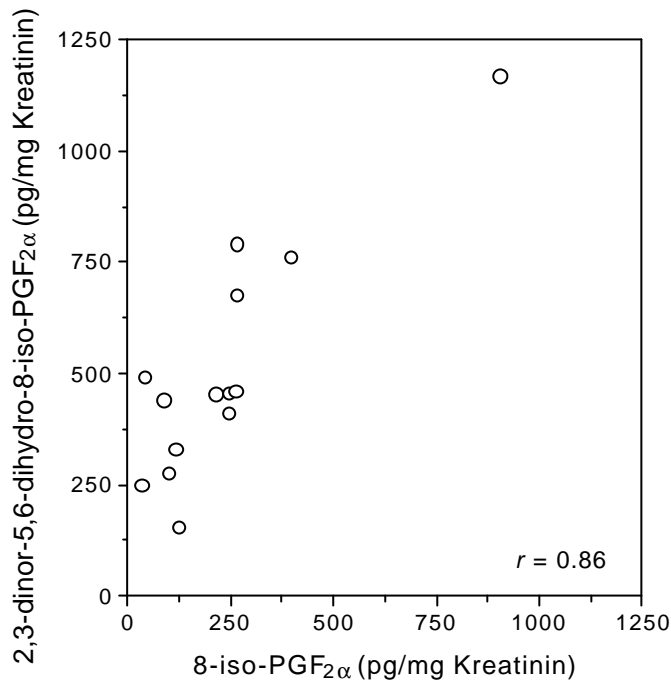


Abb. 22. Korrelation zwischen der Kreatinin-bezogenen Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin von 14 gesunden Probanden.

Die mittlere Ausscheidung von  $223 \pm 135$  pg/mg Kreatinin für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin von 14 Probanden liegt im Bereich der von anderen Gruppen gemessenen Konzentrationen:  $221 \pm 106$  pg/mg Kreatinin [209],  $244 \pm 25$  pg/mg Kreatinin [354] und  $159 \pm 18$  pg/mg Kreatinin [149]. Eine mittlere Ausscheidung von  $506 \pm 255$  pg/mg Kreatinin für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> bestätigt ebenfalls frühere Messungen mit GC-MS ( $390 \pm 180$  pg/mg Kreatinin [368]). Die gemessene Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist etwa doppelt so hoch wie die von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Die Korrelation zwischen der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seinem Metaboliten ist mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,86$  hoch. Sie liegt in der gleichen Größenordnung wie die mit GC-MS bei Rauchern und Nichtrauchern für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seinem Metaboliten gefundene Korrelation ( $r = 0,77$  [157]).

#### 4.1.4 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub>

Zur massenspektrometrische Quantifizierung (GC-NICI-MS) von Prostaglandinen, die eine Keto-Gruppe aufweisen (z. B. PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>), werden die PFB-MO-TMS-Derivate der Verbindungen eingesetzt [198]. Werden 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> als PFB-MO-TMS-Derivate

gaschromatographiert, so ist eine Trennung der Isomere mit herkömmlichen GC-Säulen nicht möglich [369,370]. Eine Möglichkeit besteht jedoch in der Umsetzung zu anderen Derivaten mit anschließender GC-Trennung (4.1.4.2). Zunächst werden diese Derivate charakterisiert (4.1.4.1). Eine andere Möglichkeit bietet die TLC-Trennung der PFB-MO-TMS-Derivate von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> (4.1.4.3).

#### 4.1.4.1 NICI-Massenspektren

*Derivate.* Massenspektren der Substanzen 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> (Alexis, Grünberg) und [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> (Dr. U. Axen, The Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA) wurden von den entsprechenden PFB-Methoxim (MO)-TMS-, Me-*O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzoyloxim) (PFBO)-TMS- und PFB-PFBO-TMS Derivaten aufgenommen (Derivatisierung siehe 3.2).

*Gaschromatographie-(Tandem) Massenspektrometrie.* Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Spektren wurden unter NICI-Bedingungen mit dem GC-MS-System für Prostaglandine aufgenommen (siehe 3.5.1). Zur GC-Trennung wurde eine Kapillarsäule Optima 5-MS der Dimension 30 m x 0,25 mm ID (0,25 µm Filmdicke) verwendet. Die Retentionszeiten (min) der einzelnen Methoxim-Isomere der PFB-MO-TMS-Derivate betragen 24,80 und 25,74 für 8-iso-PGE<sub>2</sub>, 24,96 und 25,88 für PGE<sub>2</sub>, 24,89 und 25,81 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub>. Die Retentionszeiten (min) der einzelnen Oxim-Isomere der Me-PFBO-TMS-Derivate betragen 23,02 und 23,86 für 8-iso-PGE<sub>2</sub>, 22,68 und 24,34 für PGE<sub>2</sub>, 22,59 und 24,25 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> und die der einzelnen Oxim-Isomere der PFB-PFBO-TMS-Derivate 30,10 und 30,85 für 8-iso-PGE<sub>2</sub>, 29,97 und 31,22 PGE<sub>2</sub>, 29,95 und 31,20 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub>.

*Ergebnisse und Diskussion.* Die GC-MS- und die GC-Tandem-MS-Massenspektren der PFB-MO-TMS-Derivate von 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> unter NICI-Bedingungen sind in Tab. 6 wiedergegeben. Als prominente Ionen in den GC-MS-NICI-Massenspektren finden sich  $m/z$  524 für 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> und  $m/z$  528 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub>. Das Massenspektrum von PGE<sub>2</sub> ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Massenspektren von PGE<sub>2</sub> [197]. Der Verlust des PFB-Restes unter NICI-Bedingungen wurde auch für PFB-TMS-Derivate von F<sub>2</sub>-Isoprostanen beobachtet (siehe 4.1.1.3). Die PFB-MO-TMS-Derivate der Isomere zeigen nahezu identisches chromatographisches und massenspektrometrisches Verhalten. Eine Trennung bzw. Unterscheidung der PFB-MO-TMS-Derivate von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> ist unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

Tab. 6. Verteilung der Massenfragmente in den NICI-Massenspektren eines E<sub>2</sub>-Prostaglandins und E<sub>2</sub>-Isoprostans als PFB-MO-TMS-Derivate.<sup>a</sup>

| Massenfragment /Verbindung <sup>a</sup>  | 8-iso-PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub>  | [3,3',4,4'- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]PGE <sub>2</sub> |
|--|------------------------|-------------------|---|
| <i>GC-MS-Massenspektren</i>  |                        |                   |   |
| [M – PFB] <sup>–</sup>   | 524 (100)              | 524 (100)         | 528 (100)   |
| [M – PFB – TMSOH] <sup>–</sup>   | 434 (10)               | 434 (10)          | 438 (12)  |
| [M – PFB – TMSOH – (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> ] <sup>–</sup> | 361 (2)                | n.d. <sup>b</sup> | 365 (2)   |
| <i>GC-Tandem-MS-Massenspektren</i>   |                        |                   |   |
| [P – 2xTMSOH] <sup>–</sup>   | 344 (3)                | n.d.              | 348 (2)   |
| [P – 2xTMSOH – CH <sub>3</sub> O] <sup>–</sup>                                       | 313 (7)                | 313 (8)           | 317(20)   |
| [P – 2xTMSOH – CO <sub>2</sub> – CH <sub>3</sub> OH] <sup>–</sup>                    | 268 (100)              | 268 (100)         | 272 (100)   |
| n.z. <sup>c</sup>  | 226 (38)               | 226 (34)          | 226 (17)  |
| n.z.   | 214 (12)               | 214 (19)          | 216 (18)  |

<sup>a</sup>Massenfragmente *m/z* (Intensität %) der GC-NICI-Massenspektren der PFB-MO-TMS-Derivate verschiedener E<sub>2</sub>-Prostaglandine und ihrer mit stabilen Isotopen markierten Analoga. CAD der Ionen [P]<sup>–</sup> = [M – PFB]<sup>–</sup> für die GC-Tandem-MS-Massenspektren. Angaben jeweils für das Methoxim-Isomer mit der größeren Intensität.

<sup>b</sup>n.d. nicht detektierbar; <sup>c</sup>n.z. nicht zugeordnet

Tab. 7. Verteilung der Massenfragmente in den NICI-Massenspektren eines E<sub>2</sub>-Prostaglandins und E<sub>2</sub>-Isoprostans als Me-PFBO-TMS-Derivate.<sup>a</sup>

| Massenfragment /Verbindung <sup>a</sup>  | 8-iso-PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub> | [3,3',4,4'- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]PGE <sub>2</sub> |
|--|------------------------|------------------|---|
| <i>GC-MS-Massenspektren</i>  |                        |                  |   |
| [M – HF] <sup>–</sup>  | 685 (9)                | 685(12)          | 689 (24)  |
| [M – HF – TMSOH] <sup>–</sup>  | 595 (16)               | 595 (13)         | 599 (18)  |
| [M – PFB – 2xTMSOH] <sup>–</sup>   | 345 (23)               | 345 (14)         | 349 (3)   |
| [C <sub>7</sub> F <sub>5</sub> HO] <sup>–</sup>                                    | 196 (100)              | 196 (100)        | 196 (100)   |
| [C <sub>7</sub> F <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>–</sup>                      | 178 (44)               | 178 (38)         | 178 (50)  |
| <i>GC-Tandem-MS-Massenspektren</i>   |                        |                  |   |
| [P – 17] <sup>–</sup>  | 668 (3)                | 668 (2)          | 672 (2)   |
| [P – TMSOH – 17] <sup>–</sup>  | 578 (24)               | 578 (22)         | 582 (22)  |
| [P – TMSOH – (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> – 17] <sup>–</sup> | 506 (4)                | 506 (6)          | 510 (4)   |
| [P – 2xTMSOH – 17] <sup>–</sup>  | 488 (70)               | 488 (48)         | 492 (46)  |
| n.z. <sup>b</sup>  | 456 (10)               | 456 (6)          | 460 (8)   |
| n.z.   | 217 (100)              | 217 (100)        | 217 (100)   |

<sup>a</sup>Massenfragmente *m/z* (Intensität %) der GC-NICI-Massenspektren der Me-PFBO-TMS-Derivate verschiedener E<sub>2</sub>-Prostaglandine und ihrer mit stabilen Isotopen markierten Analoga. CAD der Ionen [P]<sup>–</sup> = [M – HF]<sup>–</sup>. Angaben jeweils für das Oxim-Isomer mit der größeren Intensität. <sup>b</sup>n.z. nicht zugeordnet

Die prominenten Ionen  $[P]^- = [M - PFB]^-$  der PFB-MO-TMS-Derivate wurden mit Argon weiter fragmentiert (CAD). Als intensive Produktionen finden sich in den GC-Tandem-MS-NICI-Massenspektren Ionen mit  $m/z$  268 für 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> und  $m/z$  272 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> (Tab. 6). Dies entspricht dem Verlust der beiden TMSOH-Gruppen, Methanol und CO<sub>2</sub> ( $[P - 2xTMSOH - CO_2 - CH_3OH]^-$ ). Das Tochtermassenspektrum von PGE<sub>2</sub> entspricht einem bereits publizierten Tochtermassenspektrum dieser Substanz [193].

Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Massenspektren der Me-PFBO-TMS-Derivate von 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> unter NICI-Bedingungen sind in Tab. 7 wiedergegeben. Im Gegensatz zu den PFB-MO-TMS-Derivaten dominieren bei den Me-PFBO-TMS-Derivaten in den GC-MS-NICI-Massenspektren die Ionen des PFB-Oxim-Restes mit  $m/z$  196 und  $m/z$  178 [371]. Diese sind jedoch unspezifisch. Spezifische Ionen liegen nur in geringer Intensität vor u.a. bei  $m/z$  685 und 689 (jeweils  $[M - HF]^-$ ). Die Me-PFBO-TMS-Derivate der Isomere unterscheiden sich in der Retentionszeit und ermöglichen so die GC-Trennung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>. Dies ist möglicherweise auf die recht voluminöse fluorierte Benzyl-Oxim-Gruppe zurückzuführen. Die Fluoratome der Benzyl-Oxim-Gruppe erhöhen dabei die Sensitivität der Detektion unter NICI-Bedingungen [372].

Die spezifischen Ionen  $[P]^- = [M - HF]^-$  der Me-PFBO-TMS-Derivate wurden mit Argon weiter fragmentiert (CAD). Als intensivstes Produktion findet sich in den GC-Tandem-MS-NICI-Massenspektren das Fragment mit  $m/z$  217 sowohl für 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> als auch für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> (Tab. 7). Dies Fragment enthält die PFBO-Gruppe und ist recht unspezifisch. Es ist daher für die Quantifizierung von Isomeren des PGE<sub>2</sub> nicht geeignet.

#### **4.1.4.2 Gaschromatographische Trennung von 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub>**

*Gaschromatographie-(Tandem)-Massenspektrometrie.* Zur gaschromatographischen Trennung der PFB-MO-TMS-, PFB-PFBO-TMS- und Me-PFBO-TMS-Derivate von 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> mit dem GC-MS-System für Prostaglandine (siehe 3.5.1) wurden folgende GC-Säulen eingesetzt: Optima 5MS (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke) und Optima 17 (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke) von Macherey-Nagel sowie DB 5MS (15 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke) von J & W Scientific. Zur



Detektion der PFB-MO-TMS-Derivate wurde im SRM-Modus die Intensität der Ionen mit  $m/z$  268 und  $m/z$  272 gemessen. Zur Detektion der Me-PFBO-TMS-Derivate wurde im SIM-Modus die Intensität der Ionen mit  $m/z$  690 und  $m/z$  694 gemessen.

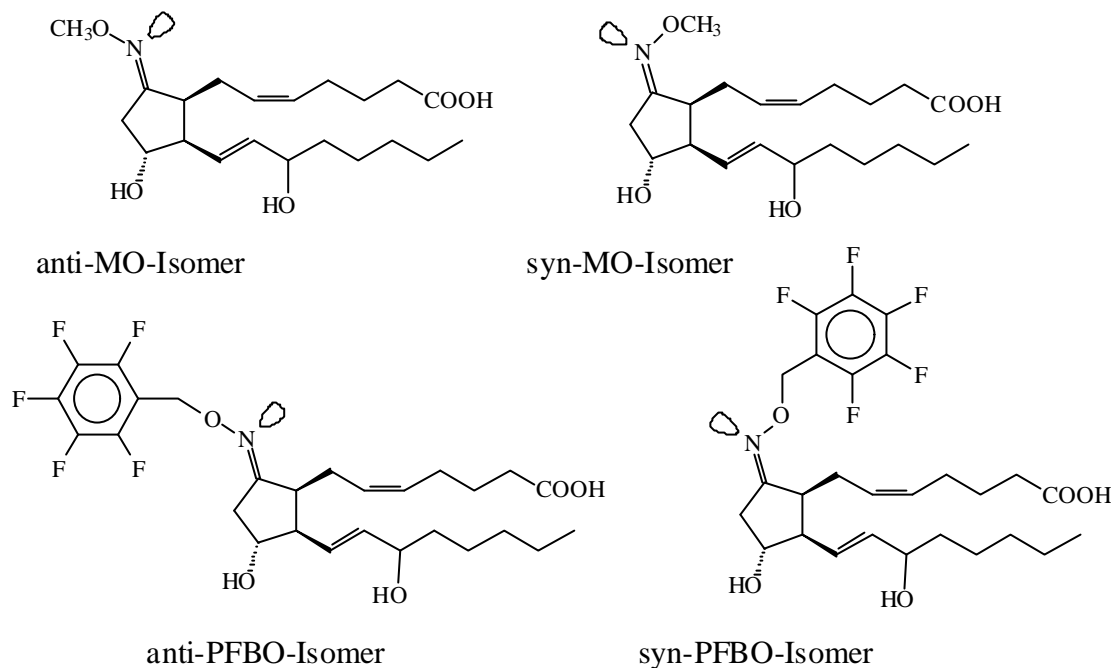


Abb. 23. Syn- und anti-Methoxim (MO)-Derivat von 8-iso-PGE<sub>2</sub> (oben). Syn- und anti-*O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamin (PFBO)-Derivat von 8-iso-PGE<sub>2</sub> (unten).

*Gaschromatographische Trennung der untersuchten Derivate.* Durch die Methoximierung entstehen zwei Isomere von PFB-MO-TMS-Derivaten, das syn- und anti-Methoxim (Abb. 23). Die syn- und anti-Methoxime der einzelnen Substanzen konnten gaschromatographisch voneinander getrennt werden. Das GC-Tandem-MS-Chromatogramm zeigt zwei Peaks für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> (Abb. 24 (A)). Offensichtlich werden die beiden Methoxim-Isomere in unterschiedlichem Verhältnis zueinander gebildet, da die GC-Peaks unterschiedlich groß sind. Eine unterschiedliche Fragmentierung der syn- und anti-Methoxime ist nicht beobachtet worden (siehe 4.1.4.1). Der kleinere GC-Peak des einen Methoxim-Isomers eluiert für das PFB-MO-TMS-Derivat von [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> vor dem anderen Methoxim-Isomer (Abb. 24 (A)). Das PFB-MO-TMS-Derivat von PGE<sub>2</sub> zeigt gleiche chromatographische Eigenschaften. Für 8-iso-PGE<sub>2</sub> kehrt sich die Reihenfolge der Elution um. Der erste GC-Peak des PFB-MO-TMS-Derivates von 8-iso-PGE<sub>2</sub> ist größer als der später eluierende zweite GC-Peak des anderen Methoxim-Isomers (Abb. 24 (A)). Dies führt jedoch nicht zu einer Nettotrennung der Methoxim-Isomere von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>. Die relative Retentionszeit des zweiten Peaks, normalisiert auf die des ersten Peaks, beträgt sowohl für das PFB-MO-

TMS-Derivat von PGE<sub>2</sub> als auch von 8-iso-PGE<sub>2</sub> 1,042. Auch mit den GC-Säulen Optima 17 (30 m) und DB 5MS (15 m) kam es zu keiner Nettotrennung der Methoxim-Isomere der PGE<sub>2</sub>-Isomere (nicht gezeigt).

Bei der Oximierung mit PFBOX von 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> entstehen ebenfalls zwei Isomere von Me-PFBO-TMS-Derivaten, das syn- und anti-Oxim (Abb. 24 (B)). Die syn- und anti-Oxime konnten gaschromatographisch voneinander getrennt werden. Das GC-Tandem-MS-Chromatogramm zeigt zwei Peaks für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub>. Offensichtlich werden auch hier die beiden Oxim-Isomere in unterschiedlichem Verhältnis zueinander gebildet; die Peaks sind unterschiedlich groß. Der kleinere Peak des einen Oxim-Isomers eluiert für das Me-PFBO-TMS-Derivat von [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> vor dem anderen Oxim-Isomer (Abb. 24 (B)). Das Me-PFBO-TMS-Derivat von PGE<sub>2</sub> zeigt gleiche chromatographische Eigenschaften. Für 8-iso-PGE<sub>2</sub> kehrt sich die Reihenfolge der Elution wiederum um. Dies führt nun jedoch zu einer Nettotrennung der Oxim-Isomere der PGE<sub>2</sub>-Isomere. Die relative Retentionszeit des zweiten Peaks, normalisiert auf die des ersten Peaks, beträgt für das Me-PFBO-TMS-Derivat von PGE<sub>2</sub> 1,068 und für das von 8-iso-PGE<sub>2</sub> 1,038. Auch mit den GC-Säulen Optima 17 (30 m) und DB 5MS (15 m) kam es zu einer Nettotrennung der Oxim-Isomere der PGE<sub>2</sub>-Isomere (nicht gezeigt). Ersetzt man den Methylester des Me-PFBO-TMS-Derivates durch den PFB-Ester, so kommt es auch für das erhaltene PFB-PFBO-TMS-Derivat zu einer Nettotrennung der Oxim-Isomere der PGE<sub>2</sub>-Isomere (Daten nicht gezeigt). Verglichen mit den Me-PFBO-TMS-Derivaten eluieren die PFB-PFBO-TMS-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> jedoch 8 min später von der GC-Säule.

*Diskussion.* Die Trennung der PFB-MO-TMS-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ist mit herkömmlichen GC-Säulen der Prostaglandin-Analytik mit GC-MS und GC-Tandem-MS unter NICI-Bedingungen nicht möglich. Wird jedoch statt der Methoximierung die Umsetzung der Keto-Gruppe zum aromatischen Oxim gewählt, so ist die Trennung von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> möglich. Diese Derivatisierung ermöglicht die selektive Quantifizierung von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ohne aufwendige Probenaufarbeitung mit GC-MS unter NICI-Bedingungen. Dies gilt sowohl für die Me-PFBO-TMS- als auch PFB-PFBO-TMS-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>. Die kürzere Retentionszeit des Me-PFBO-TMS-Derivates ist jedoch in Bezug auf die Gesamtanalysenzeit und die Empfindlichkeit vorteilhaft. Da bei Verwendung des Me-Esters anstelle des PFB-Esters die elektronenziehenden F-Atome fehlen würden, wurde zur Oximierung PFBOX [372] statt *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid eingesetzt.

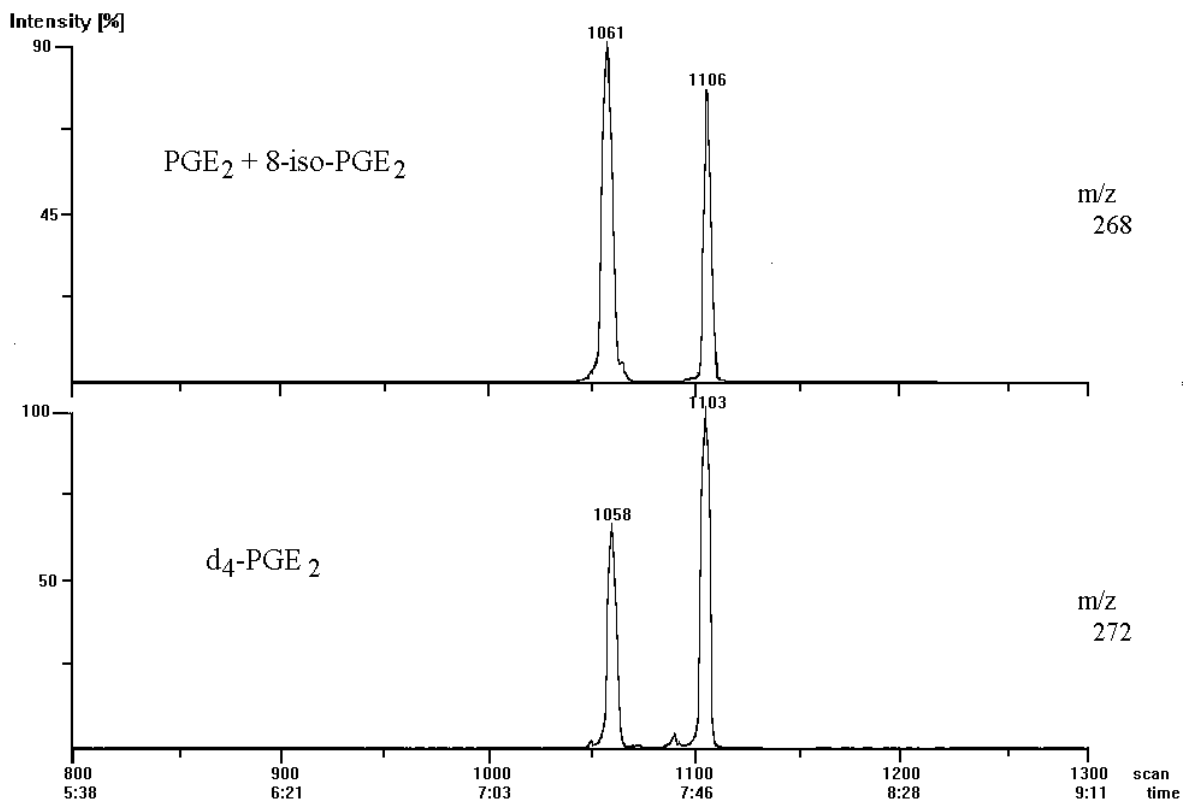
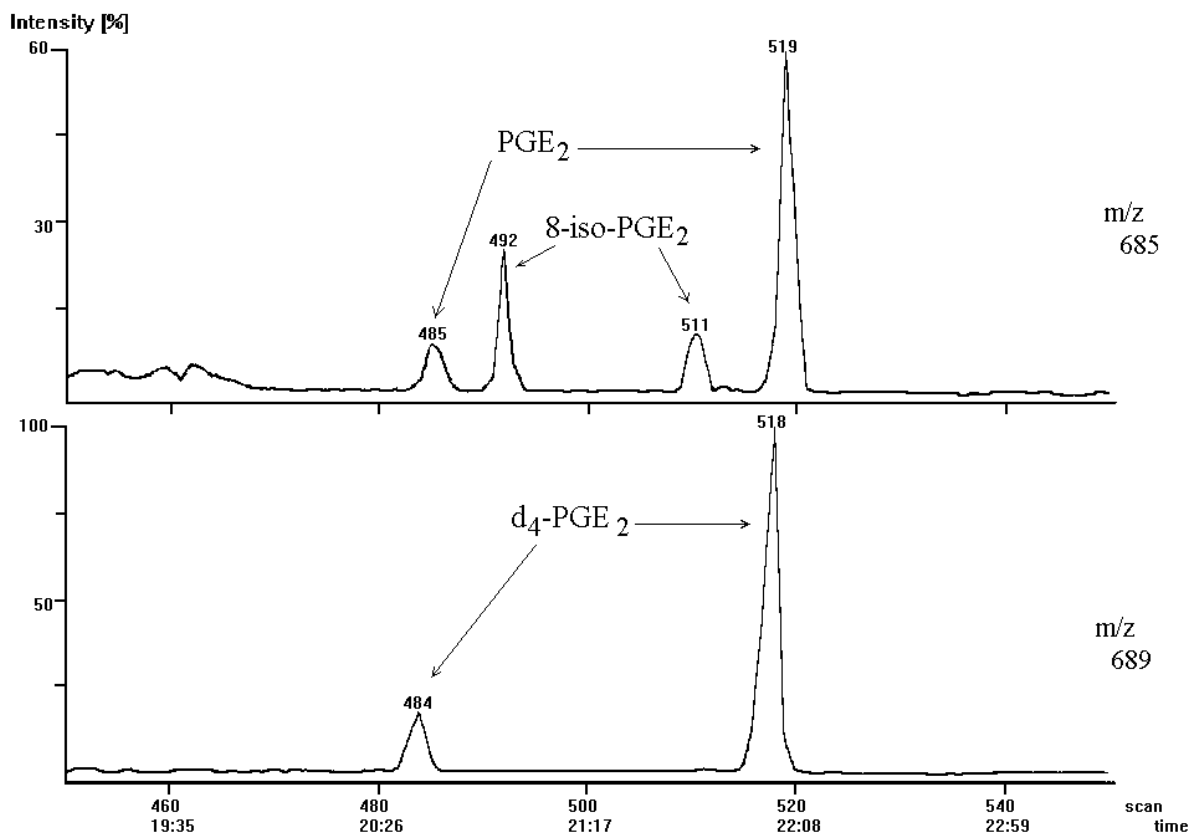
**A****B***Legende siehe nächste Seite*

Abb. 24. (vorherige Seite) Chromatogramme der Analyse eines Standardgemisches von 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> (d<sub>4</sub>-PGE<sub>2</sub>). GC-Tandem-MS-Analyse der PFB-MO-TMS-Derivate (A) und GC-MS-Analyse der Me-PFBO-TMS-Derivate (B). SRM der Ionen mit  $m/z$  268 für 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> sowie  $m/z$  272 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> der PFB-MO-TMS-Derivate (A). SIM der Ionen mit  $m/z$  685 für 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> sowie  $m/z$  689 für [3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]PGE<sub>2</sub> der Me-PFBO-TMS-Derivate (B). GC-Säule eingesetzt: Optima 5MS (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke).

Für die PFB-MO-TMS-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> werden jeweils zwei Methoxim-Isomere, syn- und anti-Methoxim, erhalten. Es kommt nicht zu einer Nettotrennung der Isomere. Offensichtlich kehrt sich jedoch die Reihenfolge der Elution von syn- und anti-Methoxim für 8-iso-PGE<sub>2</sub> um [94]. Auch für die Me-PFBO-TMS- und PFB-PFBO-TMS-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> werden jeweils zwei Oxim-Isomere erhalten. Die raumbeanspruchende aromatische Oxim-Gruppe dieser Derivate erhöht jedoch die Interaktion des einen Oxim-Isomers (großer Peak) mit der stationären Phase der GC-Säule und verringert die Retentionszeit des anderen Oxim-Isomers (kleiner Peak), sowohl für das PFBO-Derivat von PGE<sub>2</sub> als auch von 8-iso-PGE<sub>2</sub>. So kommt es zu einer Nettotrennung der Isomere.

#### 4.1.4.3 Dünnschichtchromatographische Trennung von 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub>

Wie gezeigt werden konnte, ist die GC-Trennung der Isomere 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> als PFB-MO-TMS-Derivate mit herkömmlichen GC-Säulen nicht möglich. Eine Alternative zur GC-Trennung besteht in der TLC-Trennung der PFB-MO-Derivate der Isomere.

Für PFB-MO-Derivate von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> wurden jeweils die syn- und anti-Methoxim-Isomere dünnschichtchromatographisch voneinander getrennt. Die Trennung der PFB-MO-Derivate erfolgte mit dem unter 3.3.2 beschriebenen TLC-System. Zum Vergleich sind auch die R<sub>f</sub>-Werte weiterer Isoprostane und Prostaglandine angegeben. Folgende R<sub>f</sub>-Werte wurden bestimmt: 0,58 ±0,01 und 0,51 ±0,01 für PGD<sub>2</sub>-PFB-MO, 0,45 ±0,01 und 0,28 ±0,005 für PGE<sub>2</sub>-PFB-MO, 0,56 ±0,01 und 0,27 ±0,005 für 8-iso-PGE<sub>2</sub>-PFB-MO, 0,27 bis 0,36 für Thromboxan B<sub>2</sub>-PFB-MO, 0,095 ±0,002 für 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-PFB-MO, 0,12 ±0,005 für PGF<sub>2α</sub>-PFB sowie 0,09 ±0,005 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-PFB.

Während die beiden Methoxim-Isomere von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> mit höherer Polarität gleiche R<sub>f</sub>-Werte zeigten, war der Unterschied der R<sub>f</sub>-Werte 0,11 ±0,02 für die Methoxim-

Isomere von geringerer Polarität. Somit ist die TLC-Trennung der unpolaren Methoxim-Isomere von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> möglich.

#### 4.1.4.4 Chemische Umwandlung von 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub> in Prostaglandin E<sub>2</sub>

Insbesondere in wässrigen Systemen unterliegt PGE<sub>2</sub> der Umwandlung zu PGA<sub>2</sub> und weiter zu PGB<sub>2</sub> [373]. Mechanistisch handelt es sich um eine basenkatalysierte Elimination nach dem E1cB-Mechanismus. Bei neutralem pH-Wert kommt es zur intramolekularen Basenkatalyse [373]. Übergangszustand ist immer ein Enol-/Enolat-Intermediat der Keto-Enol-Tautomerie der 9-Oxo-Gruppe des PGE<sub>2</sub>. Die Keto-Enol-Tautomerie der 9-Oxo-Gruppe sollte auch Auswirkungen auf die Stereochemie am C(8) haben.

*Umwandlung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> in PGB<sub>2</sub>.* Zur Untersuchung der Isomerisierung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> wurden jeweils 5 µg 8-iso-PGE<sub>2</sub> oder PGE<sub>2</sub> in 100 µl wässriger LiOH bei pH 7 bis 8 oder pH > 8 für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Umwandlung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> und PGB<sub>2</sub> sowie die Umwandlung von PGE<sub>2</sub> zu 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGB<sub>2</sub> wurde mit HPLC nach 3.4.1 untersucht. Die gemessenen Peakflächen sind in Tab. 8 wiedergegeben. Die Analyse von jeweils 1 µg der freien Säuren ergab folgende Retentionszeiten (min) für die Analyten: 22,68 ± 0,21 für 8-iso-PGE<sub>2</sub>, 25,05 ± 0,25 für PGE<sub>2</sub> und 37,30 ± 0,16 für PGB<sub>2</sub> (n=4).

Tab. 8. Peakflächen von 8-iso-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGB<sub>2</sub> aus der HPLC-Analyse von 8-iso-PGE<sub>2</sub> oder PGE<sub>2</sub> nach 15 min Inkubation in wässriger LiOH. Detektion bei 205 nm.

| Ansatz                          | Peakflächen            |                  |                   |
|---------------------------------|------------------------|------------------|-------------------|
|                                 | 8-iso-PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub> | PGB <sub>2</sub>  |
| 8-iso-PGE <sub>2</sub> , pH 7-8 | 1.738.000              | 781.000          | n.d. <sup>a</sup> |
| PGE <sub>2</sub> , pH 7-8       | 101.000                | 2.826.000        | n.d.              |
| 8-iso-PGE <sub>2</sub> , pH >8  | n.d.                   | 101.000          | 2.892.000         |
| PGE <sub>2</sub> , pH >8        | n.d.                   | 104.000          | 3.580.000         |

<sup>a</sup>n.d., nicht detektierbar

Die Bildung von PGB<sub>2</sub> aus 8-iso-PGE<sub>2</sub> oder PGE<sub>2</sub> bei pH 7-8 ist unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisbar. Es kommt jedoch zu einer raschen Epimerisierung der Stereochemie an C(8). Das Gleichgewicht liegt auf der Seite von PGE<sub>2</sub>. Für PGE<sub>1</sub> und 8-iso-PGE<sub>1</sub> wurde im Gleichgewicht ein Verhältnis von 9:1 bestimmt [68]. Unter alkalischen

Bedingungen kommt es zur fast vollständigen Umwandlung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> zu PGB<sub>2</sub>.

*Diskussion.* Die Bildung von 8-iso-PGE<sub>1</sub> aus PGE<sub>1</sub> ist für milde alkalische Bedingungen beschrieben [68,374]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es auch bei pH 7-8 zur Epimerisierung der Stereochemie an C(8) von PGE<sub>2</sub> kommt. Eine Stabilisierung des Enolat-Ions durch Kationen wie Li<sup>+</sup> ist nicht auszuschließen. Das Gleichgewicht liegt auf der Seite des PGE<sub>2</sub>-Isomers. Dies könnte Konsequenzen für die Quantifizierung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> in biologischen Proben zur Folge haben. Auch hier ist eine Epimerisierung zu PGE<sub>2</sub> zu erwarten. Dies könnte erklären, warum im Urin von Menschen kein 8-iso-PGE<sub>2</sub> detektiert werden konnte (siehe 5.1.1).

#### 4.1.5 Bildung von Isoprostanen durch die PGH<sub>2</sub>-Synthase

Neben der nichtenzymatischen Bildung der Isoprostane wird auch ihre enzymatische Entstehung diskutiert. Nachfolgend sind die Versuchsergebnisse der *in vitro*-Bildung von Prostaglandinen und Isoprostanen durch die beiden Isoformen der PGH<sub>2</sub>-Synthase sowie die der Hemmung ihrer Bildung dargestellt.

*Inkubationen mit PGH<sub>2</sub>-Synthase-I und -II und Aufarbeitung der Proben.* PGH<sub>2</sub>-Synthase-I (COX-I, Cayman, 50 U) oder PGH<sub>2</sub>-Synthase-II (COX-II, Cayman, 25 U) wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 % Tween 20, 2 mM Phenol und 1 μM Hematin mit 1 μM Diclofenac (Aldrich), 100 μM S-Nitrosocystein (SNC) [375] oder 47 μM S-Nitrosoglutathion (GSNO) [375] für 5 min bei 37 °C inkubiert. Mit 25 μM Arachidonsäure (Sigma) wurde anschließend die Synthese von Prostaglandinen und Isoprostanen gestartet. Nach 2,5 min wurde die Katalyse mit 10 %iger Ameisensäure gestoppt. Die GC-Tandem-MS-Analyse von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> erfolgte nach 4.1.1.1 und 4.1.4.3. Die Prostaglandine PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> wurden wie beschrieben analysiert [198].

*PGH<sub>2</sub>-Synthase-I.* Wie Abb. 25 zeigt, katalysiert die PGH<sub>2</sub>-Synthase-I die Bildung von PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure. Daneben kommt es auch zur Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>. Der Anteil jedes Isoprostanes am gebildeten Prostaglandin beträgt für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 2,9 % und für 8-iso-PGE<sub>2</sub> 0,5 % und für die Summe 1,2 %. Sowohl die Prostaglandin-

als auch die Isoprostan-Bildung sind Enzym-katalysiert, da sie sich durch Diclofenac hemmen lassen (Abb. 25). Die Hemmung ist für alle untersuchten Produkte > 90 %. Auch für die *S*-Nitrososubstanz SNC kommt es zur fast vollständigen Inhibition der Prostaglandin- und Isoprostan-Bildung.

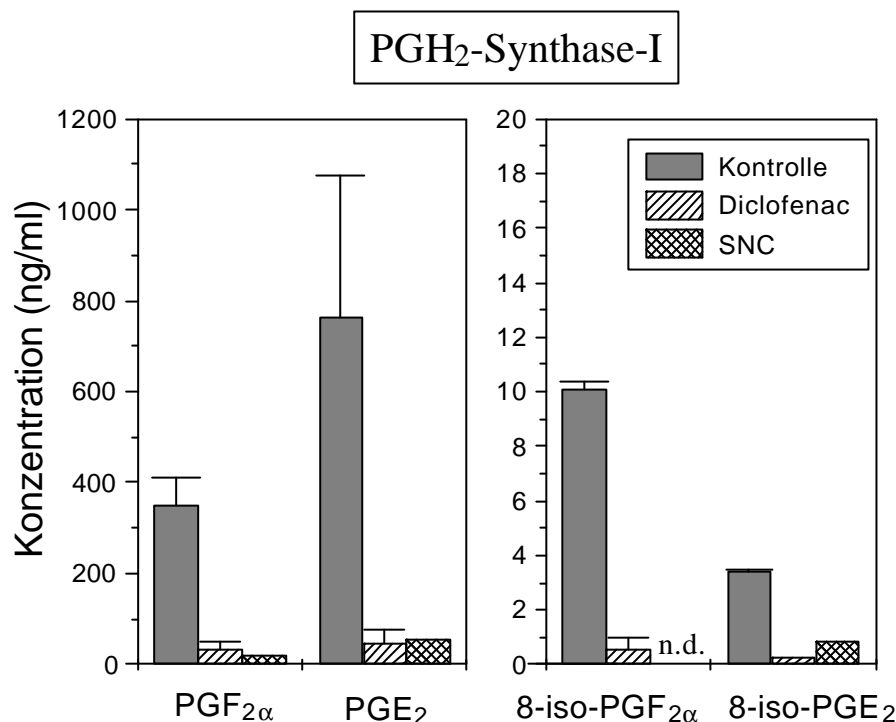


Abb. 25. Prostaglandin- und Isoprostan-Bildung nach *in vitro*-Inkubation von Arachidonsäure (25  $\mu$ M) mit PGH<sub>2</sub>-Synthase-I (50 U) in der Abwesenheit (Kontrolle) und in der Gegenwart von Diclofenac (1  $\mu$ M) oder *S*-Nitrosocystein (SNC, 100  $\mu$ M), Mittel  $\pm$ SD (n=2); n.d., nicht detektierbar.

*PGH<sub>2</sub>-Synthase-II.* Auch die PGH<sub>2</sub>-Synthase-II katalysiert die Bildung von PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>. Der Anteil jedes Isoprostanes am gebildeten Prostaglandin beträgt für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> 0,8 % und für 8-iso-PGE<sub>2</sub> 1,4 % und für die Summe 1,0 %. Sowohl die Prostaglandin- als auch die Isoprostan-Bildung sind Enzym-katalysiert, da sie sich durch Diclofenac zu über 90 % hemmen lassen. Für die *S*-Nitrososubstanz GSNO kommt es zur fast vollständigen Inhibition der Prostaglandin- und Isoprostan-Bildung. Berücksichtigt man die geringere eingesetzte katalytische Aktivität der PGH<sub>2</sub>-Synthase-II (25 U), so ist die Ausbeute an PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit einem Anteil von 31, 20 und 8 % an den durch die PGH<sub>2</sub>-Synthase-I katalysierten Mengen gering.

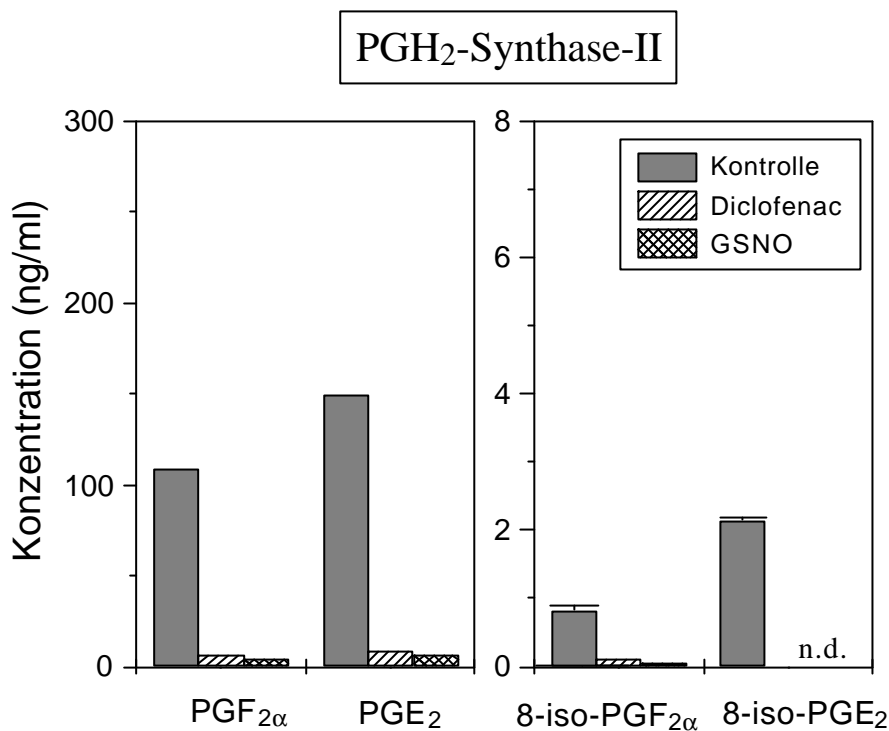


Abb. 26. Prostaglandin- und Isoprostan-Bildung nach *in vitro*-Inkubation von Arachidonsäure (25  $\mu$ M) mit PGH<sub>2</sub>-Synthase-II (25 U) in der Abwesenheit (Kontrolle) und in der Gegenwart von Diclofenac (1  $\mu$ M) oder *S*-Nitrosoglutathion (GSNO, 47  $\mu$ M), Mittel  $\pm$ SD (n=2 für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>); n.d., nicht detektierbar.

*Diskussion.* Neben der Bildung von Prostaglandinen ist die Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> durch *in vitro*-Inkubationen mit PGH<sub>2</sub>-Synthase-I und -II bekannt [151]. Während Klein *et al.* ein Verhältnis von PGF<sub>2α</sub> zu 8-iso-PGF<sub>2α</sub> von 18:1 für beide Isoenzyme finden [151], liegt das hier gefundene Verhältnis mit 125:1 (0,8 % 8-iso-PGF<sub>2α</sub>) für die PGH<sub>2</sub>-Synthase-II deutlich darüber. Nicht die direkte Bildung von PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> wird durch die PGH<sub>2</sub>-Synthase katalysiert, sondern die von PGH<sub>2</sub> [80,81]. PGH<sub>2</sub> ist jedoch instabil und isomerisiert u.a. zu PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub> oder wird zu PGF<sub>2α</sub> reduziert [153]. Das dem Reaktionsansatz zugesetzte Hemin diente hier möglicherweise als Reduktans. Kommt es zur Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, so ist auch die Bildung anderer 8-iso-Isomere zu erwarten. In der Tat konnte die Bildung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> in ähnlichen Konzentrationen wie 8-iso-PGF<sub>2α</sub> gezeigt werden. Interessanterweise kehrt sich die Reihenfolge der Ausbeute an den beiden Isoprostanen für PGH<sub>2</sub>-Synthase-I und -II um. Die Summe der gebildeten Isoprostane hat jedoch für beide Isomere der PGH<sub>2</sub>-Synthase einen Anteil von etwa 1 % an der Summe von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> und ist damit relativ gering.



Diclofenac ist ein potenter Inhibitor beider Isoformen der  $\text{PGH}_2$ -Synthase, der das Enzym durch reversible sterische Blockade des aktiven Zentrums inhibiert [376]. Die *S*-Nitrososubstanzen SNC und GSNO zeigten ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die durch die  $\text{PGH}_2$ -Synthase katalysierte Bildung von Prostaglandinen und Isoprostanen, jedoch erst in einer höheren Konzentration. Die inhibierende Wirkung von *S*-Nitrososubstanzen auf die  $\text{PGH}_2$ -Synthase wird diskutiert, eine reversible Transnitrosylierung der nicht im aktiven Zentrum befindlichen Cystein-Reste 313 und 540 ist möglich [296,297,300]. Die Deaktivierung der  $\text{PGH}_2$ -Synthase durch zwei unterschiedliche Inhibitoren führte sowohl für die Prostaglandin- als auch die Isoprostan-Bildung zu einer Hemmung.

#### 4.1.6 Effekt der Inhibierung der Prostaglandin $\text{H}_2$ -Synthase auf die physiologische Bildung von 8-iso-Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$

Die Bedeutung der *in vivo*-Bildung von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  durch die  $\text{PGH}_2$ -Synthase für die physiologischen Konzentrationen von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  wird kontrovers diskutiert [149-152]. Daher wurde die Ausscheidung von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  in den menschlichen Urin nach Gabe von Diclofenac mit der hier entwickelten Methode untersucht.

Die Exkretion von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 2,3-Dinor-Thromboxan ( $\text{Tx}$ )  $\text{B}_2$  und 2,3-Dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  in den Urin eines gesunden Probanden (40 Jahre, 93 kg) wurde an fünf aufeinander folgende Tage bei täglicher Gabe von 2x 50 mg Diclofenac (Ratiopharm, Ulm) quantifiziert. 2,3-Dinor- $\text{TxB}_2$  und 2,3-Dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  sind die Metabolite der enzymatisch gebildeten Prostanoiden Thromboxan und Prostacyclin im menschlichen Urin [195]. Zur Aufreinigung der biologischen Proben und zur Quantifizierung von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  mit GC-Tandem-MS wurde die unter 4.1.1.1 beschriebene Methode verwendet. Die GC-Tandem-MS-Analytik von 2,3-Dinor- $\text{TxB}_2$  und 2,3-Dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  erfolgte nach [195]. Am Kontrolltag wurden 513 ng/24 h, 359 ng/24 h und 79 ng/24 h von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 2,3-Dinor- $\text{TxB}_2$  und 2,3-Dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  mit dem Urin ausgeschieden. Für 2,3-Dinor- $\text{TxB}_2$  und 2,3-Dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  kommt es nach einem Tag zu einer 56 bzw. 58 %igen Hemmung der Prostanoid-Biosynthese (Abb. 27). Im weiteren Verlauf ist die 2,3-Dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Ausscheidung sogar zu 75 % reduziert. Die Ausscheidung von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  in den Urin nimmt zunächst leicht ab, steigt am 2. Tag jedoch an. Erst mit dem dritten Tag reduziert sich die Ausscheidung von 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  im Mittel (3. bis 5. Tag) um 36 % gegenüber dem Ausgangswert (Kontrolle).

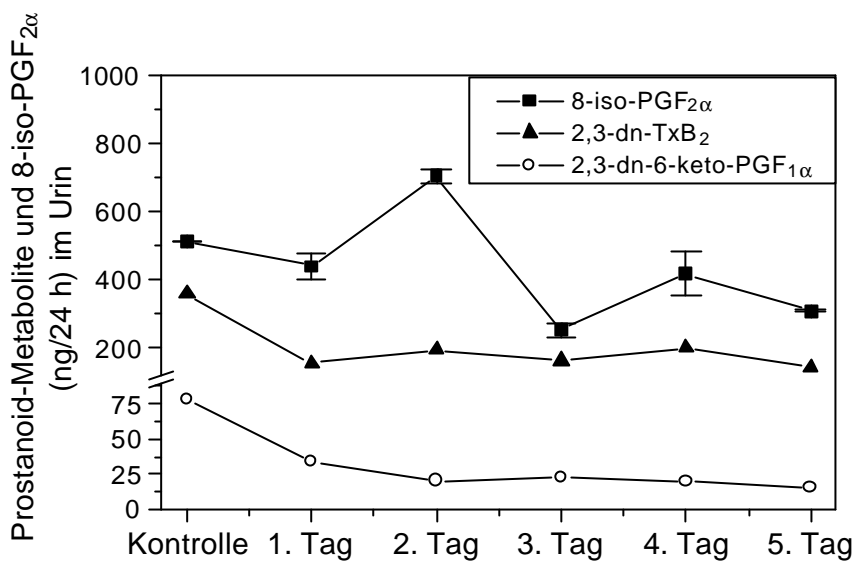


Abb. 27. Verteilung der Tagesausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> (2,3-dn-TxB<sub>2</sub>) und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> (2,3-dn-6-keto-PGF<sub>1α</sub>) in den Urin eines gesunden Probanden bei fünftägiger Gabe von Diclofenac (100 mg/d). Für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> Mittel ±SD, Doppelbestimmung).

*Diskussion.* Die 24 h-Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> am Kontrolltag entspricht anderen publizierten Werten [194,208,377]. Die Reduktion der *in vivo*-Prostanoid-Biosynthese durch Diclofenac ist bekannt [378]. Mit dem 3. Tag der Diclofenac-Gabe kam es jedoch auch zur Reduktion der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den Urin um 36 %. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer 21 %igen Reduktion der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung nach 2tägiger Indomethacin-Gabe (1,85 mg/kg/d) [150,151]. Die Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wird jedoch nicht in gleichem Ausmaß reduziert wie die Ausscheidung von 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Auch setzt die Reduktion der Ausscheidung im Gegensatz zu 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> erst nach mehrtägiger Gabe von Diclofenac (oder Indomethacin) ein.

#### 4.1.7 Isoprostane als Mediatoren des oxidativen Stresses: Organbad-Versuche

Die gefäßverengende Wirkung von PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf isolierte Arterien und Aorten der Ratte, des Schweins sowie des Rinds ist bekannt [179-181]. An isolierten Herzen von Meerschweinchen konnte gezeigt werden, dass neben 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> als Vasokonstriktor etwa gleicher Potenz wirkt [163]. In der vorliegenden Arbeit wurden die

gefäßverengenden Eigenschaften der Prostaglandine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  mit denen der Isoprostane 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  und 8-iso- $\text{PGE}_2$  für menschliche Blutgefäße miteinander verglichen.

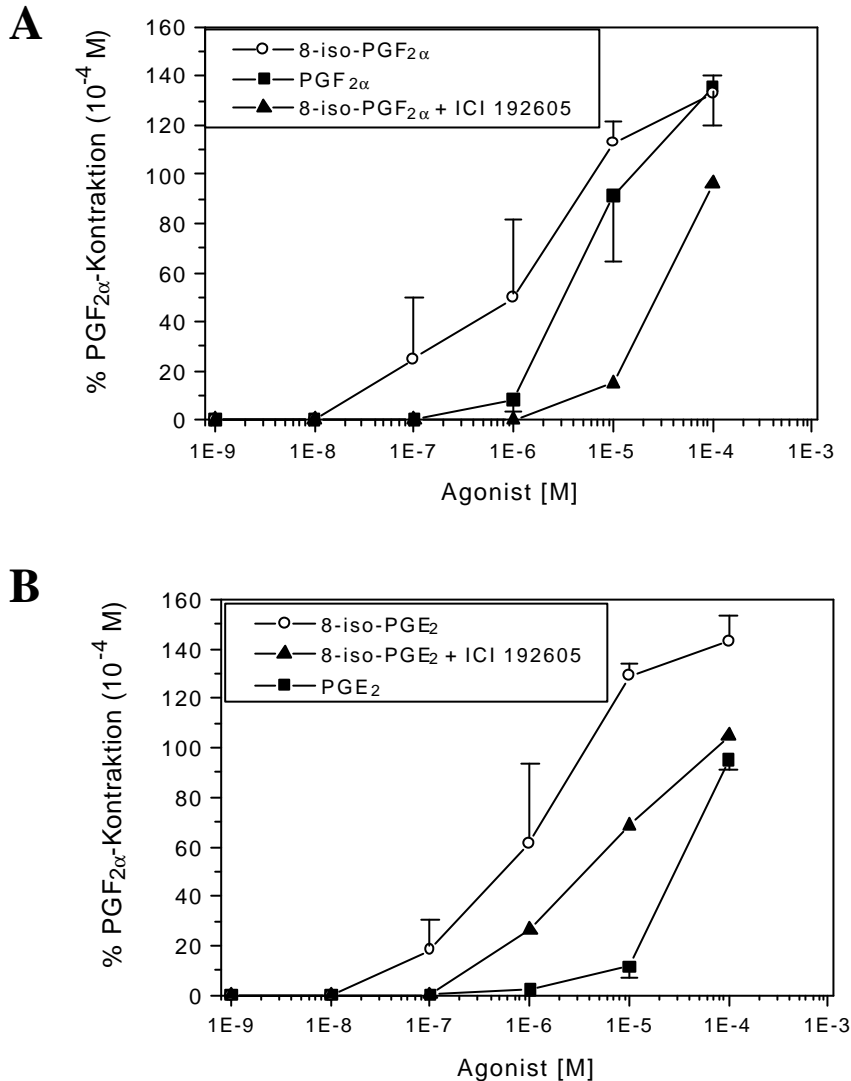


Abb. 28. Vergleich der *in vitro*-Kontraktion von Segmenten menschlicher arterieller Blutgefäße (*arteria mammaria*) durch (A)  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  und (B)  $\text{PGE}_2$  und 8-iso- $\text{PGE}_2$  (Mittel  $\pm$ SD,  $n=3$ ). Hemmung ( ) der durch Isoprostane hervorgerufenen Kontraktion durch  $10^{-4}$  M ICI 192605 ( $n=1$ ).

*Organbad.* Die Inkubation der Prostaglandine und Isoprostane erfolgte im Organbad in 50 ml Krebs-Puffer (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 24 mM  $\text{NaHCO}_3$  und 11 mM Glucose) bei 37 °C und 95 %  $\text{O}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  nach [379]. Arterielle Blutgefäße (*arteria mammaria*) von vier Probanden (Alter  $71 \pm 6$  Jahre) wurden in 3 mm große Segmente zerteilt und im Organbad mit optimaler Spannung (0,4 bis 1,6 g) gedehnt. Zur ersten Kontraktion wurde mit  $10^{-4}$  M  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inkubiert (10 min)

und die weiteren Kontraktionen wurden als prozentualer Anteil an der ersten Kontraktion gemessen. Der Zusatz der Prostaglandine und Isoprostane erfolgte nach jeweiliger Relaxation der Blutgefäße durch mehrfaches Spülen mit Krebs-Puffer. Zur Hemmung der Kontraktion wurde der Thromboxan-Rezeptor-Antagonist ICI 192605 (Zeneca Pharmaceuticals, Cheshire, UK) in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M eingesetzt (30 min Inkubation).

*Ergebnisse und Diskussion.* Sowohl 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> erweisen sich als sehr potente Vasokonstriktoren der *arteria mammaria* im Organbad-Versuch (Abb. 28). Die graphisch ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> sind mit  $2 \times 10^{-6}$  M und  $1,5 \times 10^{-6}$  M 2-3mal kleiner als der von PGF<sub>2α</sub> ( $5 \times 10^{-6}$  M). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Abb. 28 (A)) für menschliches arterielles Gewebe entsprechen denen, die für arterielle Blutgefäße von Rind, Schwein und Ratte beschrieben sind [179-181]. Die neben der bekannten vasodilatatorischen Eigenschaft von PGE<sub>2</sub> gefundene Vasokonstriktion für höhere Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> (Abb. 28 (B)) bestätigt andere Ergebnisse [182]. Interessanterweise übertrifft 8-iso-PGE<sub>2</sub> noch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in seiner vasokonstriktorischen Potenz. Durch den Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten ICI 192605 ( $10^{-4}$  M) wird die vasokonstriktive Wirkung beider Isoprostane gehemmt. Die Hemmung beträgt 96 % für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 75 % für 8-iso-PGE<sub>2</sub>. Offensichtlich wird die vasokonstriktive Wirkung beider Isoprostane über den Thromboxan-Rezeptor vermittelt.

## 4.2 3-Nitrotyrosin

Zunächst wurde eine analytische Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in menschlichem Blutplasma entwickelt (4.2.1). Eine Erweiterung der Methode durch die enzymatische Hydrolyse von Proteinen zu Aminosäuren erlaubt die anschließende quantitative Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen des menschlichen Blutplasmas (4.2.2). 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure wird als Metabolit von 3-Nitrotyrosin im Urin diskutiert. Nach entsprechender Aufreinigung ist die Bestimmung von 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure in Urin prinzipiell möglich (4.2.3). Die entwickelten, auf GC-Tandem-MS basierenden Methoden wurden zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin, 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen und von 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure in Untersuchungen zum Metabolismus von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen (4.2.4) und in klinischen Studien eingesetzt.

### 4.2.1 3-Nitrotyrosin als freie Aminosäure

#### 4.2.1.1 Analytische Methode (Abb. 29)

*Biologische Proben – Blut, Plasma und Ultrafiltrat.* 5 ml venöses Blut wurden in EDTA-Monovetten abgenommen und sofort auf Eis gestellt. Anschließend ist 15 min bei 4 °C und 1500 g zentrifugiert worden. Das gewonnene Plasma wurde bei -78 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Ultrafiltrat wurde von 2 ml-Aliquots aufgetauten Plasmas durch Zentrifugation über 1 h bei 1500 g und 4 °C gewonnen. Es wurden Centriscart I-Ultrafiltrationskartuschen verwendet (20 kDa cut-off, 4 µm Porengröße, 2,5 ml, Sartorius, Göttingen). Zuvor wurden jeweils 2 ml Plasma mit 10 pmol 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als internem Standard versetzt.

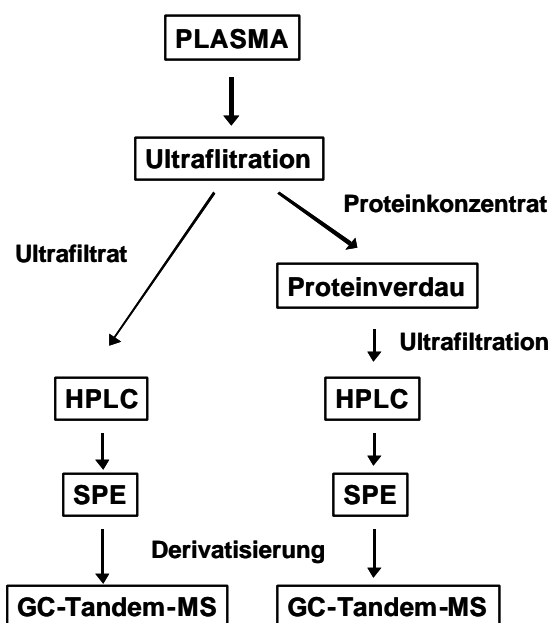


Abb. 29. Schematisches Diagramm der analytischen Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin (links) und 3-Nitrotyrosin-Resten in Plasmaproteinen (rechts, 4.2.2.1) in menschlichem Plasma mittels GC-Tandem-MS.

*High-performance liquid chromatography.* Zur Trennung der underivatisierten Aminosäuren wurde das unter 3.4.3 beschriebene HPLC-System verwendet. Die Retentionszeiten (min) betragen:  $1,05 \pm 0,02$  für Nitrat,  $3,21 \pm 0,03$  für Tyrosin,  $5,15 \pm 0,02$  für Nitrit,  $9,04 \pm 0,09$  für 3-Nitrotyrosin und  $9,10 \pm 0,05$  für *p*-Nitrophenylalanin ( $n=5$ ). Die Retentionszeiten für Nitrat und Nitrit wurden durch GC-MS-Analyse bestätigt [380]. *p*-Nitrophenylalanin und 3-Nitrotyrosin haben fast identische Retentionszeiten unter den gewählten HPLC-Bedingungen in der GC-Tandem-MS-Analytik. *p*-Nitrophenylalanin interferiert nicht in der GC-Tandem-MS-

Analyse von 3-Nitrotyrosin (nicht gezeigt). Um Kontaminationen der Proben zu vermeiden, wurde die Retentionszeit von 3-Nitrotyrosin für jede Serie von Analysen ( $n \leq 20$ ) mit *p*-Nitrophenylalanin bestimmt. 200  $\mu$ l-Aliquots des Ultrafiltrats wurden jeweils chromatographiert; 3 ml Eluat wurden um die Retentionszeit von *p*-Nitrophenylalanin gesammelt und extrahiert.

*Festphasenextraktion, Derivatisierung und massenspektrometrische Analyse.* Zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin mittels GC-Tandem-MS wurden die Proben nach Festphasenextraktion (siehe 3.1.2) zum *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat umgesetzt (siehe 3.2). CAD der Ionen mit  $m/z$  396 und 399 führte zu den Produktionen mit  $m/z$  379 und 382 für die *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate, welche selektiv mit dem unter 3.5.2 beschriebenen GC-Tandem-MS-System detektiert wurden (SRM).

#### 4.2.1.2 Interner Standard

Als interner Standard für die massenspektrometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin eignet sich 3-Nitrotyrosin nach Austausch von  $^{12}\text{C}$ , H,  $^{14}\text{N}$  oder  $^{16}\text{O}$  durch entsprechende stabile Isotope. Leeuwenburgh *et al.* beschreiben eine GC-MS-Methode, bei der sie 3-Nitro- $^{13}\text{C}_6$ tyrosin als internen Standard verwenden [327]. Zur Synthese des internen Standards wurde  $^{13}\text{C}_6$ Tyrosin mit dem sehr toxischen und explosiven Tetranitromethan zum 3-Nitro- $^{13}\text{C}_6$ tyrosin umgesetzt [221]. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit L- $^2\text{H}_4$ Tyrosin mit Nitriersäure zu 3-Nitro-L- $^2\text{H}_3$ tyrosin umgesetzt [381], welches dann für die GC-Tandem-MS-Analyse von 3-Nitrotyrosin als interner Standard eingesetzt wurde.

*Synthese von 3-Nitro-L- $^2\text{H}_3$ tyrosin.* 30  $\mu$ mol L- $^2\text{H}_4$ Tyrosin (Isotec, 98 Atom %  $^2\text{H}$ ) und 60  $\mu$ mol  $\text{NaNO}_3$  wurden in 600  $\mu$ l Wasser bei 0 °C vorgelegt. Nitriersäure wurde *in situ* durch langsame Zugabe von 300  $\mu$ l eiskalter konz. Schwefelsäure unter Rühren generiert. Nach einer Stunde im Eisbad ist die Reaktion durch Zugabe von eiskalter 5 M NaOH gestoppt worden. Der pH-Wert der gelben Lösung wurde auf pH 2-3 eingestellt. Sowohl für die Aufreinigung des Reaktionsproduktes als auch zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes wurde das HPLC-System nach 3.4.3 mit einer Flussrate von 2 ml/min verwendet (Detektion bei 276 nm). Die gesammelte HPLC-Fraktion von 3-Nitro-L- $^2\text{H}_3$ tyrosin wurde nach 3.1.2 extrahiert. Die Elutionsphase wurde unter  $\text{N}_2$  eingeengt und 3-Nitro-L- $^2\text{H}_3$ tyrosin in 3 ml 1 mM HCl gelöst (Stammlösung). HPLC-Analyse der Stammlösung zeigte, dass diese mindestens 6 Monate bei 4 °C stabil ist. Verdünnungen in 1 mM HCl wurden bei -20 °C gelagert.

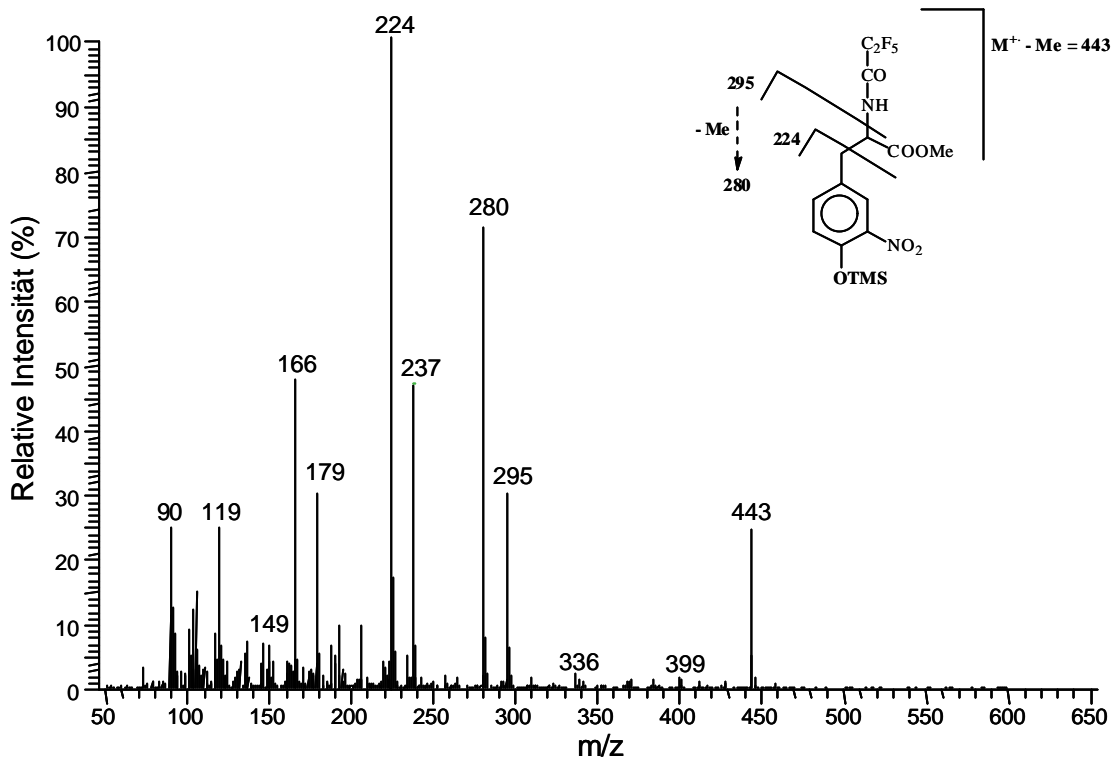
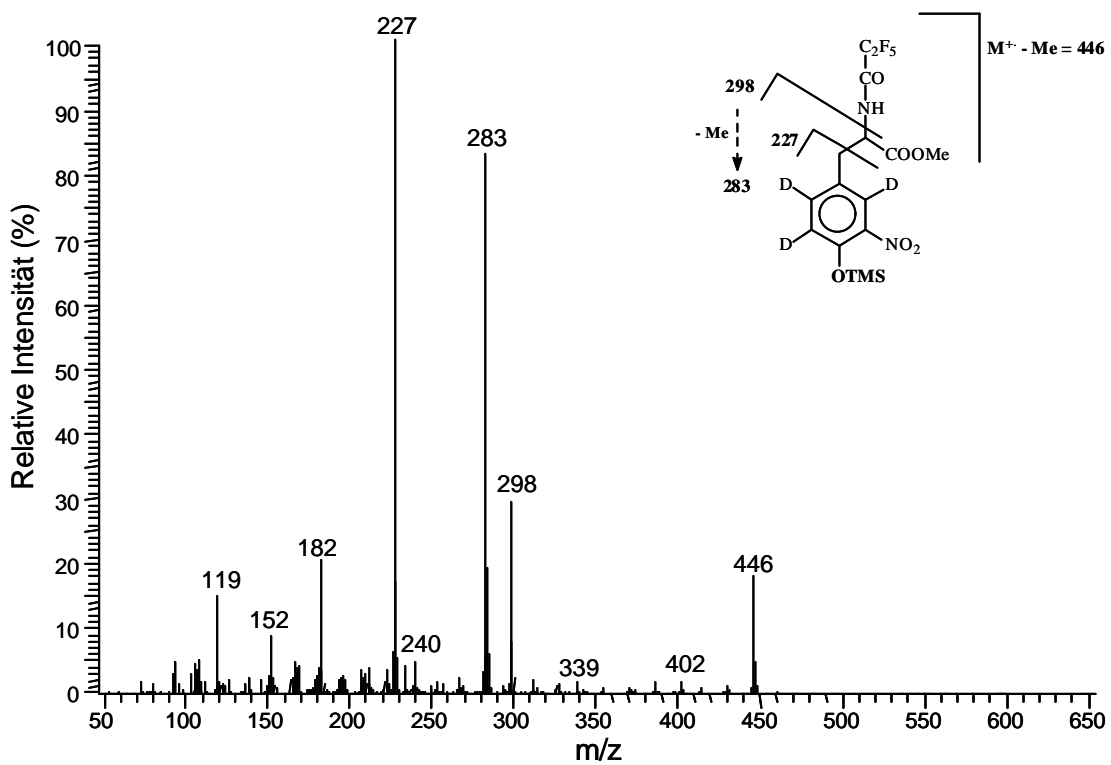
**A****B**

Abb. 30. EI-Massenspektren der Me-PFP-TMS-Derivate von 3-Nitro-L-tyrosin (A) und 3-Nitro-L- $[^2H_3]$ tyrosin (B). Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

*Massenspektrometrische Charakterisierung des Produktes der Nitrierung.* Es wurden die EI-Spektren der Me-PFP-TMS-Derivate des Produktes und von 3-Nitro-L-tyrosin (Aldrich) aufgenommen. SIM der Ionen mit  $m/z$  396 und 399 wurde durchgeführt. Es wurde das GC-MS-System nach 3.5.2 unter EI-Bedingungen verwendet.

Sowohl 3-Nitrotyrosin als auch das Produkt der Nitrierung eluieren zur gleichen Zeit von der GC-Säule (9,74 min). Beide Massenspektren zeigen nicht das Molekülion ( $M^+$ ), jedoch das Ion  $[M - 15]^+$  mit  $m/z$  443 für 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  446 für 3-Nitro- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin (Abb. 30). Weitere Ionen entstehen durch den Verlust der  $\text{C}_2\text{F}_5\text{C}(=\text{O})\text{NH}$ -Gruppe und weiteren Verlust einer Methyl-Gruppe:  $m/z$  280 für 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  283 für 3-Nitro- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin. Durch sukzessiven Verlust der Carboxyl-Gruppe und der Methylen-Gruppe entstehen die Fragmente  $m/z$  224 für 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  227 für 3-Nitro- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin. Das  $m/z$ -Verhältnis ist für 3-Nitro- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin jeweils um 3 Da größer als für 3-Nitrotyrosin. Somit konnte das Produkt der Nitrierung von  $^{2}\text{H}_4$ Tyrosin eindeutig als 3-Nitro- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin identifiziert werden. Der Verlust eines Deuterium-Atoms am Benzolring wird durch die Substitution durch die Nitrogruppe erklärt.

*Bestimmung der Reinheit, Ausbeute und der isotopischen Reinheit des Produktes der enzymatischen Synthese.* Die HPLC-Analyse der Stammlösung von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin zeigt einen einzigen Peak bei 278 nm (Abb. 31). Die Retentionszeit von 3-Nitro-L-tyrosin ( $6,94 \pm 0,03$  min) ist mit der von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin ( $7,04 \pm 0,09$  min) nahezu identisch. Tyrosin ( $4,42 \pm 0,01$  min) ist in der Stammlösung von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin nicht mehr nachzuweisen.

UV/vis-Spektren von 3-Nitrotyrosin wurden in 15 mM NaOH/10 mM NaCl von 200 bis 600 nm in 1-ml Quarzküvetten aufgenommen. Als UV/vis-Spektrometer diente ein U-2000-Spektrometer von Hitachi (Tokyo, Japan). Das UV/vis-Spektrum von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin in 15 mM NaOH/10 mM NaCl zeigt ein Maximum von 428 nm und ist mit dem von 3-Nitro-L-tyrosin identisch (siehe Anhang). Teilt man die ermittelte Absorption bei 428 nm durch die bei 340 nm, so erhält man einen Faktor von 4,9. Dieser stimmt mit dem Literaturwert von 5,1 für 3-Nitrotyrosin gut überein [222].

Zur Bestimmung der Ausbeute der Nitrierung von L- $^{2}\text{H}_4$ Tyrosin zu 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin wurde eine Kalibrierkurve von 3-Nitro-L-tyrosin erstellt. Dazu wurde eine 2 mM 3-Nitro-L-



tyrosin Lösung in 1 mM HCl angesetzt. Die Absorption bei 428 nm verschiedener Verdünnungen in 15 mM NaOH/10 mM NaCl wurde gegen die Konzentration aufgetragen (Abb. 32). Eine geeignete Verdünnung der 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin Stammlösung wurde unter gleichen Bedingungen gemessen. Die anhand der Kalibrierkurve ermittelte Konzentration der Stammlösung betrug 3 mM. Die Ausbeute der Synthese von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin betrug 80 %. Die exakte Konzentration von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin in der Stammlösung wurde durch Standardisierung mit GC-MS ermittelt. Dazu wurden jeweils 100 pmol 3-Nitro-L-tyrosin mit unterschiedlichen Mengen von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin (0-500 pmol) derivatisiert. Die *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate wurden mit GC-MS unter NICI-Bedingungen im SIM-Modus,  $m/z$  396 ( $[\text{M} - \text{TMSOH}]^-$ ) für 3-Nitro-L-tyrosin und  $m/z$  399 ( $[\text{M} - \text{TMSOH}]^-$ ) für 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin, analysiert. Die lineare Regression zwischen den Peakflächenverhältnisse (SIM von  $m/z$  399 zu  $m/z$  396) ( $y$ ) und dem Verhältnis der eingesetzten Menge von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin zu 3-Nitro-L-tyrosin ( $x$ ) ergab eine Gerade der Gleichung:  $y = 0,01 + 1,026x$  ( $r^2=0,999$ ). Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die Konzentration von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin in der Stammlösung zu 3,08 mM. Dies entspricht einer Gesamtausbeute der Nitrierung von 31 %. Ausbeuteverluste sind durch die SPE- und HPLC-Aufreinigung bedingt. Eine weitere Erklärung ist ein nicht quantitativer Umsatz.

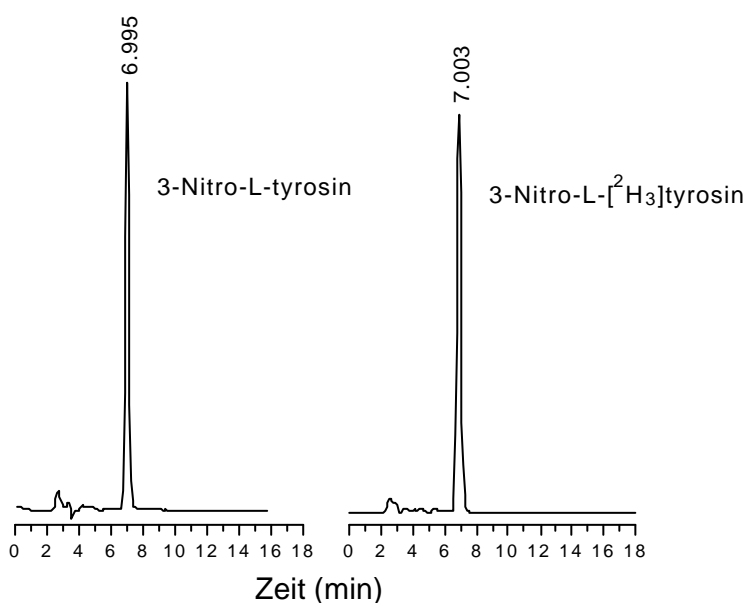


Abb. 31. HPLC-Chromatogramme von 3-Nitro-L-tyrosin (links) und von synthetisiertem 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin (rechts). Es wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  analysiert. Eluent:  $\text{H}_2\text{O}$ /Methanol, 92:8 (v/v), 2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{l}$ , pH 2,5; Flussrate: 2 ml/min. Absorptionsmessung bei 276 nm.

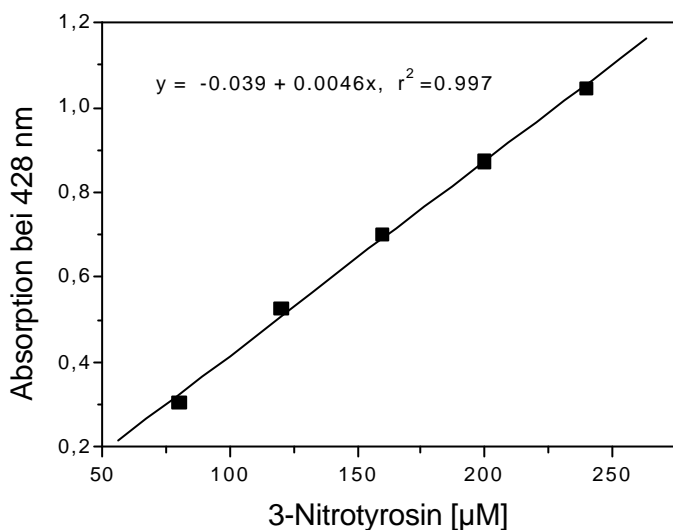


Abb. 32. UV/vis-Kalibrierkurve von 3-Nitro-L-tyrosin in 15 mM NaOH/10 mM NaCl.

Die isotopische Reinheit von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin wurde durch SIM der Ionen der *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate mit  $m/z$  396 für nichtmarkiertes 3-Nitro-L-tyrosin und  $m/z$  399 für 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin bestimmt. Die Menge an nicht markiertem 3-Nitro-L-tyrosin betrug 2 %. Dies entspricht der isotopischen Reinheit des Ausgangsmaterials L- $^{2}\text{H}_4$ tyrosin.

**Zusammenfassung.** Die Nitrierung von L- $^{2}\text{H}_4$ tyrosin mit Nitriersäure ergibt ein Produkt in relativ guter Ausbeute und hoher isotopischer Reinheit. Die stereoselektive Nitrierung an C(3) des aromatischen Systems führt zur Bildung von 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin. Dabei aktiviert die Hydroxylgruppe an C(4) den Aromaten für die  $\text{S}_{\text{E}}$  und wirkt *ortho*-dirigierend. Die beschriebene synthetische Route ist einfach, gefahrlos und liefert ein definiertes Reaktionsprodukt. Das Ausgangsmaterial L- $^{2}\text{H}_4$ tyrosin ist wohlfeil im Vergleich zu  $^{13}\text{C}_6$ tyrosin [327]. 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin erfüllt die Kriterien zur Eignung als interner Standard für die quantitative massenspektrometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in biologischen Proben.

#### 4.2.1.3 NICI-Massenspektren

**Derivate.** Massenspektren der Substanzen 3-Nitro-L-tyrosin, 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin (Synthese siehe 4.2.1.2) und 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ tyrosin (450 Ci/mmol, Synthese in [82]) wurden von den entsprechenden *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivaten aufgenommen. Dazu wurden jeweils 1 µl

Aliquots der Lösungen der fertigen Derivate in BSTFA (10 ng Substanz/ $\mu$ l BSTFA) splitlos in das GC-MS-System injiziert.

*Gaschromatographie-(Tandem) Massenspektrometrie.* Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Spektren wurden unter NICI-Bedingungen mit dem unter 3.5.2 beschriebenen GC-MS-System aufgenommen. Die Retentionszeit (min) der einzelnen *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate betrug: 9,80 für 3-Nitro-L-tyrosin, 9,80 für 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin und 9,83 für 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ tyrosin.

Tab. 9. GC-MS- und GC-Tandem-MS-NICI-Massenspektren der *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate von 3-Nitro-L-tyrosin, 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin und 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ tyrosin.<sup>a</sup>

| Massenfragment /Verbindung <sup>a</sup>                       | 3-Nitro-L-tyrosin | 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin | 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ tyrosin |
|---|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>GC-MS-Massenspektren</i>                                   |                   |                                     |                                      |
| $[\text{M}]^-$  | n.d. <sup>b</sup> | n.d.                                | n.d.                                 |
| $[\text{M} - \text{HF}]^-$                                    | 466 (6)           | 469 (20)                            | 484 (22)                             |
| $[\text{M} - (\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{CH}_2]^-$         | 414 (10)          | 417 (50)                            | 432 (25)                             |
| $[\text{M} - \text{TMSOH}]^-$                                 | 396 (100)         | 399 (100)                           | 414 (100)                            |
| <i>GC-Tandem-MS-Massenspektren</i>                            |                   |                                     |                                      |
| $[\text{P}]^-$  | 396 (10)          | 399 (50)                            | 414 (80)                             |
| $[\text{P} - 17]^-$   | 379 (100)         | 382 (100)                           | 397(94)                              |
| $[\textit{n}$ -Propyl-CO <sub>2</sub> -CH=N-PFP] <sup>-</sup> | 261 (78)          | 261 (55)                            | 265 (100)                            |

<sup>a</sup>Massenfragmente  $m/z$  (Intensität %) der GC-NICI-Massenspektren der *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate von 3-Nitrotyrosin und seiner isotoopenmarkierten Analoga. CAD der Ionen  $[\text{P}]^- = [\text{M} - \text{TMSOH}]^-$  für die GC-Tandem-MS-Massenspektren.

<sup>b</sup>n.d. nicht detektierbar

*Ergebnisse und Diskussion.* Die NICI-Massenspektren der *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate von 3-Nitrotyrosin und seiner isotoopenmarkierten Analoga zeigen als intensivste Ionen  $[\text{M} - \text{TMSOH}]^-$  und als etwas weniger intensive Ionen  $[\text{M} - (\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{CH}_2]^-$  und  $[\text{M} - \text{HF}]^-$  (Tab. 9). Der Verlust von HF ist typisch für *N*-perfluoroacetylierte Aminosäuren [327,329]. Die Molekülionen konnten nicht detektiert werden.

Die Ionen  $[\text{M} - \text{TMSOH}]^-$  ( $[\text{P}]^-$ ) wurden mit Argon weiter fragmentiert (CAD). Dabei entstanden unter den gewählten Kollisionsbedingungen jeweils zwei Produktionen:  $[\text{P} - 17]^-$  und  $[\textit{n}$ -Propyl-CO<sub>2</sub>-CH=N-PFP]<sup>-</sup> (Tab. 9). Das durch Verlust von 17 Da aus dem Ion  $[\text{P}]^-$  entstan-

dene Ion  $[P - 17]^-$  ist spezifisch für 3-Nitrotyrosin, da es neben den Deuterium-Atomen des 3-Nitro- $[\text{}^2\text{H}_3]$ tyrosin auch alle  $^{14}\text{C}$ -Atome des 3-Nitro- $[\text{}^{14}\text{C}_9]$ tyrosin enthält. Der Neutralmassenverlust von 17 Da ist auch bei der CAD anderer Nitroaromaten beobachtet worden [83]. Die Produktion mit  $m/z$  265 von  $^{14}\text{C}$ -markiertem 3-Nitrotyrosin hat eine um 4 Da höhere Masse als die entsprechende Produktion von unmarkiertem und  $^2\text{H}$ -markiertem 3-Nitrotyrosin ( $m/z$  261). Es enthält folglich nur noch zwei Kohlenstoffatome und ist nicht spezifisch für 3-Nitrotyrosin. Daher sind zur GC-Tandem-MS-Quantifizierung die Ionen  $[P - 17]^-$ , d. h. mit  $m/z$  379 für 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  382 für 3-Nitro- $[\text{}^2\text{H}_3]$ tyrosin gewählt worden.

Wie Tab. 9 zeigt, wird unter den gewählten Derivatisierungsbedingungen 3-Nitrotyrosin in sein *n*-Alkylester-*N*-perfluoroacylamid-TMS-Ether-Derivat überführt. Die phenolische Hydroxyl-Gruppe wird im Gegensatz zur Reaktion von 3-Aminotyrosin mit PFP-Anhydrid nicht acetyliert [329]. Durch die anschließende Silylierung der phenolischen Hydroxyl-Gruppe konnten die chromatographischen Eigenschaften des Derivates von 3-Nitrotyrosin weiter verbessert werden [330]. Zur Veresterung der Carboxyl-Gruppe von Aminosäuren wurden *n*-Propanol und Methanol eingesetzt. Der *n*-Propylester unterliegt jedoch in geringerem Maße der Hydrolyse [384]. Das generierte *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat von 3-Nitrotyrosin zeichnet sich durch sehr gute chromatographische Eigenschaften und hohe Stabilität aus. Zudem fragmentiert es unter NICI-Bedingungen nur schwach, so dass die entsprechenden Ionen mit  $m/z$  379 für 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  382 für 3-Nitro- $[\text{}^2\text{H}_3]$ tyrosin eine besonders empfindliche Detektion von 3-Nitrotyrosin im SRM-Modus erlauben.

#### 4.2.1.4 Validierung der quantitativen Methode

Die massenspektrometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in biologischer Matrix bietet gegenüber anderen Detektionsmethoden ein hohes Maß an Genauigkeit und Zuverlässigkeit. Bisherige massenspektrometrische Bestimmungsmethoden nutzen einfache GC-MS zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin [327,330,331]. Im Folgenden wurde eruiert, ob die GC-Tandem-MS-Technik zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in menschlichem Plasma geeignet ist.

*3-Nitro-L- $[\text{}^2\text{H}_3]$ tyrosin als interner Standard für 3-Nitrotyrosin.* Die Verwendbarkeit von mit Deuterium markiertem 3-Nitrotyrosin als interner Standard für die Tandem-Massenspektrometrie wurde im Konzentrationsbereich von 0 bis 20 nM in humanem Blutplasma getestet.

Dazu wurde 3-Nitro-L-tyrosin in Konzentrationen von 0, 1,25, 2,5, 5, 10 und 20 nM zusammen mit jeweils 10 nM 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin zum *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat umgesetzt. Das Verhältnis der Peakflächen der Ionen mit *m/z* 379 für 3-Nitro-L-tyrosin und *m/z* 382 für 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin wurde im SRM-Modus bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse des gemessenen Konzentrationsverhältnisses zwischen nichtmarkiertem und markiertem 3-Nitrotyrosin (*y*) und dem Konzentrationsverhältnis der Verbindungen ergab die Regressionsgleichung:  $y = 0,08 + 1,00x$  ( $r=1,000$ ). Dies zeigt die exzellente Eignung von 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als interner Standard für die GC-Tandem-MS-Analytik.

*3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als interner Standard für 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin.* Die Eignung von 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als interner Standard für die GC-Tandem-MS-Quantifizierung von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin wurde im Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 pM in humanem Blutplasma getestet. Dazu wurde 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin in Konzentrationen von 0, 100, 250, 500 und 1000 pM zusammen mit jeweils 500 pM 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin zum *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat umgesetzt. Das Verhältnis der Peakflächen der Ionen mit *m/z* 397 für 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin und *m/z* 382 für 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin wurde im SRM bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse des gemessenen Konzentrationsverhältnisses zwischen <sup>14</sup>C-markiertem und <sup>2</sup>H-markiertem 3-Nitrotyrosin (*y*) und dem Konzentrationsverhältnis der Verbindungen ergab die Regressionsgleichung:  $y = 0,02 + 0,94x$  ( $r=0,999$ ).

*Recovery von 3-Nitrotyrosin in Plasma.* 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin (50 nCi, 111 fmol) wurde 2 ml-Aliquots gepoolten menschlichen Plasmas zugesetzt ( $n=4$ ). Daneben wurden 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin (10 nCi, 22 fmol) zusammen mit nichtmarkiertem 3-Nitrotyrosin (300 pmol) 2 ml-Aliquots gepoolten menschlichen Plasmas zugesetzt ( $n=4$ ). Die Plasmaproben wurden ultrafiltriert und die Radioaktivität wurde im Ultrafiltrat ( $550 \pm 50 \mu\text{l}$ ) und im Proteinkonzentrat bestimmt. Sowohl beim Zusatz von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin allein als auch von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin und nichtmarkiertem 3-Nitrotyrosin verteilte sich die Radioaktivität gleichmäßig auf beide Fraktionen. Die Recovery von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin betrug in beiden Experimenten  $98 \pm 2 \%$ . Zur Bestimmung der Recovery von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin in der HPLC-Analyse (nach 3.4.3) des Ultrafiltrates wurden 5 nCi (11 fmol) 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin 200  $\mu\text{l}$ -Aliquots Ultrafiltrat zugesetzt ( $n=5$ ). Die in der gesammelten HPLC-Fraktion gefundene Radioaktivität wurde mit der ursprünglich dem Ultrafiltrat zugesetzten verglichen. Die Hauptfraktion des HPLC-Eluates wurde nach 3.1.2 extrahiert ( $n=5$ ). Die nach der Festphasenextraktion verbliebene Radioaktivität wurde mit der in der HPLC-Fraktion enthaltenen

Radioaktivität verglichen. Für die HPLC-Analyse ergab sich eine Recovery von  $76 \pm 2 \%$ . Für die Festphasenextraktion ergab sich eine Recovery von  $67 \pm 3 \%$ . Die finale Recovery nach Ultrafiltration, HPLC und Festphasenextraktion liegt somit bei  $50 \pm 5 \%$ .

*Artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Nitrat, Nitrit und Tyrosin bei der Derivatisierung.*

Unter den sauren Bedingungen der Derivatisierungsprozeduren kann es zur Nitrierung von Tyrosin unter Bildung von 3-Nitrotyrosin kommen [223]. Um das Ausmaß einer möglichen Nitrierung von Tyrosin bei physiologischen Konzentrationen von Nitrat (20 – 60  $\mu\text{M}$ ) und Nitrit (1 – 3  $\mu\text{M}$ ) in menschlichem Plasma [385] abzuschätzen, wurde [ $^{15}\text{N}$ ]Nitrat bzw. [ $^{15}\text{N}$ ]Nitrit mit [ $^2\text{H}_4$ ]Tyrosin derivatisiert. Gewählt wurden Konzentrationen von [ $^{15}\text{N}$ ]Nitrat und [ $^{15}\text{N}$ ]Nitrit, die unterhalb, innerhalb und oberhalb der physiologischen Konzentrationen liegen. Dazu wurden 3, 30, 300  $\mu\text{M}$  und 3 mM [ $^{15}\text{N}$ ]Nitrat bzw. 0,3, 3, 30 und 300  $\mu\text{M}$  [ $^{15}\text{N}$ ]Nitrit mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  [ $^2\text{H}_4$ ]Tyrosin derivatisiert (Derivatisierung zum *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat). In der GC-Tandem-MS-Analytik war das *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat von 3- $^{15}\text{N}$ -Nitro- $^2\text{H}_3$ -tyrosin (SRM von  $m/z$  383 aus  $m/z$  400) für Konzentrationen unterhalb von 300  $\mu\text{M}$  für Nitrat und 30  $\mu\text{M}$  für Nitrit nicht detektierbar. Eine Bildung von 3- $^{15}\text{N}$ -Nitro- $^2\text{H}_3$ -tyrosin ist unterhalb dieser Konzentrationen nicht nachweisbar. Die Bildung von 3- $^{15}\text{N}$ -Nitro- $^2\text{H}_3$ -tyrosin konnte für Konzentrationen über 300  $\mu\text{M}$  für Nitrat bzw. über 30  $\mu\text{M}$  für Nitrit nachgewiesen werden und war konzentrationsabhängig.

*Einfluss des pH-Wertes des Eluenten auf die HPLC-Trennung von 3-Nitrotyrosin und Tyrosin.*

Abb. 33 zeigt deutlich den Einfluss des pH-Wertes des Eluenten bei der HPLC-Trennung nach 3.4.3 von *o*-, *m*-, *p*-Tyrosin, 3-Nitrotyrosin und *p*-Nitrophenylalanin. Während es bei pH 2,5 unter den gewählten Bedingungen (70 mM Kaliumphosphat-Puffer/Methanol, 92/8, v/v) zu keiner Trennung zwischen 3-Nitrotyrosin und *p*-Nitrophenylalanin kommt, wird 3-Nitrotyrosin bei pH 7,0 von *p*-Nitrophenylalanin vollständig getrennt. Eine möglichst vollständige Trennung von *o*-Tyrosin und 3-Nitrotyrosin ist gewünscht, da *p*-Nitrophenylalanin der täglichen Bestimmung der Retentionszeit von 3-Nitrotyrosin diene. Die Auflösung der HPLC-Trennung von *o*-, *m*-, *p*-Tyrosin und 3-Nitrotyrosin ist bei pH 2,5 größer. Die HPLC-Trennung eines Gemisches aus *o*-, *m*-, *p*-Tyrosin und 3-Nitrotyrosin ist somit bei pH 2,5 vollständiger. Die HPLC-Trennung einer Tyrosin und 3-Nitrotyrosin enthaltenden Probe bei pH 2,5 unter den gewählten HPLC-Bedingungen ist folglich aus zweierlei Gründen vorteilhaft.

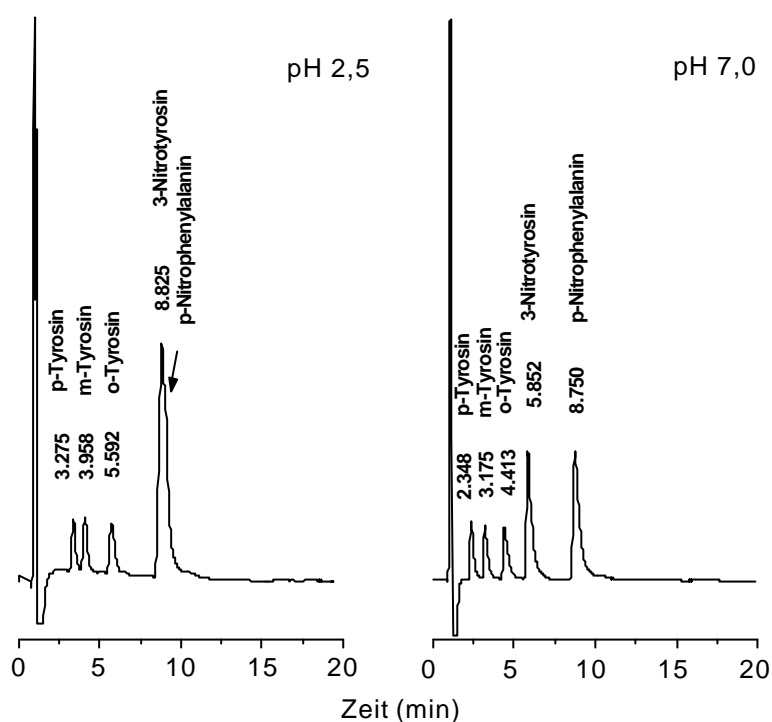


Abb. 33. HPLC-Chromatogramme von Tyrosin-Isomeren, 3-Nitrotyrosin und *p*-Nitrophenylalanin bei pH 2,5 (links) und pH 7,0 (rechts). Es wurde jeweils 1 µg der Substanzen analysiert. Eluent: 70 mM Kaliumphosphat-Puffer/Methanol, 92:8 (v/v); Flussrate 1,5 ml/min; Absorptionmessung bei 276 nm.

*Einfluss des pH-Wertes des Eluenten der HPLC-Trennung auf die GC-Tandem-MS-Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin.* In einer weiteren Versuchsreihe wurde 3-Nitrotyrosin in humanem Plasma quantitativ bestimmt, wobei die HPLC-Trennung bei pH 2,5 und 7,0 durchgeführt wurde. Die mittlere mit GC-Tandem-MS nach Derivatisierung der Proben gemessene 3-Nitrotyrosin-Konzentration im gleichen humanen Blutplasma betrug ( $n=4$ ):  $1,98 \pm 0,11$  nM bei pH 2,5 und  $2,49 \pm 0,38$  nM bei pH 7,0. Die RSD ist mit 15 % nach HPLC-Trennung bei pH 7,0 deutlich größer als nach HPLC-Trennung bei pH 2,5 (6 %). Die nach HPLC-Trennung von Nitrat, Nitrit, Tyrosin und 3-Nitrotyrosin bei pH 2,5 mit GC-Tandem-MS gemessene 3-Nitrotyrosin-Konzentration ist kleiner als die nach HPLC-Trennung bei pH 7,0 gemessene. Eine artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin während der HPLC-Trennung unter sauren Bedingungen ist daher unwahrscheinlich. Die HPLC-Trennung von Tyrosin und 3-Nitrotyrosin aus Blutplasma bei neutralem pH-Wert ist möglicherweise unvollständig. Zu beachten ist ferner, dass *o*-Tyrosin in einer physiologischen Konzentration im humanen Blutserum vorliegt, die  $10^5$ - $10^6$ -fach über der von 3-Nitrotyrosin liegt [386]. Bei der anschließenden Derivatisierung der Proben ist eine artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin aus unvollständig

abgetrenntem Tyrosin denkbar. Dies könnte die nach HPLC-Trennung der Proben bei pH 7,0 gemessenen, höheren Konzentrationen an 3-Nitrotyrosin erklären.

*Akkuratheit, Präzision, Reproduzierbarkeit, Detektionslimit und Nachweisgrenze der Methode.* Die Akkuratheit und Präzision der Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in humanem Plasma wurde wie folgt bestimmt: In gepooltem Plasma von zwei gesunden Probanden wurde die basale Konzentration von 3-Nitrotyrosin bestimmt. Dabei lag die Konzentration von freiem 3-Nitrotyrosin für Proband A bei  $1,41 \pm 0,02$  nM und für Proband B bei  $4,18 \pm 0,29$  nM (n=2). Zu 2-ml Plasmaproben von Proband A wurden 0 – 40 pmol 3-Nitrotyrosin zugesetzt (n=2). Zu 2-ml Plasmaproben von Proband B wurden 0 – 20 pmol 3-Nitrotyrosin zugesetzt (n=2). Zu allen Plasmaproben wurden 20 pmol 3-Nitro-L- $[^2\text{H}_3]$ tyrosin als interner Standard zugesetzt. 3-Nitrotyrosin wurde mit GC-Tandem-MS bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse zwischen der gefundenen (y) und der zugesetzten Konzentration von 3-Nitrotyrosin in nM (x) ergab für Proband A die Geradengleichung  $y = 1,94 + 1,05x$  (r=0,999) und für Proband B die Gleichung  $y = 4,38 + 0,96x$  (r=0,994). Die mittleren gemessenen Konzentrationen von 3-Nitrotyrosin für die verschiedenen zugesetzten Mengen an 3-Nitrotyrosin und die SD dienten als Berechnungsgrundlage der Präzision (RSD) und der Akkuratheit der Methode. Die in Tab. 10 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass sich die analytische Methode zur Bestimmung von freiem 3-Nitrotyrosin durch eine hohe Präzision und Akkuratheit auszeichnet. Die mittlere Präzision (RSD) liegt bei  $2,7 \pm 1,8$  % (Proband A) bzw.  $5,0 \pm 2,0$  % (Proband B). Die mittlere Akkuratheit der Methode liegt bei  $88 \pm 6$  % (Proband A) bzw.  $83 \pm 12$  % (Proband B). Die mittlere Präzision und Akkuratheit ist damit für Proband A höher. Sie ist möglicherweise auf den größeren gewählten Konzentrationsbereich für Proband A zurückzuführen. Sowohl für Proband A als auch für Proband B sind 1,25 bzw. 1 nM 3-Nitrotyrosin zugesetzt zu Plasma mit einer Akkuratheit von 77 bzw. 80 % und einer Präzision von 98 bzw. 94 % quantifizierbar.

Die instrumentelle Präzision und die Reproduzierbarkeit der Methode wurden mit 2 ml-Aliquots gepoolten Plasmas bestimmt, denen jeweils 20 pmol 3-Nitro-L- $[^2\text{H}_3]$ tyrosin als interner Standard zugesetzt wurden (n=5). Alle Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet und mit GC-Tandem-MS analysiert. Die instrumentelle Präzision betrug für endogenes 3-Nitrotyrosin 99,3 % (n=5). Die Reproduzierbarkeit der Methode lag bei 90 % für Proben, die am gleichen Tag (n=5) und bei 87 % für Proben, die an aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet wurden (n=5).



Tab. 10. Präzision und Akkuratheit der Methode zur quantitativen Bestimmung von freiem 3-Nitrotyrosin im Plasma von Menschen.<sup>a</sup>

| Proband A                             |   |                         | Proband B                      |   |                        |
|---------------------------------------|---|-------------------------|--------------------------------|---|------------------------|
| 3-Nitrotyrosin zugegeben <sup>a</sup> | 3-Nitrotyrosin gemessen abzüglich Basalkonzentration <sup>b</sup> | R.S.D./ Akkuratheit (%) | 3-Nitrotyrosin zugegeben       | 3-Nitrotyrosin gemessen abzüglich Basalkonzentration <sup>b</sup> | R.S.D./ Akkuratheit(%) |
| 0                                     | 0   | 1.5/n.a.                | 0                              | 0   | 6.9/n.a.               |
| 1.25                                  | 1.54  | 2.6/77                  | 0.5                            | 0.68  | 5.7/64                 |
| 2.5                                   | 2.82  | 6.4/87                  | 1                              | 1.2   | 5.6/80                 |
| 5                                     | 5.59  | 2.5/88                  | 2                              | 1.62  | 0.7/81                 |
| 10                                    | 10.48   | 2.5/95                  | 4                              | 3.81  | 4.8/95                 |
| 20                                    | 21.09   | 0.7/95                  | 5                              | 4.85  | 6.1/97                 |
| Mitte±S.D. der R.S.D.                 |   | 2.7±1.8                 | Mitte±S.D. der Akkuratheit (%) |   | 83±12                  |
|                                       |   | 88±6                    |                                |   | 5.0±2.0                |

<sup>a</sup>Die Methode stellt eine Kombination aus Ultrafiltration, HPLC, SPE und GC-Tandem-MS dar. Zur Validierung wurde die Additionsmethode verwendet. Dazu wurden zu 2 ml-Aliquots gepoolten Plasmas von zwei gesunden Probanden (A und B) 0 – 20 pmol (Proband A) und 0 – 40 pmol 3-Nitrotyrosin (Proband B) zugesetzt (n=2). Interner Standard war 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin (20 pmol).

<sup>b</sup>Alle Konzentrationsangaben in nM.

<sup>c</sup>Mittlere Basalkonzentrationen: 1.41 nM für Proband A und 4.18 nM 3-Nitrotyrosin für Proband B.

Zur Bestimmung des Detektionslimits (LOD) der Methode wurden Verdünnungen einer Stammlösung von 3-Nitrotyrosin mit GC-Tandem-MS analysiert [387]. Dazu wurde 3-Nitrotyrosin zum *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat umgesetzt. SRM des Ions mit *m/z* 379 zeigte für das *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat von 3-Nitrotyrosin ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 11:1 für eine injizierte Menge von 4 amol.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LOQ) der Methode wurde 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin im Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 pM mit 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als internem Standard (500 pM) mit GC-Tandem-MS analysiert. Dazu wurde Plasma eines gesunden Probanden mit einem endogenen Gehalt an 3-Nitrotyrosin von 2,5 ±0,3 nM (n=2) aliquotiert und 2 ml-Aliquots des Plasmas wurden mit 0, 50, 125, 250, 500 und 1000 pM 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin versetzt (jeweils n=2). Alle Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet und mit GC-Tandem-MS analysiert: SRM der Ionen mit *m/z* 382 für 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin und *m/z* 397 für 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin. Die lineare Regressionsanalyse der gemessenen Konzentration von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin (y) und der zugegebenen Konzentration von 3-Nitro-L-[<sup>14</sup>C<sub>9</sub>]tyrosin

(x) in pM ergab die Regressionsgerade:  $y = 17,41 + 1,03x$  ( $r=0,999$ ). Das LOQ der Methode lag bei 125 pM  $^{14}\text{C}$ -markiertem 3-Nitrotyrosin, wobei diese 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ ]tyrosin-Konzentration mit einer Präzision von 95,5 % und einer Akkuratheit von 82 % gemessen werden konnte. Sowohl Akkuratheit als auch Präzision lagen über 89 % für alle höheren Konzentrationen von 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ ]tyrosin (Abb. 34).

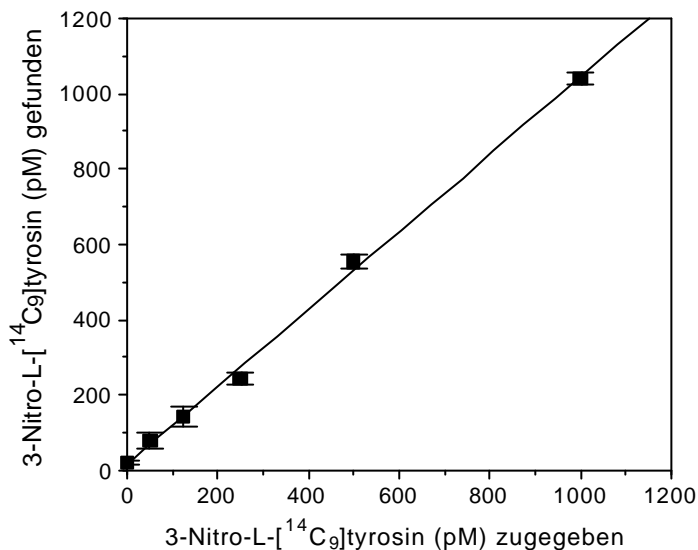


Abb. 34. Standardkurve für 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ ]tyrosin in menschlichem Plasma mit 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ ]tyrosin als internem Standard (500 pM,  $n=2$ ). Aliquots von 2 ml Plasma wurden analysiert. 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ ]tyrosin wurde über das Peakflächenverhältnis von  $m/z$  397 zu  $m/z$  382 quantifiziert (SRM der Ionen mit  $m/z$  397 für 3-Nitro-L- $^{14}\text{C}_9$ ]tyrosin und  $m/z$  382 für 3-Nitro-L- $^{2}\text{H}_3$ ]tyrosin) und Multiplikation mit der Konzentration des internen Standards.

*Identifikation von endogenem 3-Nitrotyrosin.* Im Plasma von 11 gesunden Probanden wurde endogenes 3-Nitrotyrosin in einer Konzentration von  $2,6 \pm 0,84$  nM gefunden (Bereich 1,4 – 4,3 nM). Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Probanden:  $2,9 \pm 1,00$  nM vs  $2,8 \pm 0,56$  nM. Abb. 35 zeigt ein typisches Chromatogramm aus der GC-Tandem-MS-Analyse einer Plasmaprobe eines gesunden Probanden. Sowohl für die endogene Substanz (Abb. 35, oberer Teil) als auch für den internen Standard (Abb. 35, unterer Teil) ist jeweils nur ein Peak zu sehen. Dieser hat die Retentionszeit des *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivates von 3-Nitrotyrosin. Das Vorhandensein eines einzigen Peaks in einem Zeitfenster von 6 min zeigt, dass keine anderen Substanzen in der GC-Tandem-MS-Analytik der hier beschriebenen Methode mit 3-Nitrotyrosin interferieren.

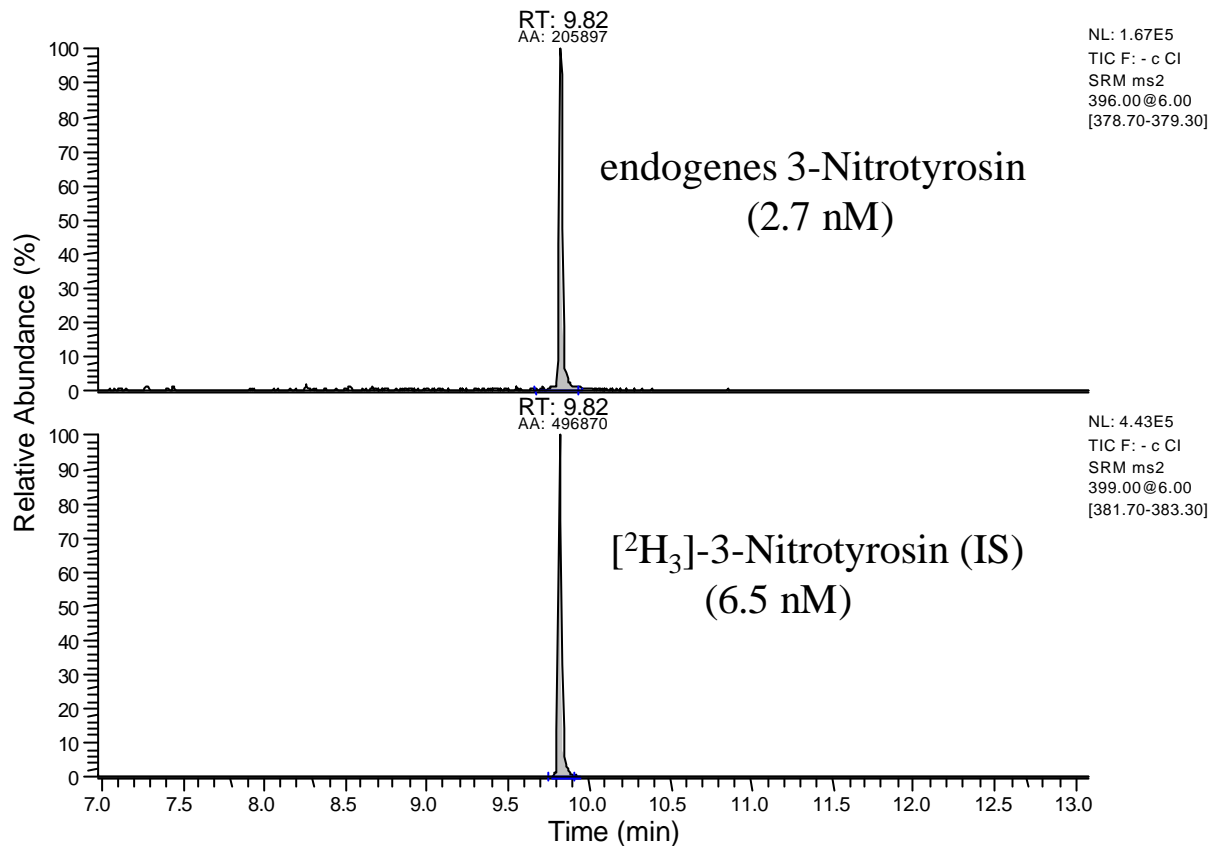


Abb. 35. Chromatogramm aus der GC-Tandem-MS-Analyse einer Plasmaprobe eines gesunden Probanden. SRM der Ionen mit  $m/z$  379 für endogenes 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  382 für 3-Nitro-L- $[^2\text{H}_3]$ tyrosin der *n*-Propyl-PFB-TMS-Derivate.

Zur Identifikation des GC-Peaks mit der Retentionszeit von synthetischem 3-Nitrotyrosin wurde ein Tochtterspektrum von der endogenen Substanz aufgenommen. Dazu wurde das Ion  $m/z$  396 durch CAD fragmentiert (Abb. 36, rechts). Abb. 36 (links) zeigt das entsprechende Tochtterspektrum, das durch CAD des Ions  $m/z$  396 des *n*-Propyl-PFB-TMS-Derivates von synthetischem 3-Nitrotyrosin erhalten wurde. Die drei charakteristischen Produktionen des *n*-Propyl-PFB-TMS-Derivates von synthetischem 3-Nitrotyrosin finden sich im Tochtterspektrum der endogenen Substanz wieder (Abb. 36, rechts). Daneben finden sich noch weitere Fragmente, die dem gleichen Mutterion ( $m/z$  396) entstammen, jedoch als Produktionen ein anderes  $m/z$ -Verhältnis zeigen. Dies zeigt, dass trotz der Aufreinigung der Plasmaproben mit HPLC eine interferenzfreie Detektion von endogenem 3-Nitrotyrosin mit einfacher GC-MS nicht möglich ist.

**Zusammenfassung.** Um die artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin bei der Probenaufarbeitung zu verhindern, wurde folgendermaßen verfahren: (1) Die Abtrennung von Plasmaproteinen erfolgte nicht durch saure Präzipitation, sondern durch schonende Ultrafiltration. (2) 3-Nitro-

tyrosin wurde vollständig von endogenem Tyrosin, Nitrat und Nitrit durch HPLC vor der Derivatisierung getrennt. Es konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert des Eluenten der HPLC-Trennung im Bereich pH 2,5 bis 7,0 einen Einfluss auf die gemessene Konzentration an 3-Nitrotyrosin hat. Die zuverlässigste Trennung wurde bei pH 2,5 erreicht.

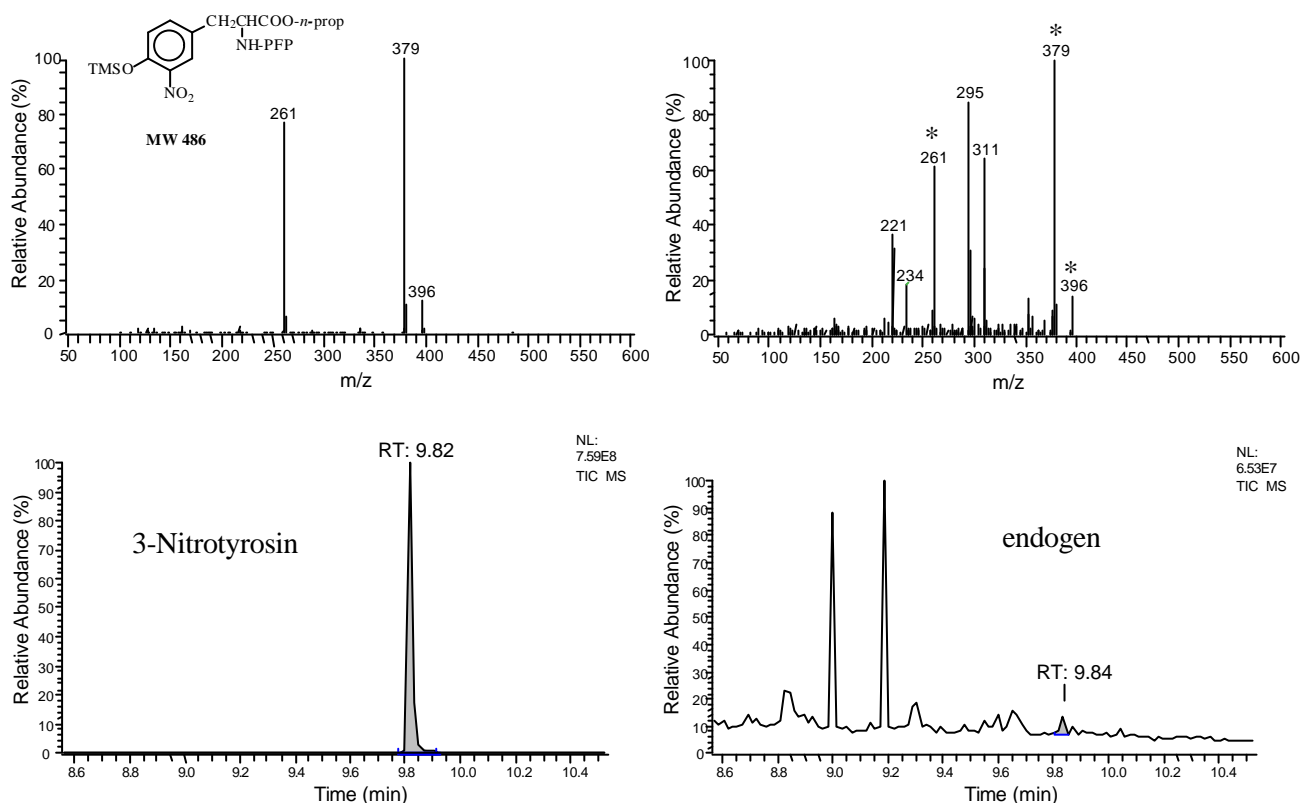


Abb. 36. CAD-NICI-Massenspektren von 3-Nitrotyrosin. Vergleich der GC-Tandem-MS-Tochterspektren (oben) der *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivate von käuflichem 3-Nitrotyrosin (links) und der endogenen Komponente aus humanen Blutplasma mit der Retentionszeit von 3-Nitrotyrosin (rechts) nach CAD des Ions *m/z* 396 ( $P^- = [M - TMSOH]^-$ ). Die GC-Tandem-MS-Chromatogramme (unten) zeigen die Retentionszeiten der Peaks, die zu den Massenspektren gehören. Zu den Ionen des Tochterspektrums von 3-Nitrotyrosin (\*) gehören *m/z* 396 ( $P^-$ ), *m/z* 379 ( $[P - 17]^-$ ) und *m/z* 261 ( $[n\text{-Propyl-CO}_2\text{-CH=N-PFP}]^-$ ).

Mit der Additionsmethode konnte die Zuverlässigkeit der entwickelten Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in humanem Blutplasma gezeigt werden. Die mittlere Präzision (RSD) der Methode lag bei 2,7 bzw. 5,0 % für zwei Probanden. Die mittlere Akkuratheit betrug 88 bzw. 83 %. Für den internen Standard 3-Nitro- $^{2}\text{H}_3$ tyrosin zeigte sich gute Linearität im Bereich von 0 bis 20 nM 3-Nitrotyrosin. Das LOQ der Methode lag bei 125 pM für 3-Nitro- $^{14}\text{C}_9$ tyrosin und das LOD bei 4 amol.

#### 4.2.1.5 Vergleich der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mit GC-MS und GC-Tandem-MS

Wie gezeigt, ermöglicht eine Kombination aus HPLC-Trennung und anschließender GC-Tandem-MS-Analyse die spezifische Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin in humanem Blutplasma (siehe 4.2.1.4). In der Literatur sind Methoden beschrieben worden, die ermöglichen 3-Nitrotyrosin im humanen Blutplasma mit GC-MS zu bestimmen [308,330]. Ein Vergleich von GC-MS mit GC-Tandem-MS soll zeigen, ob auch einfache Massenspektroskopie die interferenzfreie und spezifische Detektion von 3-Nitrotyrosin in humanem Plasma erlaubt.

Tab. 11. Vergleich der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mit GC-MS und GC-Tandem-MS in einem Kollektiv von 12 gesunden Probanden.

| Methode    |          | GC-Tandem-MS                        | GC-MS                               | GC-Tandem-MS                                  | GC-MS     |                          |
|------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-----------|--------------------------|
|            |          | Peakflächenverhältnis <sup>a</sup>  |                                     | Konzentration von 3-Nitrotyrosin <sup>b</sup> |           | Quotient                 |
| Geschlecht | Alter    | <i>m/z</i> 379 zu<br><i>m/z</i> 382 | <i>m/z</i> 396 zu<br><i>m/z</i> 399 | (nM)  |           | GC-MS zu<br>GC-Tandem-MS |
| w          | 53       | 0,150                               | 0,187                               | 0,75  | 0,94      | 1,247                    |
| m          | 74       | 0,432                               | 0,774                               | 2,16  | 3,87      | 1,792                    |
| w          | 43       | 0,131                               | 0,149                               | 0,66  | 0,75      | 1,137                    |
| m          | 42       | 0,304                               | 0,236                               | 1,52  | 1,18      | 0,776                    |
| m          | 42       | 0,140                               | 0,124                               | 0,70  | 0,62      | 0,886                    |
| m          | 42       | 0,120                               | 1,006                               | 0,60  | 5,03      | 8,383                    |
| m          | 42       | 0,078                               | 1,005                               | 0,39  | 5,03      | 12,89                    |
| m          | 50       | 0,126                               | 1,009                               | 0,63  | 5,05      | 8,008                    |
| m          | 58       | 0,199                               | 0,197                               | 1,00  | 0,99      | 0,999                    |
| w          | 50       | 0,133                               | 0,837                               | 0,67  | 4,19      | 6,293                    |
| w          | 57       | 0,448                               | 2,085                               | 2,24  | 10,4      | 4,643                    |
| m          | 61       | 0,492                               | 3,103                               | 2,46  | 15,5      | 6,301                    |
| Mitte±S.D. | 51,2±9,6 | 0,23±0,14                           | 0,89±0,86                           | 1,15±0,71                                     | 4,46±4,31 | 4,45±3,79                |

<sup>a</sup>Endogenes 3-Nitrotyrosin zu internem Standard.

<sup>b</sup>Die Konzentration von 3-Nitrotyrosin ergibt sich durch Multiplikation des Peakflächenverhältnisses mit der Konzentration des internen Standards (5 nM). w, weiblich; m, männlich.

Die Daten der quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mit GC-MS und GC-Tandem-MS wurden miteinander verglichen (Tab. 11). Die in der Gruppe von zwölf weiblichen und männlichen Probanden (Alter 50 bis 74 Jahre) gefundene Plasmakonzentration von 3-Nitrotyrosin beträgt  $1,15 \pm 0,71$  nM (0,67 bis 2,46 nM). Für die wiedergegebenen Peakflächen-

verhältnisse von endogenem 3-Nitrotyrosin zu internem Standard von  $m/z$  396 zu  $m/z$  399 aus der GC-MS-Analyse und  $m/z$  379 zu  $m/z$  382 aus der GC-Tandem-MS-Analyse hat der daraus gebildete Quotient einen Wert von  $4,45 \pm 3,79$  ( $n=12$ , RSD 85,2 %). Dieses Verhältnis liegt weit über dem theoretischen Wert von 1. Die Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin mit GC-MS führt somit zu im Durchschnitt um den Faktor 4,5 höheren Konzentrationen. Die Schwankungen des Quotienten der GC-MS- zur GC-Tandem-MS-Messung sind dabei für die einzelnen Messwerte sehr groß (0,776 bis 12,89). Eine Erklärung für die mit GC-MS gemessenen höheren 3-Nitrotyrosin-Konzentrationen ist die Koelution einer oder mehrerer Substanzen in der GC-MS-Analyse, die Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis wie 3-Nitro-tyrosin, d. h.  $m/z$  396, bilden (siehe 4.2.1.4).

#### 4.2.1.6 *In vitro*-Bildung von 3-Nitrotyrosin durch Peroxynitrit

Bei der Nitrierung von Tyrosin durch Peroxynitrit wird erst bei hohen Peroxynitrit-Konzentrationen ( $>100 \mu\text{M}$ ) eine Ausbeute von 45 % 3-Nitrotyrosin erreicht [231,388]. Zugabe von  $\text{CO}_2$  erhöht die Ausbeute der Nitrierung von 4-Hydroxyphenylelessigsäure [19]. Im Folgenden wird die konzentrationsabhängige Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Tyrosin und Peroxynitrit bei physiologischem pH-Wert mit und ohne Bicarbonat dargestellt.

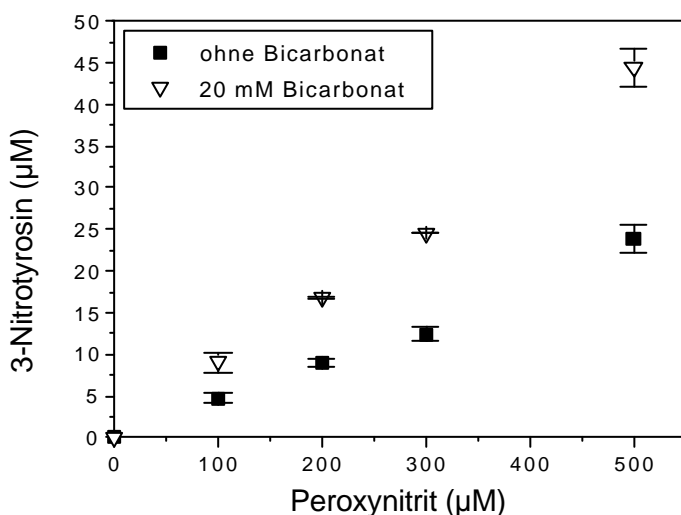


Abb. 37. 3-Nitrotyrosin-Bildung aus 1 mM Tyrosin bei unterschiedlichen Konzentrationen von Peroxynitrit. Reaktionsbedingungen: 1 h bei RT in 200 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,4; ohne und mit 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mit HPLC: 70 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /Methanol, 92/8 (v/v), pH 2,5; Absorptionsmessung bei 356 nm.

1 mM Tyrosin wurde dazu mit 0, 100, 200, 300 und 500  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit für 1 h bei RT inkubiert (0,5 ml 200 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,4, n=2). Daneben wurde der Effekt von 20 mM  $\text{NaHCO}_3$  auf die Bildung von 3-Nitrotyrosin untersucht. 3-Nitrotyrosin wurde mit der unter 3.4.3 beschriebenen HPLC-Methode bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 356 nm und Peakflächenvergleich mit externem Standard (3-Nitrotyrosin). Das mittlere Verhältnis von gebildetem 3-Nitrotyrosin zur zugesetzten Konzentration von Peroxynitrit betrug  $0,0451 \pm 0,0024$  ohne Zusatz von Bicarbonat (Abb. 37). Dies entspricht einer mittleren Ausbeute der Nitrierung von Tyrosin durch Peroxynitrit von 4,5 %. Das mittlere Verhältnis von gebildetem 3-Nitrotyrosin zur zugesetzten Konzentration an Peroxynitrit betrug  $0,0863 \pm 0,0034$  bei Zusatz von 20 mM Bicarbonat. Dies entspricht einer mittleren Ausbeute von 8,6 %. Es kommt annähernd zu einer Verdopplung der Ausbeute an 3-Nitrotyrosin bei Zusatz von 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

In der Literatur finden sich als Angaben zur Ausbeute der Nitrierung von Tyrosin (1 mM) durch 1 mM Peroxynitrit 3,7 % [231] bzw. 5,1 % [233]. Es konnte gezeigt werden, dass auch kleinere Konzentrationen von Peroxynitrit (100 – 500  $\mu\text{M}$ ) zu einer Ausbeute von 4 bis 5 % 3-Nitrotyrosin führen. R. Uppu *et al.* konnten für einen Konzentrationsbereich von 100 – 800  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit zeigen, dass 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  die Ausbeute der Nitrierung von 4-Hydroxyphenylelessigsäure verdoppelt [19]. Wie hier gezeigt werden konnte, findet sich auch für die Nitrierung von Tyrosin eine Erhöhung der Ausbeute bei Zusatz von 20 mM  $\text{NaHCO}_3$  von im Mittel 4,5 auf 8,6 % statt. Unter den gleichen Bedingungen führt der Zusatz von 20 mM  $\text{NaHCO}_3$  zu 1 mM Glutathion zu einer 50 %igen Verringerung der Ausbeute an Oxidationsprodukten (GSSG) und bis zu 80 %igen Verringerung der Ausbeute an S-Nitr(osyl)ierungsprodukten (GSNO und GSNO<sub>2</sub>) (bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Die Versuche bestätigen die Ergebnisse von C. X. C. Santos *et al.*, die ebenfalls eine Steigerung der Ausbeute der 3-Nitrotyrosin-Bildung nach Zugabe von 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  um 197 % festgestellt haben [238].

#### 4.2.2 3-Nitrotyrosin-Reste in Proteinen

Die analytische Methode zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen entspricht grundsätzlich der unter 4.2.1.1 vorgestellten Methode für 3-Nitrotyrosin. Im Gegensatz zu dieser Methode wurde hier jedoch nicht das Ultrafiltrat, sondern das aus Plasma durch Ultrafiltration gewonnene Proteinkonzentrat verwendet. Das Proteinkonzentrat

---

wurde enzymatisch hydrolysiert und das Hydrolysat einer weiteren Ultrafiltration zur Abtrennung unvollständig hydrolysierter Proteine unterzogen.

#### **4.2.2.1 Analytische Methode**

*Biologische Proben.* Die Sammlung des Blutplasmas und die Ultrafiltration erfolgte wie für 3-Nitrotyrosin beschrieben (4.2.1.1).

*Bestimmung der Proteinkonzentration.* Die Proteinkonzentration des nach zweistündiger Ultrafiltration (4 °C) gewonnenen Proteinkonzentrates wurde photometrisch nach Lowry *et al.* mit einer Standardkurve für BSA (0 – 400 µg/ml, n=2) bestimmt [389]. Der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde so mit dest. Wasser eingestellt, dass er im Bereich der Standardkurve lag (n=2).

*Proteinverdau.* Für die hydrolytische Spaltung der Plasmaproteine wurde Pronase E verwendet [314]. Pronase E ist eine Mischung verschiedener Proteasen, die Proteine zu den einzelnen Aminosäuren abbauen [390]. Pronase E wurde jeweils frisch in dest. Wasser in einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst. Das Mengenverhältnis von Pronase E zu Plasmaprotein lag bei 1:5. Jeder Reaktionsansatz enthielt: 200 µl Pronase E (20 mg/ml), 20 mg Plasmaprotein und 500 µl 0,2 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5. Die Reaktionszeit betrug 20 h und die Reaktionstemperatur 37 °C. Nach Beendigung der enzymatischen Hydrolyse wurden 10 pmol 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als interner Standard zugesetzt. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 1500 g ultrafiltriert (wurden Centriscart I-Ultrafiltrationskartuschen). Das gewonnene Ultrafiltrat wurde zur Bestimmung von Tyrosin und 3-Nitrotyrosin (siehe 4.2.1.1) verwendet.

*Bestimmung der Tyrosinkonzentration.* Zur Quantifizierung des Tyrosingehaltes des Hydrolysates wurde das unter 3.4.3 beschriebene HPLC-System verwendet. Ein 10-µl Aliquot des Ultrafiltrates wurde 1:100 mit der mobilen Phase verdünnt und bei 276 nm chromatographiert. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 100 µl. Die Quantifizierung erfolgte über Peakflächenvergleich des Standards mit der Probe.



*Berechnung des Verhältnisses von 3-Nitrotyrosin (3-NT)- zu Tyrosin (Tyr)-Resten.* Folgende Formel diente zur Berechnung des Molarverhältnisses:

$$3\text{-NT/Tyr} = \frac{R \times (C_{IS} \times V_E + S_{IS}^*)}{(V_E + 0,7) \times C_{Tyr}} \times 10^{-3}$$

$V_E$  Volumen von 20 mg Plasmaprotein für die enzymatische Hydrolyse in ml

$C_{Tyr}$  Konzentration von Tyrosin in  $\mu\text{M}$

$R$  gemessenes  $m/z$ -Verhältnis von 3-Nitrotyrosin zu internem Standard

$C_{IS}$  Konzentration des internen Standards im eingesetzten Blutplasma in nM

$S_{IS}^*$  Stoffmenge des internen Standards zugesetzt zu 20 mg Protein in pmol

Alle Angaben gehen von 2 ml Plasma aus. Der Summand 0,7 ergibt sich aus dem Ansatzvolumen der enzymatischen Hydrolyse.

#### 4.2.2.2 *In vitro*-Nitrierung von "bovine serum albumin" (BSA) durch Peroxynitrit

Während die Nitrierung von BSA mit großen Konzentrationen von Peroxynitrit (1 – 5 mM) eingehend untersucht wurde [239,240,261,317], ist bisher wenig über die Nitrierung von BSA mit kleinen Peroxynitrit-Konzentrationen bekannt, wie sie *in vivo* zu erwarten sind. Um diese Lücke zu schließen, wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

Die Nitrierung von Tyrosin-Resten in BSA wurde für verschiedenen Peroxynitrit-Konzentrationen untersucht: 40 mg/ml (604  $\mu\text{M}$ ) BSA wurden mit 0, 0,3, 3, 30 und 300  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit 1 h bei RT inkubiert. Die Albuminkonzentration entspricht der physiologischen Albuminkonzentration im Blut (40 mg/ml im Blut von Menschen [235]). Die konzentrationsabhängige Bildung von 3-Nitrotyrosin in BSA nach Inkubation mit Peroxynitrit ist in Abb. 38 gezeigt. Es zeigt sich ein ähnlicher Verlauf wie von Ohshima *et al.* beschrieben [284]. Aus Abb. 38 ergibt sich ferner für 30  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit ein Verhältnis von  $0,21 \times 10^{-3}$  von 3-Nitrotyrosin zu Tyrosin. Dies entspricht einer Nitrierung von 0,21 ‰ der Tyrosin-Reste. BSA hat ein Molekulargewicht von 66,267 kDa und besitzt 19 Tyrosin-Reste pro Molekül [391]. Für 30  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit ergibt sich ein 3-Nitrotyrosin-Anteil von 60 pmol/mg Albumin oder 3,99 mmol/

mol Albumin. Für 300  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit beträgt die Nitrierung der Tyrosin-Reste 0,58 % und der 3-Nitrotyrosin-Anteil 11 mmol/mol Albumin, für 3  $\mu\text{M}$  jedoch lediglich 0,95 mmol/mol.

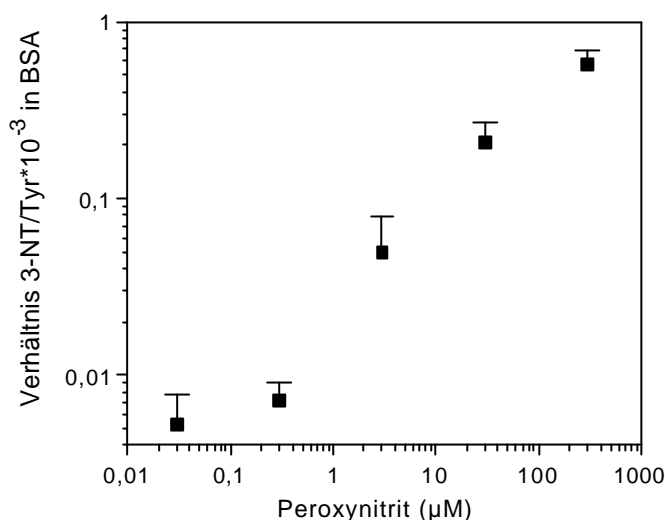


Abb. 38. Effekt der Peroxynitrit-Konzentration auf die 3-Nitrotyrosin-Bildung in 40 mg/ml BSA. Reaktionsbedingungen: 1 h bei RT in 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4 mit 0,1 mM DTPA. Gezeigt ist das Verhältnis von 3-Nitrotyrosin (3-NT)- zu Tyrosin (Tyr)-Resten als Mittelwert  $\pm$ SD (n=2). 3-Nitrotyrosin wurde mittels GC-Tandem-MS und Tyrosin mittels HPLC bestimmt.

Das für 30  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit gefundenen Verhältnis liegt etwas niedriger als das von Ohshima *et al.* für 50  $\mu\text{M}$  Proxynitrit und 10 mg/ml (151  $\mu\text{M}$ ) BSA berichtete ( $0,5 \times 10^{-3}$  [284]). Die Abhängigkeit der Ausbeute der Nitrierung vom Verhältnis BSA zu Peroxynitrit ist für hohe Peroxynitrit-Konzentrationen jedoch bereits bekannt: Für Verhältnisse von 1:1, 1:5, und 1:10 von BSA (4 mg/ml) zu Peroxynitrit liegt die Nitrierung bei 0,12, 1,4 und 3,2 % der Tyrosin-Reste [280]. Der für 300  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit ermittelte Anteil an 3-Nitrotyrosin-Resten von 11 mmol/mol Albumin liegt weit unter dem für höhere Peroxynitrit-Konzentrationen in der Literatur angegebenen: Für 1 mM Peroxynitrit und 10 mg/ml Albumin wurde ein Anteil an 3-Nitrotyrosin-Resten von 391 mmol/mol Albumin und für 2 mM Peroxynitrit und 4 mg/ml BSA sogar von 1330 mmol/mol Albumin berichtet [239,261].

#### 4.2.2.3 Validierung der Methode zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen

Zur Zeit steht kein nitriertes Protein als interner Standard für die massenspektrometrische Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin-Resten zur Verfügung. Daher wurde die Eignung von

3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin als interner Standard in der GC-Tandem-MS-Analytik von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen untersucht.

Dazu wurde BSA (40 mg/ml) unter Zusatz von 300 µM Peroxynitrit nitriert (siehe 4.2.2.2). Von dem nitrierten BSA wurden 0, 5, 10, 20, 50 und 100 µg zu jeweils 20 mg menschlichem Plasmaprotein zugesetzt (n=2). Das Plasmaprotein wurde durch Ultrafiltration (2 h) aus gepooltem menschlichem Plasma gewonnen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter 4.2.2.1 beschrieben.

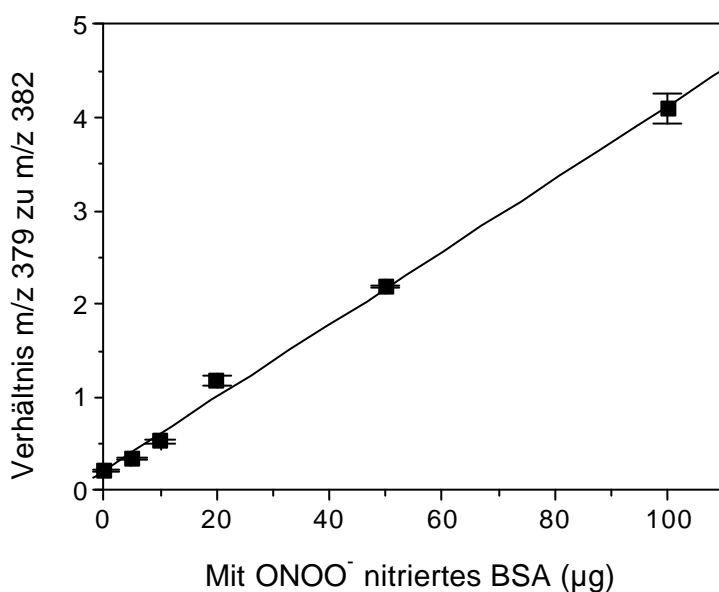


Abb. 39. Standardkurve für 3-Nitrotyrosin-Reste in Proteinen in menschlichem Plasma. 20 mg Plasmaprotein wurden zusammen mit 0 – 100 µg nitriertem BSA analysiert. BSA (40 mg/ml) wurde nach 4.2.2.2 mit 300 µM Peroxynitrit nitriert. 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin diente jeweils als interner Standard (10 pmol). Dargestellt ist das gemessene Peakflächenverhältnis von  $m/z$  379 zu  $m/z$  382 (SRM der Ionen mit  $m/z$  379 für 3-Nitrotyrosin und  $m/z$  382 für 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin) als Mittelwert  $\pm$ SD (n=2).

Abb. 39 zeigt das lineare Verhältnis zwischen den Peakflächenverhältnissen von 3-Nitrotyrosin zu internem Standard und der zugegebenen Menge von nitriertem BSA in µg. Die lineare Regression ergibt eine Gerade der Gleichung  $y = 0,217 + 0,039x$  ( $r=0,998$ ). Aus der Abbildung lässt sich ableiten, dass eine Erhöhung des Anteils von nitriertem BSA am gesamten Protein zu einer proportionalen Erhöhung der gemessenen Konzentration von 3-Nitrotyrosin nach enzymatischer Hydrolyse führt. 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin eignet sich somit als interner Standard in der GC-Tandem-MS-Analytik von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen. Mit einer ähnlichen Verdünnungsreihe wurde die Eignung von 3-Nitro-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]tyrosin als interner

Standard für die GC-MS-Analytik von 3-Nitrotyrosin-Resten im Protein von isoliertem LDL gezeigt [329].

#### 4.2.2.4 Vergleich der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen mit GC-MS und GC-Tandem-MS

Durch immunohistochemische Nachweismethoden wurde 3-Nitrotyrosin in unterschiedlichen Geweben als Aminosäure-Rest in Proteinen detektiert [269,270,275]. Eine exakte Quantifizierung pathologischer Veränderungen ist jedoch mit den semiquantitativen Methoden nicht möglich [226]. Daher wurde insbesondere die GC-MS zur Quantifizierung der 3-Nitrotyrosin-Reste in Proteinen herangezogen [267,327,329]. Im Folgenden wird die quantitative Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen des humanen Blutplasmas mit GC-MS und GC-Tandem-MS verglichen.

Tab. 12. Vergleich der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Plasmaproteinen mit GC-MS und GC-Tandem-MS in einem Kollektiv von neun gesunden Probanden.

| Methode    |          | GC-Tandem-MS                       | GC-MS                            | GC-Tandem-MS  | GC-MS     |                                |
|------------|----------|------------------------------------|----------------------------------|---|-----------|--------------------------------|
| Geschlecht | Alter    | Peakflächenverhältnis <sup>a</sup> |                                  | Verhältnis von Protein-3-NT zu Protein-Tyr <sup>b</sup> |           | Quotient GC-MS zu GC-Tandem-MS |
|            |          | <i>m/z</i> 379 zu <i>m/z</i> 382   | <i>m/z</i> 396 zu <i>m/z</i> 399 | x10 <sup>-6</sup>                                       |           |                                |
| w          | 53       | 1,878                              | 2,826                            | 3,13  | 4,72      | 1,505                          |
| m          | 74       | 0,720                              | 1,039                            | 1,50  | 2,16      | 1,442                          |
| w          | 43       | 0,669                              | 1,051                            | 1,03  | 1,61      | 1,571                          |
| m          | 42       | 0,505                              | 2,060                            | 1,09  | 4,43      | 4,079                          |
| m          | 42       | 1,095                              | 4,266                            | 1,86  | 7,26      | 3,896                          |
| m          | 50       | 0,542                              | 0,140                            | 1,29  | 0,33      | 0,258                          |
| m          | 58       | 0,554                              | 0,137                            | 1,52  | 0,38      | 0,247                          |
| w          | 50       | 0,368                              | 0,132                            | 0,91  | 0,33      | 0,359                          |
| m          | 61       | 0,525                              | 0,379                            | 1,02  | 0,74      | 0,722                          |
| Mitte±S.D. | 52,6±9,9 | 0,76±0,44                          | 1,34±1,36                        | 1,48±0,65   | 2,44±2,34 | 1,56±1,39                      |

<sup>a</sup>Endogenes 3-Nitrotyrosin zu internem Standard.

<sup>b</sup> Das Verhältnis von 3-Nitrotyrosin-Resten (Protein-3-NT) zu Tyrosin-Resten (Protein-Tyr) in Plasmaproteinen ergibt sich aus den gemessenen Peakflächenverhältnissen für 3-Nitrotyrosin und den gemessenen Tyrosin-Konzentrationen nach enzymatischer Hydrolyse (nach 4.2.2.1). w, weiblich; m, männlich.

Die quantitative Bestimmung von 3-Nitrotyrosin erfolgte in Blutplasma-Proben der unter 4.2.1.5 beschriebenen Probandengruppe. Aus den in Tab. 12 wiedergegebenen Peakflächenverhältnissen von  $m/z$  396 zu  $m/z$  399 (GC-MS) und  $m/z$  379 zu  $m/z$  382 (GC-Tandem-MS) wurde ein Quotient von  $1,56 \pm 1,39$  errechnet ( $n=9$ , RSD 89,16 %). Dieser Wert liegt deutlich über dem theoretischen Wert von 1, ist jedoch wesentlich niedriger als der entsprechende unter 4.2.1.5 in den gleichen Proben bestimmte Wert für 3-Nitrotyrosin als freie Aminosäure. Die Schwankungen des Quotienten der GC-MS- zur GC-Tandem-MS-Messung sind jedoch auch für die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in Plasmaproteinen für die einzelnen Messwerte sehr groß (0,247 bis 4,079).

Es wurde ein mittleres Verhältnis von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten im Blutplasma der älteren Probandengruppe (50 bis 74 Jahre) von  $1,48 \pm 0,54 \times 10^{-6}$  ( $1,48 \mu\text{mol}$  3-Nitrotyrosin/mol Tyrosin) gefunden. Damit kommen auf ein Molekül 3-Nitrotyrosin etwa  $0,7 \times 10^6$  Moleküle Tyrosin. Dies bestätigt die Ergebnisse von K. A. Skinner *et al.* ( $2,3 \mu\text{mol}$  3-Nitrotyrosin/mol Tyrosin [273]), steht jedoch im Widerspruch zu anderen Ergebnissen [317,330].

### 4.2.3 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure

3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure entsteht aus 3-Nitrotyrosin durch Desaminierung und anschließender Oxidation unter  $\text{CO}_2$ -Verlust. Zunächst wurde 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1',1'- $^{18}\text{O}_2$ ]essigsäure zur Verwendung als interner Standard für die GC-Tandem-MS-Analyse von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure hergestellt (4.2.3.1). Die NICI-Massenspektren von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1',1'- $^{18}\text{O}_2$ ]essigsäure werden im nachfolgenden Unterkapitel 4.2.3.2 diskutiert. Die anschließend entwickelte analytische Methode zur Bestimmung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure (4.2.4) ist Grundlage für die pharmakokinetische Untersuchung des Metabolismus von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen (4.2.4.).

#### 4.2.3.1 Interner Standard

Die Sauerstoffatome am Carboxyl-Kohlenstoffatom von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure wurden in Anlehnung an die für Isoprostane beschriebenen Methode durch  $^{18}\text{O}$ -Atome ausgetauscht (4.1.1.2 und 4.1.3.3).

*Enzymatische Synthese von 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1',1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure.* Zunächst wurde 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure mit Diazomethan methyliert. Dazu wurden 200 µg 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure 5 min bei 0 °C mit 100 µl frisch hergestellter ätherischer Lösung von Diazomethan inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter N<sub>2</sub> eingengt und in 10 µl Ethanol aufgenommen. 300 µl der PLE Suspension (1000 U) wurden unter N<sub>2</sub> eingengt und in 300 µl H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (98 Atom % <sup>18</sup>O von Isotec) resuspendiert. Der pH-Wert wurde mit Li<sup>18</sup>OH auf pH 7 eingestellt. Die resuspendierte PLE und das in Ethanol aufgenommene Reaktionsgemisch inkubierten zusammen 30 min bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde mit 5 M HCOOH auf pH 2-3 angesäuert und 1:5 (v/v) mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Reaktionsprodukte wurden mit SPE nach 3.1.1 isoliert. Methylierung und enzymatische Hydrolyse wurden einmal wiederholt.

*High-performance liquid chromatography.* Sowohl für die Aufreinigung des Produktgemisches als auch zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes wurde das unter 3.4.1 beschriebene HPLC-System bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch photometrische Absorptionsmessung bei 356 nm. Die gesammelte HPLC-Fraktion von <sup>18</sup>O-markierter 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure wurde 1:8 (v/v) mit Wasser verdünnt und nach 3.1.1 extrahiert. Das aufgereinigte Produkt wurde in 1 ml Acetonitril gelöst und bei -78 °C gelagert (Stammlösung).

*HPLC-Aufreinigung des Produktgemisches und Bestimmung der Ausbeute.* Die Methylierung von 4 µg 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure mit nachfolgender Hydrolyse mit 5 M NaOH ergab ein Gemisch von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure (74,4 %, 12,25 min), 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäuremethylether (14,1 %, 14,7 min), 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäuremethylester (9,6 %, 28,8 min) und 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäuremethylethermethylester (1,8 %, 34,4 min); angegeben sind die relativen Peakflächenverhältnisse und Retentionszeiten der HPLC-Analyse. Für die Methylierung von 200 µg 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure mit nachfolgender enzymatischer Hydrolyse mit PLE in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O wurde ein Gemisch von <sup>18</sup>O-markierter 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure (relativer Anteil 68,7 %, 46 µg) und 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäuremethylether (31,3 %, 21 µg) erhalten (Abb. 40 links). Nach Rechromatographie ergab sich eine Ausbeute von 33 µg <sup>18</sup>O-markierter 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure (Abb. 40 rechts). Weder der Methylester noch der Methylestermethylether sind nach enzymatischer Hydrolyse noch nachweisbar (Abb. 40).

$^{18}\text{O}$ -Markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure zeigten ein identisches chromatographisches Verhalten in der HPLC-Analyse.

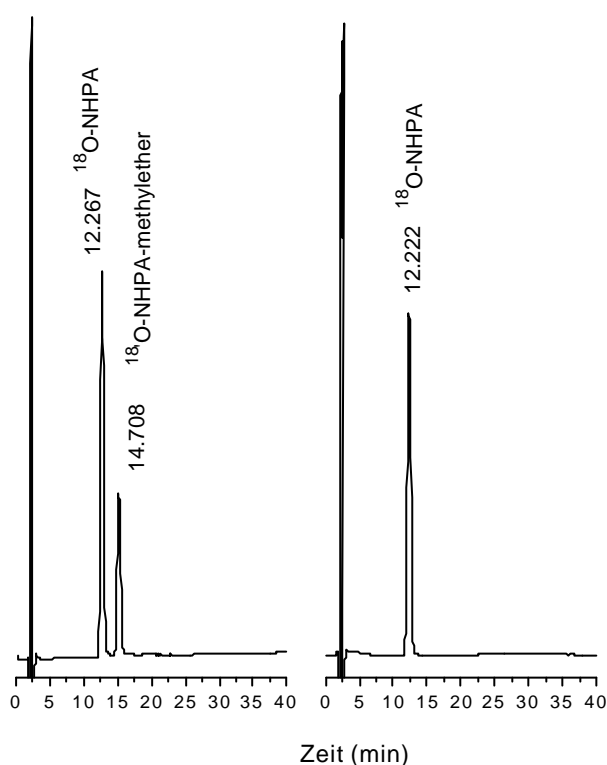


Abb. 40. HPLC-Chromatogramme von  $^{18}\text{O}$ -markierter 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure ( $^{18}\text{O}$ -NHPA) und deren Methylether ( $^{18}\text{O}$ -NHPA-methylether). Die Reaktion von NHPA mit Diazomethan (5 min, 0 °C) mit nachfolgender enzymatischer Hydrolyse in  $\text{H}^{18}\text{O}$  zeigt ein Produktgemisch von  $^{18}\text{O}$ -NHPA und  $^{18}\text{O}$ -NHPA-methylether (links, ca. 1  $\mu\text{g}$   $^{18}\text{O}_2$ -NHPA injiziert). Die Rechromatographie des isolierten  $^{18}\text{O}_2$ -NHPA zeigt nur noch einen Peak (rechts, 1  $\mu\text{g}$   $^{18}\text{O}_2$ -NHPA injiziert). Eluent ist 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /Acetonitril/iso-Propanol, 80:14:6 (v/v), pH 3,5; Flussrate: 1 ml/min; Absorptionsmessung bei 356 nm.

*Massenspektrometrische Charakterisierung des Produktes der enzymatischen Synthese nach HPLC-Aufreinigung.* Es wurden die Massenspektren der Me-TMS-Derivate nach HPLC-Aufreinigung und zum Vergleich von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure mit dem unter 3.5.2 beschriebenen GC-MS-System unter EI-Bedingungen aufgenommen. Sowohl 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure als auch  $^{18}\text{O}$ -markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure eluierten zur gleichen Zeit von der GC-Säule (8,99 min). Beide Massenspektren zeigen das Moleküllion ( $\text{M}^+$ ) bei  $m/z$  283 für 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und  $m/z$  287 sowie  $m/z$  285 für  $^{18}\text{O}$ -markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure. Die intensivsten Ionen entstehen durch den Verlust der Methyl-Gruppe des Esters, d.h. bei  $m/z$  268 für 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und  $m/z$  272 sowie  $m/z$  279 für  $^{18}\text{O}$ -markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure.

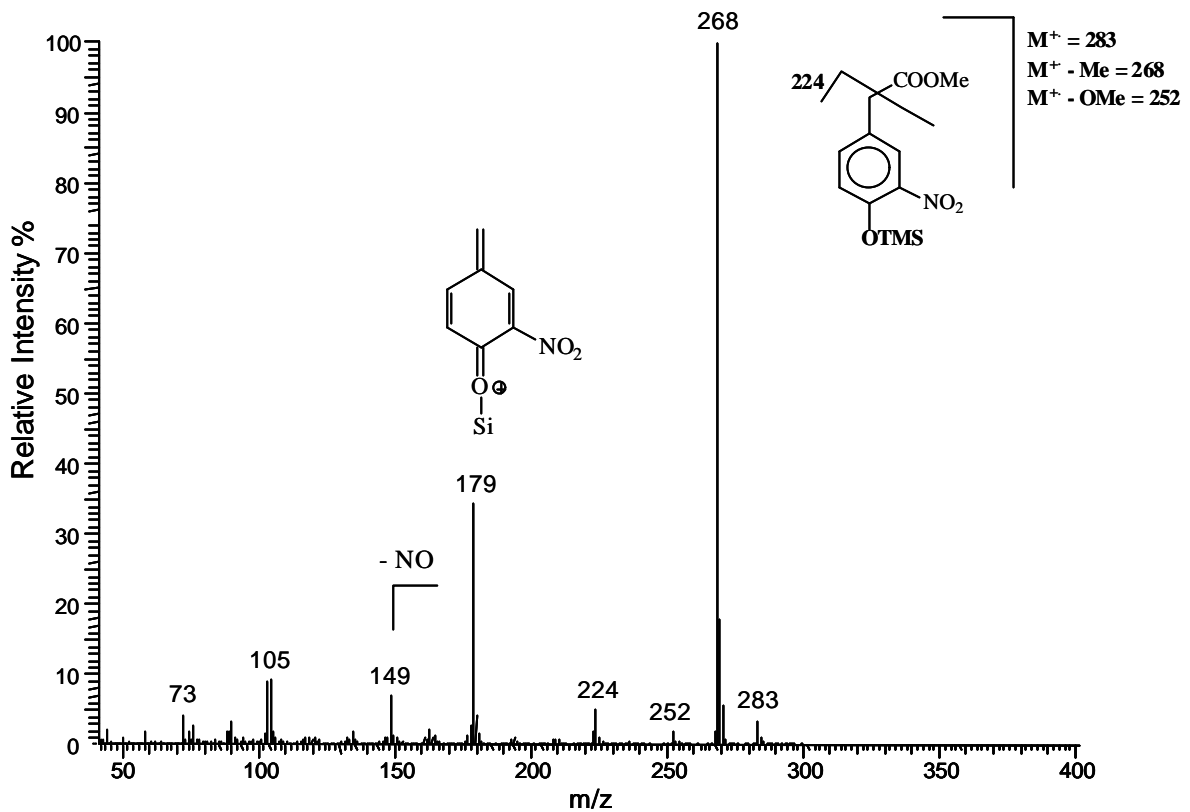
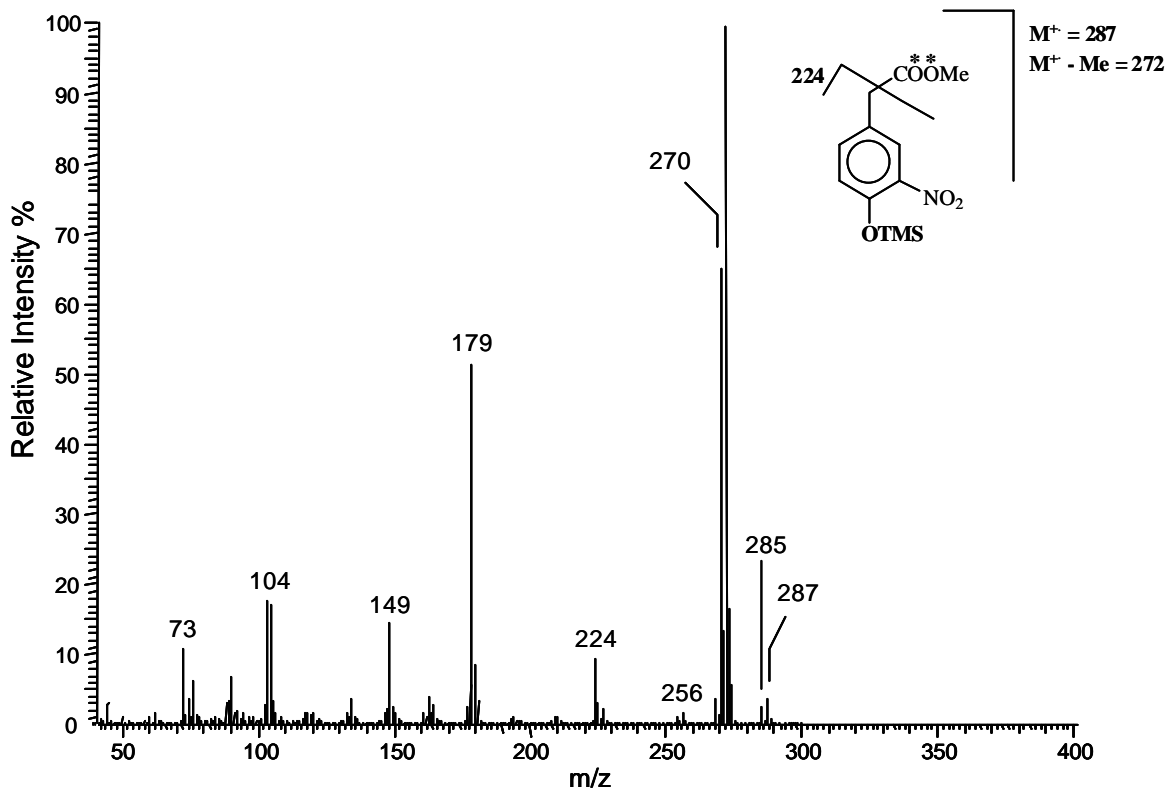
**A****B**

Abb. 41. EI-Massenspektren der Me-TMS-Derivate von 4-Nitro-3-hydroxyphenylacetic acid (A) und von 4-Nitro-3-hydroxyphenyl-[1,1'- $^{18}O_2$ ]essigsäure (B). Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV. Für (B): \*-Markierung der  $^{18}O$ -Atome.



Die durch den Verlust der Carboxyl- und der Methyl-Gruppe entstehenden Ionen mit  $m/z$  224 für 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und  $^{18}\text{O}$ -markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure enthalten keine  $^{18}\text{O}$ -Atome mehr. Die Ionen mit  $m/z$  224 und 179 sind spezifisch für den Nitro-Aromaten und finden sich auch im EI-Massenspektrum von 3-Nitrotyrosin (4.2.1.2). Die massenspektrometrische Analyse identifiziert das Reaktionsprodukt somit als 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]essigsäure. Ebenso wie für das enzymatische Labelling von Fettsäuren eignet sich folglich die Esterasereaktion für die Isotopenmarkierung von Aminosäuren.

*Bestimmung der isotopischen Reinheit des Produktes der enzymatischen Synthese nach HPLC-Aufreinigung.* Die isotopische Reinheit von 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]essigsäure wurde durch SIM der Ionen mit  $m/z$  376 für nicht markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure sowie  $m/z$  378 und 380 für einfach bzw. zweifach  $^{18}\text{O}$ -markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure bestimmt. Der Anteil an nicht markierter 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure betrug 3,2 %, während dieser für einfach bzw. zweifach  $^{18}\text{O}$ -markierte 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure 40,7 bzw. 56 % betrug.

*Diskussion.* Im Gegensatz zu der von Murphy *et al.* beschriebenen  $^{18}\text{O}$ -Markierung von Fettsäuren und Prostaglandinen kommt es bei der Umsetzung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure nicht nur zur Methylierung der Carboxyl-, sondern auch der aromatischen Alkoholgruppe [344,345]. Die Reaktivität von Diazomethan nimmt mit steigender Acidität der Reihe Alkyl-OH < Aryl-OH < COOH zu, weshalb die phenolische Hydroxylgruppe der Methylierung zugänglich ist [392]. Dies macht eine chromatographische Aufreinigung des Reaktionsgemisches unabdingbar. Die Rechromatographie (HPLC) des Produktes ergab einen einzigen Peak mit der Retentionszeit von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure. Auch die GC-MS-Analyse zeigte eine einzige Verbindung, die als 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]essigsäure identifiziert wurde. Die isotopische Reinheit ist für die Verwendung als interner Standard in der GC-MS ausreichend, jedoch wesentlich geringer als nach  $^{18}\text{O}$ -Markierung von Isoprostanen (4.1.1.2 und 4.1.3.3). Eine Erklärung hierfür und für die kleinere Ausbeute könnte eine sterische Hinderung der enzymatischen Hydrolyse durch den Nitroaromaten sein.

#### 4.2.3.2 NICI-Massenspektren

*Derivate und Gaschromatographie-(Tandem) Massenspektrometrie.* Massenspektren der Substanzen 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'- $^{18}\text{O}_2$ ]-

essigsäure (Synthese siehe 4.2.3.1) wurden von den entsprechenden PFB-TMS-Derivaten aufgenommen. Die Aufnahme der GC-MS- und GC-Tandem-MS-Spektren fand unter NICI-Bedingungen mit dem unter 3.5.2 beschriebenen GC-MS-System statt. Zur gaschromatographischen Trennung wurde eine Kapillarsäule DB 17 HT (J & W Scientific) der Dimension 30 m x 0,25 mm ID mit einer Filmdicke von 0,25 µm verwendet. Die Retentionszeit der PFP-TMS-Derivate betrug 11,55 min.

Tab. 13. GC-MS- und GC-Tandem-MS-NICI-Massenspektren der PFB-TMS-Derivate von 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure.

| Massenfragment /Verbindung <sup>a</sup>  | 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure | 3-Nitro-4-hydroxy-phenyl-[1,1'- <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ]essigsäure |
|--|-----------------------------------|--|
| <i>GC-MS-Massenspektren</i>  |                                   |  |
| [M] <sup>-</sup>   | n.d. <sup>b</sup>                 | n.d.   |
| [M - (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>           | 376 (100)                         | 380 (100) / 378 (78) <sup>c</sup>  |
| [M - (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> - NO] <sup>-</sup>       | 346 (5)                           | 350 (8) / 348 (5) <sup>c</sup>   |
| [M - PFB - (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Si=CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>     | 196 (10)                          | 200 (14) / 198 (10) <sup>c</sup>   |
| <i>GC-Tandem-MS-Massenspektren</i>   |                                   |  |
| [P] <sup>-</sup>   | n.d.                              | n.d.   |
| [PFB] <sup>-</sup>   | 181 (45)                          | 181 (47)   |
| [NO <sub>2</sub> (O)C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 151 (100)                         | 151 (100)  |
| [NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>  | 46 (20)                           | 46 (22)  |

<sup>a</sup>Massenfragmente *m/z* (Intensität %) der GC-NICI-Massenspektren der PFB-TMS-Derivate von 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure. CAD der Ionen [P]<sup>-</sup> = [M - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si=CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup> für die GC-Tandem-MS-Massenspektren.

<sup>b</sup>n.d. nicht detektierbar

<sup>c</sup>Beitrag von 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1-<sup>18</sup>O]essigsäure

Die NICI-Massenspektren der PFP-TMS-Derivate von 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure zeigen als intensivste Ionen [M - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si=CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup> und als etwas weniger intensive Ionen [M - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si=CH<sub>2</sub> - NO]<sup>-</sup> und [M - PFB - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si=CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (Tab. 13). Die Molekülionen und die Ionen [M - PFB]<sup>-</sup> konnten nicht detektiert werden. Aufgrund des hohen Anteils eines <sup>16</sup>O-Isotops in der Carboxyl-Gruppe von <sup>18</sup>O-markierter 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure (siehe 4.2.3.1) finden sich im Massenspektrum von 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure auch die entsprechenden Ionen von 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1-<sup>18</sup>O]essigsäure.

Die Ionen  $[M - (CH_3)_2Si=CH_2]^+$  ( $[P]^+$ ) wurden mit Argon weiter fragmentiert (CAD). Dabei entstanden unter den gewählten Kollisionsbedingungen die spezifischen Produktionen mit  $m/z$  151 ( $[NO_2(O)C_6H_3CH_2]^+$ ) und die unspezifischen Produktionen mit  $m/z$  181 für den PFB-Rest und  $m/z$  46 für Nitrit (Tab. 13). Das Produktion bei  $m/z$  151 enthält keine Carboxyl-Gruppe und somit keine  $^{18}O$ -Atome mehr. Zur GC-Tandem-MS-Quantifizierung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure wurden die gleichen Produktionen mit  $m/z$  151 (aus  $m/z$  376) für die endogene Substanz und  $m/z$  151 (aus  $m/z$  380) für den internen Standard gewählt.

#### 4.2.4 Metabolismus von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen

3-Nitrotyrosin wurde in der Ratte zu 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure (43,7 %) und 3-Nitro-4-hydroxymilchsäure (5,3 %) metabolisiert [225]. Die Pharmakokinetik von 3-Nitrotyrosin in Rattenplasma ist untersucht worden [306]. Im Folgenden ist die Pharmakokinetik von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen anhand der Plasmaspiegel von freiem und proteingebundenem 3-Nitrotyrosin sowie der Ausscheidung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure in den Urin untersucht worden.

*Bolus-Injektion beim Kaninchen.* Einem 2,8 kg schweren, weiblichen, lokal anästhesierten und heparinisierten Kaninchen (Lidocain, Heparin, 300 U/kg) wurden 10 mg 3-Nitrotyrosin in 3 ml physiologischer NaCl-Lösung in die Ohrvene injiziert. Über einen weiteren Zeitraum von 3 h folgte die Infundierung einer physiologischen NaCl-Lösung (24 ml/h). Die Blase wurde katheterisiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden jeweils 1,5 ml Blut in EDTA-Monovetten aus der Ohrarterie entnommen (0 bis 180 min, n=6). Das Blut wurde sofort zentrifugiert (5 min, 20.000 g) und das Plasma bis zur weiteren Analyse bei  $-78^\circ C$  gelagert. Zu den gleichen Zeitpunkten wurde die Blase vollständig entleert. Nach Entnahme wurde der Urin sofort zentrifugiert (5 min, 20.000 g) und der Überstand bei  $-78^\circ C$  gelagert. Folgende Volumina an Urin wurden entnommen: 14 ml zu Beginn sowie 8, 6,5, 21, 26 und 6 ml nach 10, 30, 60, 120 und 180 min.

*Aufarbeitung von Urin und Plasma.* Von den Urinproben wurden jeweils Aliquots von 200  $\mu$ l Urin mit 1750  $\mu$ l  $H_2O$  dest. und mit 10  $\mu$ l einer Lösung von 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1,1'- $^{18}O_2$ ]essigsäure (1 ng/ $\mu$ l) versetzt (n=2). Die Konzentration des internen Standards betrug 50 ng/ml Urin. Von den Plasmaproben wurden 1 ml-Aliquots ultrafiltriert, denen zuvor 6,7 pmol 3-Nitro-L- $[^2H_3]$ tyrosin als interner Standard zugesetzt wurden (n=2). Die Konzentra-

tion des internen Standards im Plasma betrug 6,7 nM. Zur Bestimmung des freien 3-Nitrotyrosins wurde das erste Ultrafiltrat verwendet (siehe unten). Die Bestimmung von freiem 3-Nitrotyrosin in der ersten Probe (0 min) wurde nach 4.2.1.1 mit GC-Tandem-MS durchgeführt. In allen anderen Proben wurde freies 3-Nitrotyrosin mit HPLC nach 3.4.3 bestimmt.

*Methode zur Bestimmung von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin mit GC-Tandem-MS.* Die Bestimmung von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin erfolgte nach der unter 4.2.2.1 beschriebenen analytischen Methode für 3-Nitrotyrosin-Reste in Proteinen. Die nach der Bolus-Injektion von 3-Nitrotyrosin zu erwartenden hohen Plasmakonzentrationen an freiem 3-Nitrotyrosin mussten jedoch vor der Bestimmung von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin aus den Proben entfernt werden. Dazu wurde das Plasma der Proben viermal ultrafiltriert (jeweils 2 h) und anschließend wieder mit 2 ml H<sub>2</sub>O dest. rekonstituiert. Nach der letzten Ultrafiltration wurde das Proteinkonzentrat zu 300 µl mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnt und der Proteingehalt bestimmt. Nach dem Proteinverdau wurden zu den eingesetzten 20 mg Plasmaprotein jeweils 15 pmol 3-Nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosin zugesetzt.

*Methode zur Bestimmung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure mit GC-Tandem-MS.* Nach Zugabe des internen Standards 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1',1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure wurden die Urinproben nach 3.1.1 mit C<sub>18</sub>-SPE-Kartuschen aufgereinigt (n=2). Zur TLC-Trennung wurden die Proben anschließend mit PFB-Br verestert. Die zur Trockene eingeeengten PFB-Ester wurden in 70 µl Ethylacetat aufgenommen und mindestens 12 h bei -78 °C gekühlt. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 g bei 4 °C) wurde der Überstand unter N<sub>2</sub> eingeeengt und mit 20 µl Ethanol aufgenommen. Die Trennung der PFB-Ester erfolgte mit dem unter 3.3.2 beschriebenen TLC-System. Als Referenzsubstanz wurde der PFB-Ester von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure verwendet. Die Referenzsubstanz (2 µg) wurde für jede Silicagel-Platte auf eine separate Bahn neben den biologischen Proben aufgetragen. Im Bereich des R<sub>f</sub>-Wertes der Referenz wurden 1-cm breite Banden für jede Probe ausgekratzt, mit 700 µl Ethanol extrahiert (5 min vortexen) und zentrifugiert (30 min, 4000 g). Die unter N<sub>2</sub> getrockneten Proben wurden mit BSTFA zu TMS-Ether umgesetzt. CAD der Ionen mit m/z 376 und m/z 380 führte zum identischen Produktion mit m/z 151 für die PFB-TMS-Derivate von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure und 3-Nitro-4-hydroxyphenyl-[1',1'-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]essigsäure (Tab. 13, 4.2.3.2), welche im SRM-Modus mit dem unter 3.5.2 beschriebenen GC-MS-System detektiert wurden.

*Freies 3-Nitrotyrosin.* Freies 3-Nitrotyrosin wurde nach der Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin in das venöse Blutssystem des Kaninchens aufgrund der hohen Konzentrationen von 3-Nitrotyrosin im Blutplasma mit der beschriebenen HPLC-Methode bestimmt. Lediglich in der Nullprobe (0 min) wurde 3-Nitrotyrosin im Plasma mit GC-Tandem-MS quantifiziert. Die Konzentration an freiem 3-Nitrotyrosin vor der Injektion von 3-Nitrotyrosin betrug  $1,8 \pm 0,5$  nM. Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Kinetik der Elimination von freiem 3-Nitrotyrosin im Plasma des Kaninchens ist in Abb. 42 wiedergegeben. Nach der Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin kommt es zu einem Abfall der Plasmakonzentration von freiem 3-Nitrotyrosin (Distributionsphase). Nach 20 Minuten beträgt die Plasmakonzentration von freiem 3-Nitrotyrosin noch  $20,9 \pm 0,5$   $\mu$ M. Im weiteren Zeitverlauf kommt es dann zur linearen logarithmischen Abnahme der Plasmakonzentration von freiem 3-Nitrotyrosin (Eliminationsphase). Die Halbwertszeit von 3-Nitrotyrosin in der Eliminationsphase wurde graphisch zu 175 min ermittelt.

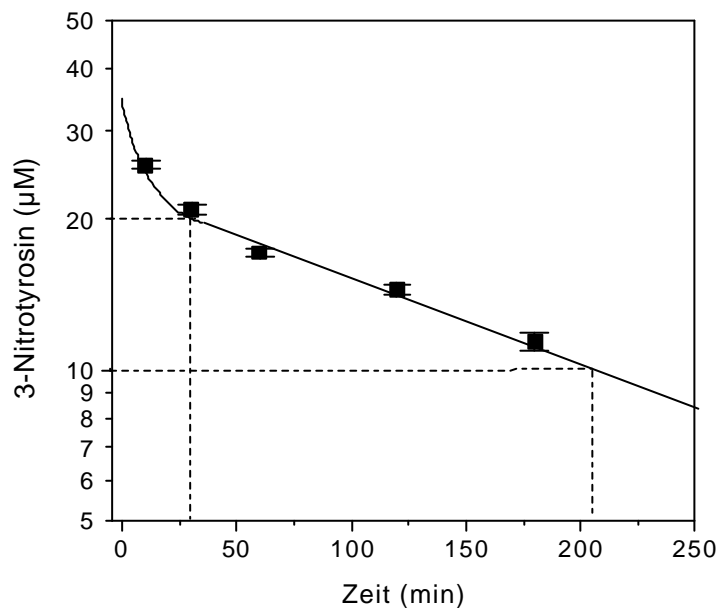


Abb. 42. Kinetik der Distribution und Elimination von freiem 3-Nitrotyrosin im Plasma nach Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin im Kaninchen. Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mit HPLC: 70 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /Methanol, 92/8 (v/v), pH 2,5; Absorptionmessung bei 356 nm ( $n=2$ , Mittel  $\pm$ SD).

*Proteingebundenes 3-Nitrotyrosin.* Aufgrund der hohen Konzentrationen von freiem 3-Nitrotyrosin im Plasma des Kaninchens nach der Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin wurde das zur Bestimmung von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin verwendete Proteinkonzentrat viermal ultrafiltriert und jeweils wieder in dest.  $\text{H}_2\text{O}$  rekonstituiert. Zur Quantifizierung wurde

die beschriebene GC-Tandem-MS-Methode verwendet. Die gemessenen Verhältnisse von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin zu Tyrosin-Resten in den Plasmaproteinen sind in Abb. 43 wiedergegeben. Das Verhältnis steigt zunächst stark an und fällt dann bis zur 60. Minute wieder ab. Darauf erfolgt ein weiterer Anstieg des Verhältnisses.

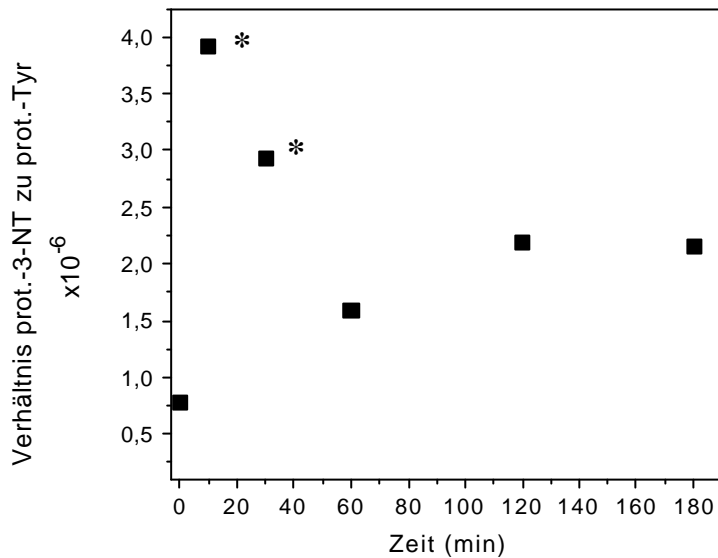


Abb. 43. Verhältnis von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin (prot.-3-NT) zu Tyrosin-Resten (prot.-Tyr) in den Plasmaproteinen nach Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin. Die mit \*markierten Messdaten wurden 10 und 30 min nach der Bolus-Injektion erhalten. Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin mittels GC-Tandem-MS.

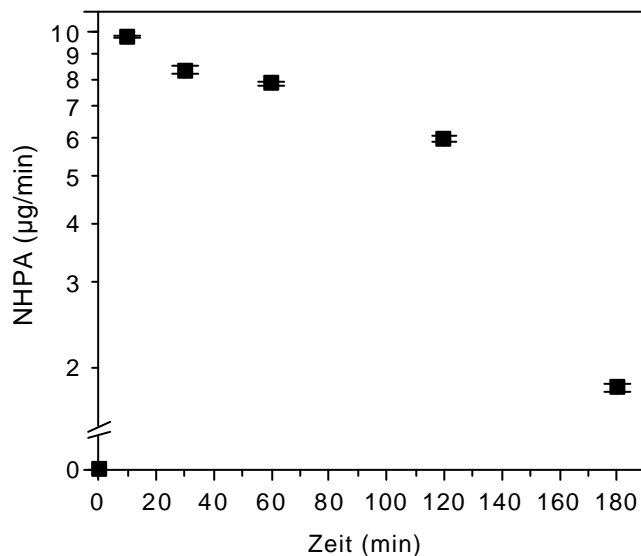


Abb. 44. Kinetik der Ausscheidung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (NHPA) in den Urin nach Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin im Kaninchen. Quantifizierung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylacetic acid mittels GC-Tandem-MS (n=2, Mittel  $\pm$ SD).

*3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure.* Die Konzentration von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure vor der Injektion von 3-Nitrotyrosin betrug  $7 \pm 2$  ng/ml Urin. Abb. 44 zeigt die um das ausgeschiedene Urinvolumen korrigierte Ausscheidungsrate von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure pro Minute zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Ausscheidung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure in den Urin betrug in der 1. Stunde  $415,6 \pm 4,7$   $\mu$ g, in der 2. Stunde  $359,3 \pm 5,2$   $\mu$ g und in der 3. Stunde  $108,8 \pm 2,2$   $\mu$ g. Nach drei Stunden waren insgesamt  $883,8 \pm 12,2$   $\mu$ g 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure ausgeschieden worden.

*Erläuterung.* Nach der Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin in das venöse Gefäßsystems eines Kaninchens kommt es zum  $1,4 \times 10^4$ -fachen Anstieg der Plasmakonzentration von freiem 3-Nitrotyrosin. Die Halbwertszeit der Eliminationsphase beträgt 175 min und ist dreimal so lang wie die Halbwertszeit von 3-Nitrotyrosin in Blutplasma der Ratte (65 min [306]). Gleichzeitig kommt es zum einem Anstieg von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin in den Proteinen des Blutplasmas. Nach 30 Minuten ist das Verhältnis zweifach gegenüber dem Ausgangswert vergrößert. Im weiteren Zeitverlauf steigen die Werte wieder an. Dieser Anstieg könnte durch den Einbau von 3-Nitrotyrosin-Resten in neu synthetisiertes Albumin erklärt werden. Bei einer Halbwertszeit von Albumin von sieben Tagen sollte der Anteil an in drei Stunden neu synthetisiertem Albumin jedoch nur 0,89 % betragen. Albumin macht etwa 50 % des Plasmaproteines aus [403]. Der kurzzeitige fünffache Anstieg von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin nach intravenöser Gabe von 3-Nitrotyrosin (10. min) könnte auf eine schwache Plasmaprotein-Bindung des freien 3-Nitrotyrosin zurückzuführen sein. Gegenüber einem  $1,4 \times 10^4$ -fachen Anstieg der Plasmakonzentration von freiem 3-Nitrotyrosin (10. min) liegt seine Plasmaprotein-Bindung etwa bei 0,04 %.

Nach drei Stunden wurden 8,8 % der gegebenen Dosis an 3-Nitrotyrosin (10 mg) im Urin als 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure wiedergefunden. Tabrizi-Fard *et al.* finden eine ähnliche Exkretionsrate von 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure in den Urin der Ratte trotz einer anderen Plasma-Halbwertszeit von 3-Nitrotyrosin (6,1 % [306]).

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodenentwicklung und Anwendung

Die Grundlage für die Erforschung biologischer Zusammenhänge bilden die eingesetzten analytischen Methoden. Je komplexer die zu untersuchende Matrix ist, desto schwieriger gestaltet sich die Entwicklung geeigneter Methoden. Die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) in der Biochemie erwies sich als sehr empfindlich und ermöglicht daher die Detektion äußerst geringer Substanzmengen [353]. Auf der GC-MS basierende Methoden erfordern oft eine aufwendige Probenvorbereitung mit kombinierten chromatographischen Trennverfahren wie SPE, TLC und HPLC sowie die Entwicklung geeigneter Derivatisierungstechniken. Eine Möglichkeit, die aufwendige Probenvorbereitung zu reduzieren, liegt im Einsatz der selektiveren CAD-Technik der GC-Tandem-MS. Ein weiterer Vorteil der GC-Tandem-MS ist die höhere Selektivität und damit größere Zuverlässigkeit der CAD-Technik.

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue analytische Methoden auf der Basis der GC-Tandem-MS zu entwickeln. Die entwickelten Methoden sollten die größtmögliche Zuverlässigkeit der quantitativen Bestimmung von Indexparametern des oxidativen Stresses *in vivo* am Menschen garantieren. Nicht nur für die Analytik der Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, sondern auch der Aminosäure 3-Nitrotyrosin konnten entsprechende GC-Tandem-MS-Methoden entwickelt und in der zu untersuchenden Matrix validiert werden. Diese neuen Methoden bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber bereits in der Literatur beschriebenen analytischen Verfahren. Diese Vorteile schließen ein: große Akkuratheit und Präzision, hohe Empfindlichkeit, Interferenzfreiheit und eine Verringerung des Zeit- und Materialaufwands für die Probenvorbereitung durch größere Selektivität. Die entwickelten GC-Tandem-MS-Methoden wurden bei *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten erfolgreich eingesetzt und haben die Durchführung klinischer Studien zu Fragestellungen des oxidativen Stresses ermöglicht. Daneben wurden zwei weitere analytische Verfahren zur Trennung des Isoprostanes 8-iso-PGE<sub>2</sub> von seinem enzymatisch gebildeten Isomer PGE<sub>2</sub> entwickelt.



### 5.1.1 GC-Tandem-MS-Analytik von Isoprostanen

Seit Entdeckung der Isoprostane in biologischen Flüssigkeiten und Geweben als Folge einer durch freie Radikale verursachten Lipid-Peroxidation wurden zahlreiche Arbeiten zur Quantifizierung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen mit GC-MS publiziert [189,200-205]. Zur Probenvorbereitung sind bisher SPE und HPLC [204,205] oder SPE und TLC miteinander kombiniert worden [200]. Die im menschlichen Urin gemessenen Konzentrationen an F<sub>2</sub>-Isoprostanen variieren zwischen  $1,1 \pm 0,02$  ng/mg [204],  $1,6 \pm 0,6$  und  $1,7 \pm 0,2$  ng/mg [78,393] und  $325 \pm 308$  ng/mg Kreatinin [394], je nach eingesetzter Methode. Es bleibt jedoch unklar, welche F<sub>2</sub>-Isoprostane quantifiziert wurden. Ein Vergleich der Ergebnisse ist daher schwierig und eine Aussage über die Zuverlässigkeit der jeweiligen Methode nicht möglich.

In jüngster Zeit sind einige Arbeiten erschienen, in denen explizit 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in biologischen Flüssigkeiten quantifiziert wurde. Zur Quantifizierung wurden sowohl immunologische als auch massenspektrometrische Analyseverfahren eingesetzt [149,150,208-210,217]. Der Einsatz von GC-MS führte zur Bestimmung von recht einheitlichen mittleren Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  im menschlichen Urin von Erwachsenen, so dass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich wurde:  $159 \pm 18$  pg/mg [149],  $221 \pm 106$  pg/mg (Alter 21 – 54 Jahre, n=19) [209],  $244 \pm 25$  pg/mg [354],  $174 (56 - 321)$  pg/mg (Alter 20 – 57 Jahre, n=32) [395] und  $204 \pm 19$  pg/mg Kreatinin (Alter 20 – 54 Jahre, n=38) [396]. Die GC-MS-Analytik setzt jedoch umfangreiche Probenvorbereitung voraus, darunter Kombinationen von SPE, HPLC und TLC [208] oder mehrere TLC-Trennungen hintereinander [149]. Eine besondere Aufreinigungstechnik für Urinproben wurde von Bachi *et al.* [217] vorgestellt. Es wurde ein Antikörper entwickelt, der für die Immunoaffinitätschromatographie der biologischen Proben eingesetzt werden konnte. Ohne weitere Probenvorbereitung wurde 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  im Urin von Nichtrauchern und Rauchern quantifiziert ( $8,08 \pm 2,3$  ng/h vs.  $18,40 \pm 4,77$  ng/h m<sup>2</sup> [217]). Der Einsatz der immunoaffinitätschromatographischen Aufreinigungstechnik blieb jedoch bisher aufgrund der kommerziellen Nichtverfügbarkeit auf diese Arbeitsgruppe beschränkt [157,217].

Die in dieser Dissertation vorgestellte GC-Tandem-MS-Methode zur Quantifizierung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  vereinfacht die Probenvorbereitung. Es konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche HPLC-Trennung der Isoprostane nicht mehr nötig ist. Nach der Festphasenextraktion ist nunmehr nur noch die TLC-Trennung der derivatisierten Proben notwendig. Die Methode

wurde in menschlichem Urin validiert und erlaubt die selektive und sensitive Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> bei einem LOD von 5 pg/ml Urin. Der Analyt konnte massenspektrometrisch als 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in einer Urinprobe identifiziert werden. In einer Gruppe gesunder Probanden (Alter 31 ±5 Jahre, Mittel ±SD, n=14) wurde eine mittlere 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den Urin von 223 ±135 pg/mg Kreatinin gefunden. Dies bestätigt die zuvor von anderen Gruppen mit GC-MS ermittelten Werte (s.o.) und unterstreicht noch einmal die Vergleichbarkeit der Messergebnisse. Die Festlegung eines Normwertes für die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den menschlichen Urin wird möglich. Eine auf Kreatinin bezogene Ausscheidung ist sinnvoll und die Sammlung von 24-Stunden Urinen erübrigt sich. So konnte gezeigt werden, dass sich das im Morgenurin bestimmte Verhältnis von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu Kreatinin nicht von demjenigen in 24-Stunden Urinen unterscheidet.

Die entwickelte analytische Methode wurde in einer explorativen Studie zur Erkrankung des Zellweger-Syndroms eingesetzt [350]. Für Kinder mit Zellweger-Syndrom ist eine 124-fache Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung gegenüber einer Gruppe von gesunden Kindern ermittelt worden. Ob dieses Krankheitsbild mit einem erhöhten oxidativen Stress verbunden ist, bleibt jedoch fraglich. Die Störung der peroxisomalen β-Oxidation führt offensichtlich zu einer verminderten Metabolisierung und dadurch zu einer vermehrten Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin. Eindeutig eine Reduktion des oxidativen Schadens konnte mit der hier vorgestellten analytischen Methode im Urin von Kaninchen durch Vitamin E nachgewiesen werden [397]. In dieser tierexperimentellen Studie wurden Möglichkeiten der Behandlung einer bestehenden Arteriosklerose untersucht. Die Arteriosklerose wurde durch eine Cholesterin-Diät der Tiere induziert. Auch L-Arginin führte über eine Verbesserung der Endothelfunktion zu einer Verringerung des entstandenen Schadens und damit zu einer Erniedrigung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung.

Dem selektiven β<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Nebivolol wird eine zusätzliche, über NO-vermittelte vasodilatierende Eigenschaft zugeschrieben [398]. In einer klinischen Studie konnte mit der hier entwickelten GC-Tandem-MS-Methode zur Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> gezeigt werden, dass es unter Medikation mit Nebivolol zu einer statistisch signifikanten Reduktion der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den Urin kommt [399]. Die protektiven Eigenschaften von Nebivolol sind offensichtlich auf eine Reduktion des durch freie Radikale entstandenen Schadens zurückzuführen. Inwieweit jedoch eine erhöhte NO-Produktion unter Nebivolol für

das Abfangen freier Radikale und damit für eine Verringerung der *in vivo*-Lipid-Peroxidation verantwortlich gemacht werden kann, ist bisher nicht geklärt.

Vergleicht man die mittlere gefundene 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung Erwachsener (Alter 31 ±5 Jahre, n=14) mit der von Kindern (Alter 6,4 ±1,9 Jahre, n=5), so zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied: 223 ±135 pg/mg vs. 510 ±160 pg/mg Kreatinin (p < 0,02, zweiseitiger unabhängiger t-Test). Für die untersuchten Gruppen besteht ein Trend zur altersabhängigen Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (r=-0,53, Abb. 45). Eine um 13 % niedrigere Isoprostan-Ausscheidung für Erwachsene gegenüber Kindern wird auch von Schweer *et al.* berichtet [150]. Der Unterschied ist jedoch wesentlich geringer; möglicherweise spielt das höhere Alter der Kinder (6 – 15 Jahre) in der Studie von Schweer *et al.* eine Rolle. Die höhere Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin der Kinder könnte auf eine höhere Stoffwechselaktivität zurückzuführen sein und damit weniger auf eine altersbedingte Abnahme des oxidativen Stresses.

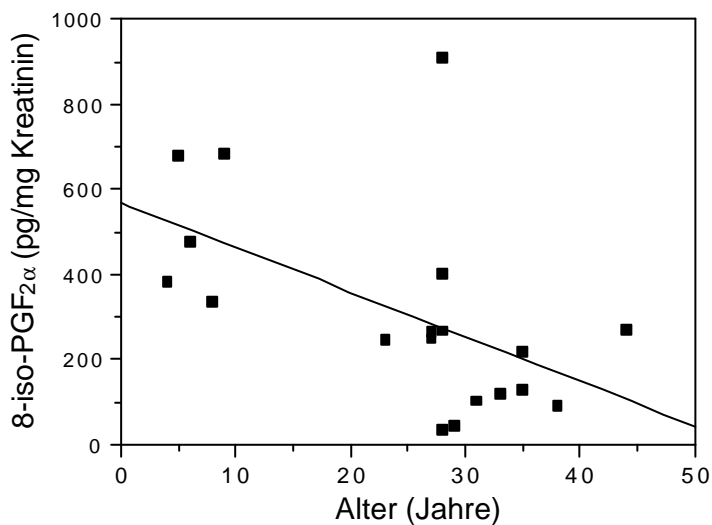


Abb. 45. Abhängigkeit der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den Urin vom Alter gesunder Probanden (r=-0,53, n=19). Daten aus 4.1.1.6 und 4.1.3.7.

Als Hauptmetabolit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin wurde 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> identifiziert [156,157]. Eine Methode zur GC-Tandem-MS-Analytik von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde entwickelt und für menschlichen Urin validiert. Wie auch für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> waren Akkuratheit, Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode mit über 94 % sehr hoch. Das Detektionslimit lag bei umgerechnet 1 pg/ml Urin für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Auch für die GC-Tandem-MS-Analytik von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-

iso-PGF<sub>2α</sub> ist eine zusätzliche HPLC-Trennung der Proben nicht erforderlich. Wird die neben der Festphasenextraktion nötige TLC-Trennung der derivatisierten Proben durch eine HPLC-Trennung ersetzt, so ist die Quantifizierung mehrerer Dinor-dihydro-Metabolite von F<sub>2</sub>-Isoprostanen möglich. Die Kombination aus HPLC und GC-Tandem-MS wurde ebenfalls für menschlichen Urin validiert. Die Akkuratheit, Präzision und Reproduzierbarkeit sind jedoch mit > 86 % schlechter als für die Kombination aus TLC und GC-Tandem-MS. Trotz der Probleme, die mit der Messung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen verbunden sind, wurde vorgeschlagen, dass die Messung mehrerer F<sub>2</sub>-Isoprostane eine integrativere Abschätzung der *in vivo*-Lipidperoxidation erlaubt [204]. Die mit den beiden GC-Tandem-MS-Methoden erhobenen Daten zum Vergleich der Ausscheidung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit Dinor-dihydro-Metaboliten der F<sub>2</sub>-Isoprostane zeigen jedoch, dass nur eine geringe Korrelation zwischen beiden Parametern existiert ( $r = 0,489$ ,  $n=14$ ). Es ist nicht bekannt, von welchen F<sub>2</sub>-Isoprostanen die Dinor-dihydro-Metabolite mit der analytischen Methode erfasst werden.

Die mit GC-Tandem-MS-Analytik bestimmte mittlere 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung betrug  $506 \pm 225$  pg/mg Kreatinin (Alter  $31 \pm 5$  Jahre,  $n=14$ ). Die gemessene Konzentration von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> bestätigt frühere Messungen mit GC-MS ( $390 \pm 180$  pg/mg Kreatinin [368]). Die von Morrow *et al.* entwickelte GC-MS-Methode stellt ebenfalls eine Kombination von SPE und TLC-Trennung zur Probenvorbereitung dar [368]. Daher wurde die GC-Tandem-MS-Analytik von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit der GC-MS-Analytik verglichen. Trotz einer recht hohen Korrelation zwischen den mit GC-Tandem-MS und GC-MS gemessenen Konzentrationen ( $r=0,89$ ), unterscheiden sich die einzelnen Messwerte z.T. erheblich. Das Verhältnis der Messwerte von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> aus der GC-MS-Analyse zu denen aus der GC-Tandem-MS-Analyse betrug  $1,0745 \pm 0,5064$  bei einer RSD von 47 %. Vergleicht man bei einfacheren analytischen Fragestellungen das Verhältnis der Messwerte aus der GC-MS-Analyse mit denen aus der GC-Tandem-MS-Analyse, so ist die Varianz wesentlich geringer. Ein Beispiel sind die Messwerte für Nitrat in menschlichem Urin. Hier wurde ein Verhältnis der Messwerte der GC-MS-zur GC-Tandem-MS-Analyse von  $0,9855 \pm 0,0275$  mit einer RSD von nur 2,8 % gefunden [400]. Im Gegensatz zur Bestimmung von Nitrat im Urin gewährleistet die GC-Tandem-MS-Analytik des Isoprostans 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> eine gegenüber der GC-MS-Analytik höhere Akkuratheit des Messergebnisses.

Die für die quantitative Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> entwickelten Methoden basieren auf den gleichen analytischen Trennungen: SPE und TLC. Für die gleichzeitige Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in einer Urinprobe erübrigt sich eine separate SPE- und TLC-Aufarbeitung der Proben. Es wurde gezeigt, dass eine simultane GC-Tandem-MS-Quantifizierung aufgrund von Interferenzen jedoch nicht möglich ist. Ein Vergleich der mittleren gemessenen Ausscheidung von 506 ±255 pg/mg für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigt, dass diese etwa doppelt so groß wie die des Precursors 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (223 ±135 pg/mg) in der untersuchten Gruppe ist. Die Korrelation zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist recht hoch (r=0,86, n=14). Die gleichzeitige Bestimmung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in einer klinischen Studie zu Therapie der Hypertriglycerinämie mit der hier vorgestellten GC-Tandem-MS-Analytik ergab eine ähnlich hohe Korrelation beider Parameter (r=0,78, n=20) [401]. In dieser klinischen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die Therapie der Hypertriglycerinämie mit Bezafibrat zu einer signifikanten Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den menschlichen Urin führt [401]. Die könnte möglicherweise auf eine Verringerung der gemessenen Plasmakonzentration an Vitamin E zurückzuführen sein. Im Tiermodell der Hypercholesterinämie bewirkte Vitamin E, wie bereits diskutiert, eine Abnahme der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung [397].

Das von der Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase gebildete PGH<sub>2</sub> ist instabil und lagert sich mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten unter anderem in PGD<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> um [153]. Entsprechend sollten sich radikalisch gebildete Isomere des PGH<sub>2</sub> auch in E<sub>2</sub>- und D<sub>2</sub>-Isoprostane umlagern. Tatsächlich konnte die Bildung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> in tierischem Gewebe als Folge einer verstärkten Lipidperoxidation nachgewiesen werden [94]. Zur Trennung von PGE<sub>2</sub> und seinem radikalisch gebildeten Isomer 8-iso-PGE<sub>2</sub> wurden zwei analytische Methoden entwickelt. Während die PFB-MO-TMS-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> weder gaschromatographisch noch massenspektrometrisch voneinander getrennt werden konnten, gelang dies für die Me-PFBO-TMS-Derivate beider Verbindungen. Aufgrund der geringen relativen Intensität der für die massenspektrometrische Bestimmung von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> notwendigen spezifischen Ionen ist diese Methode für biologische Matrices jedoch nur bedingt geeignet. Eine Alternative zur GC-Trennung der Me-PFBO-TMS-Derivate besteht in der TLC-Trennung der PFB-MO-Derivate von PGE<sub>2</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub>. So wurde die TLC-Trennung der Methoxim-Isomere von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> als Probenvorbereitung für die GC-Tandem-MS-Analytik von 8-iso-PGE<sub>2</sub> in Humanurin eingesetzt [402]. Die Konzentration von

---

8-iso-PGE<sub>2</sub> im Urin gesunder Probanden liegt allerdings unter dem Detektionslimit der massenspektrometrischen Methode (5 pg/ml Urin [402]).

### 5.1.2 GC-Tandem-MS-Analytik von 3-Nitrotyrosin

Immunohistochemische Methoden eignen sich zur Lokalisation von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen in unterschiedlichen Geweben [270,316]. Während sich diese Methoden nicht zur Quantifizierung der freien Aminosäure eignen, sind in der Literatur zahlreiche HPLC-Methoden mit unterschiedlichen Detektoren beschrieben worden [233,262,273,284,314,315,325,326]. Der Einsatz dieser HPLC-Methoden zur quantitativen Analyse von 3-Nitrotyrosin in humanen Flüssigkeiten blieb jedoch beschränkt [307,309,312,326]. Die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in humanem Blutplasma erfolgte zunächst nur für Proben von erkrankten Personen. So wurde über 3-Nitrotyrosin-Konzentrationen von  $28,0 \pm 12,3 \mu\text{M}$  für dialysepflichtige Patienten mit Nierenversagen und von  $118,2 \pm 22,0 \mu\text{M}$  für Patienten mit zusätzlichem septischen Schock berichtet [309]. Basale Konzentrationen von 3-Nitrotyrosin konnten mit diesen Methoden jedoch nicht gemessen werden. Lediglich mit Fluoreszenz-Detektion konnte eine basale 3-Nitrotyrosin-Konzentration von  $31 \pm 6 \text{ nM}$  im Blut von gesunden Probanden mit HPLC ermittelt werden [326].

Die massenspektrometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in biologischer Matrix bietet gegenüber anderen Detektionsmethoden ein hohes Maß an Sensitivität und Genauigkeit. Bisher wurden nur wenige massenspektrometrische Bestimmungsmethoden für 3-Nitrotyrosin entwickelt [327,329-331]. Dies lag u.a. an der Schwierigkeit, geeignete Derivatisierungsprozeduren zu finden. Voraussetzung für die gaschromatographische Trennung von Aminosäuren ist ihre Derivatisierung zu leicht flüchtigen und unpolaren Verbindungen [384]. Shigenaga *et al.* zeigten zudem, dass unter den sauren Derivatisierungsbedingungen eine artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Nitrat und Nitrit und Tyrosin möglich ist [274]. Die Ergebnisse sind von anderen Autoren bestätigt worden [223,308,330]. In menschlichem Blutplasma finden sich bis zu  $100 \mu\text{M}$  Tyrosin [386], 20 bis  $60 \mu\text{M}$  Nitrat und 1 bis  $3 \mu\text{M}$  Nitrit [385]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit <sup>15</sup>N-markierten Verbindungen gezeigt werden, dass es auch für diese physiologisch relevanten Konzentrationen von Nitrat und Nitrit zur artifiziellen Bildung von 3-Nitrotyrosin kommt. Ein spezielles Verfahren wurde entwickelt, mit dem Nitrat, Nitrit, Tyrosin und Proteine aus den Plasmaproben entfernt werden konnten. Eine schonende Ultrafiltration trennt zunächst die Plasmaproteine ab. Die anschlie-

Bende HPLC-Trennung des Ultrafiltrates ermöglicht eine vollständige Abtrennung von Nitrat, Nitrit und Tyrosin. Es konnte gezeigt werden, dass Tyrosin-Konzentrationen  $1 \mu\text{M}$  nicht mehr zu einer messbaren Bildung von 3-Nitrotyrosin führen.

Unterschiedliche Derivate wurden bisher zur massenspektrometrischen Analyse von 3-Nitrotyrosin eingesetzt [308,327,329-331]. Eine Vereinfachung der Derivatisierung von 3-Nitrotyrosin durch Reaktion mit einem einzigen Reagenz ist vorgeschlagen worden [274,331]. Ein tri-TMS-Derivat von 3-Nitrotyrosin erwies sich als hilfreich bei Metabolismus-Untersuchungen mit  $^{15}\text{N}$ -Arginin, jedoch als ungeeignet zur massenspektrometrischen Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin [274]. Nach Derivatisierung von 3-Nitrotyrosin zum tri-PFB-Derivat zeigt sich unter NICI-Bedingungen eine nur schwache Fragmentierung. Das LOD wurde bei 13 fmol erreicht [331]. Auch das in dieser Arbeit generierte *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat von 3-Nitrotyrosin zeigte eine nur schwache Fragmentierung, sowohl unter MS- als auch unter Tandem-MS-Bedingungen. Die chromatographischen wie auch massenspektrometrischen Eigenschaften des *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivats von 3-Nitrotyrosin erlauben jedoch im Vergleich zu bisherigen Derivatisierungstechniken die besonders empfindliche Detektion des Analyten. Die entwickelte GC-Tandem-MS-Methode zeichnet sich durch ein extrem niedriges LOD von 4 amol 3-Nitrotyrosin aus. Das LOQ der Methode liegt bei 125 pM für 3-Nitro- $^{14}\text{C}_9$ tyrosin in Humanplasma. Dies sind die bisher kleinsten Werte für eine analytische Methode zu Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin in Humanplasma [263,308,326,329].

Bisherige massenspektrometrische Methoden nutzen einfache GC-MS zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin [327,329-331]. Im Gegensatz dazu bietet die in dieser Arbeit für humanes Blutplasma validierte Methode zusätzlich die erforderliche Selektivität zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin. Dies wird durch den Einsatz der CAD-Technik erreicht. Aufgrund der besonderen Empfindlichkeit der Methode für das eingesetzte *n*-Propyl-PFP-TMS-Derivat konnte ein Tochtterspektrum von 3-Nitrotyrosin aus einer humanen Blutplasmaprobe aufgenommen werden. Neben den für die Identifikation von 3-Nitrotyrosin als Analyten im Tochtterspektrum vorhandenen charakteristischen Ionen, fanden sich jedoch weitere Ionen einer nicht näher identifizierten Verunreinigung. Daraus ergibt sich eindeutig die Notwendigkeit der GC-Tandem-MS-Analyse von 3-Nitrotyrosin. Ein durchgeführter Vergleich der GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analyse von 3-Nitrotyrosin in einem Kollektiv von 12 gesunden Probanden ergab, dass die mit GC-MS in humanem Blutplasma gemessene mittlere Konzentration in der Tat um einen Faktor von etwa 4,5 größer ist.

Die in der Gruppe von zwölf weiblichen und männlichen Probanden (Alter  $51 \pm 10$  Jahre) gefundene Plasmakonzentration von 3-Nitrotyrosin betrug  $1,15 \pm 0,71$  nM (0,67 bis 2,46 nM). Die GC-Tandem-MS-Methode wurde auch zur Bestimmung der mittlere Plasmakonzentration von 3-Nitrotyrosin in einer Probandengruppe jüngeren Alters eingesetzt ( $32 \pm 6$  Jahre,  $n=11$ ) [382]. 3-Nitrotyrosin wurde in dieser Gruppe in einer mittleren Konzentration von  $2,8 \pm 0,84$  nM gemessen. Die Altersabhängigkeit der 3-Nitrotyrosin-Konzentration im humanem Blutplasma ist jedoch aufgrund einer großen Streuung der Messwerte gering ( $r=-0,31$ ,  $n=23$ ). Eine Geschlechterabhängigkeit der 3-Nitrotyrosin-Konzentration konnte nicht festgestellt werden.

Sowohl die bei jüngeren als auch älteren Probanden gefundenen 3-Nitrotyrosin-Konzentrationen liegen weit unter bisher veröffentlichten Werten für humanes Blutplasma:  $31 \pm 6$  nM [326] und  $62 \pm 3$  nM 3-Nitrotyrosin [330]. Die Quantifizierung erfolgte nach Derivatisierung des Blutplasmas mit Fluoreszenzdetektion [326] bzw. mit GC-MS [330]. Eine vorherige Abtrennung von Nitrat, Nitrit und Tyrosin aus den Plasmaproben fand bei keiner dieser Methoden statt. Eine Ursache für die Erfassung überhöhter Konzentrationen von 3-Nitrotyrosin ist die artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Tyrosin und Nitrat und Nitrit bei der Derivatisierung der Proben vor ausreichender Trennung. Tatsächlich konnten Yi *et al.* ohne vorherige Abtrennung von Tyrosin und Nitrat und Nitrit keine zuverlässige GC-MS-Methode entwickeln [308]. Denkbar ist auch die Möglichkeit einer Interferenz durch eine coeluiierende Substanz, die wegen nicht eingesetzter chromatographischer Trennung, z.B. HPLC wie in der vorliegenden Arbeit, nicht eliminiert wurde. Mit LC-Tandem-MS, die auf eine vorherige Derivatisierung der Proben verzichten kann, bestätigten Yi *et al.* die hier gewonnenen Ergebnisse: Bei einem LOQ von 4,4 nM 3-Nitrotyrosin konnten diese Autoren kein 3-Nitrotyrosin im Blutplasma von gesunden Probanden quantifizieren [308].

Die entwickelte GC-Tandem-MS Methode zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin stellt eine Kombination aus Ultrafiltration, HPLC und GC-Tandem-MS dar. Wird nach der Ultrafiltration nicht das Ultrafiltrat, sondern das Protein-Konzentrat einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen, so ist die anschließende GC-Tandem-MS-Analyse von 3-Nitrotyrosin-Resten aus den Proteinen des Blutplasmas möglich. Auf eine HPLC-Trennung vor der Derivatisierung der Proben wurde weiterhin nicht verzichtet. Die Anwendbarkeit der Methode zur Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin-Resten aus Plasmaproteinen konnte gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von Tyrosin-Resten aus Plasma-



proteinen nach enzymatischer Hydrolyse entwickelt. Die enzymatische Hydrolyse durch Pronase E hat gegenüber der sauren Hydrolyse mit 6 M HCl den großen Vorteil, dass eine artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin unwahrscheinlich ist [314,324]. Hensley *et al.* berichten von weiteren Problemen bei der sauren Hydrolyse von Proteinen bei der Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin-Resten, wie z.B. eine schlechte Reproduzierbarkeit und die Bildung von Oxidationsprodukten unter den harschen Hydrolysebedingungen [321,322].

In der gleichen Probandengruppe, in der zuvor die Konzentration von 3-Nitrotyrosin im Blutplasma bestimmt worden war (Alter  $51 \pm 10$  Jahre), wurde auch das Verhältnis von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten in Plasmaproteinen bestimmt. Das mittlere Verhältnis von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten im Blutplasma betrug  $1,48 \pm 0,54 \mu\text{mol}$  3-Nitrotyrosin/mol Tyrosin. Damit kommen auf ein Molekül 3-Nitrotyrosin etwa  $0,7 \times 10^6$  Moleküle Tyrosin. Dies stimmt mit den Ergebnissen von K. A. Skinner *et al.* überein ( $2,3 \mu\text{mol}$  3-Nitrotyrosin/mol Tyrosin [273]), steht jedoch im Widerspruch zu anderen Ergebnissen [317,330]. Während nach einer ELISA-Methode etwa  $3 \times 10^7$  Moleküle Tyrosin auf ein Molekül 3-Nitrotyrosin in HSA kommen [317], wurde mit GC-MS in menschlichen Plasmaproteinen ein Verhältnis von  $3 \times 10^4$  bestimmt ( $35,4 \mu\text{mol}$  3-Nitrotyrosin/mol Tyrosin [330]). Möglicherweise ist das Verhältnis von 3-Nitrotyrosin zu Tyrosin unterschiedlich für HSA und andere Plasmaproteine. HSA macht etwa 50 % der Plasmaproteine aus [403]. Auch unterliegen unterschiedliche Proteine in unterschiedlichem Ausmaß der Nitrierung [282]. Daneben mögen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies bestehen, so z.B. für Rattenplasma ( $0,5 \times 10^7$  [274]). Unabhängig davon unterscheiden sich jedoch die mit GC-MS und GC-Tandem-MS in humanem Blutplasma gemessenen Verhältnisse erheblich. Daher wurde die GC-Tandem-MS-Analyse der Plasmaproben wiederum mit der GC-MS-Analyse verglichen. Im Mittel fand sich für die GC-MS-Analyse ein um den Faktor 1,6 höheres Verhältnis von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten. Wie bereits für die quantitative Bestimmung von 3-Nitrotyrosin als freie Aminosäure in humanem Blutplasma erläutert, liegt die Ursache für die unterschiedlichen Messergebnisse in der höheren Selektivität der GC-Tandem-MS-Analytik. Dies allein erklärt jedoch noch nicht die von Frost *et al.* beschriebenen, etwa 24-fach höheren Verhältnisse von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten [330]. Eine Ursache hierfür könnte der Verzicht auf eine HPLC-Trennung vor der Derivatisierung der Proben sein. Wiederum mit LC-Tandem-MS konnten Yi *et al.* zeigen, dass die GC-MS-Analyse ohne vorherige HPLC-Trennung zu einer Überschätzung des Verhältnisses von 3-Nitrotyrosin- zu Tyrosin-Resten führt: Statt des im Gewebehomogenat von Rattenherzen ohne vorherige HPLC-Aufreinigung gefundenen

Verhältnisses von 3-Nitrotyrosin zu Tyrosin von 150  $\mu\text{mol/mol}$  fanden sie ein Verhältnis von  $< 15 \mu\text{mol/mol}$  [308,329,332].

## 5.2 Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin $F_{2a}$ und 3-Nitrotyrosin

Zwei unterschiedliche Untersuchungen zum Metabolismus von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und 3-Nitrotyrosin wurden in dieser Arbeit durchgeführt: Zum einen wurde der Metabolismus von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  *in vitro* in der Zellkultur von Schweinehepatozyten untersucht, zum anderen der Metabolismus von 3-Nitrotyrosin *in vivo* in einem Kaninchen. Ferner wurde auch eine Reihe von Daten zum Hauptmetaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in menschlichem Urin gesammelt.

### 5.2.1 Metabolismus von 8-iso-Prostaglandin $F_{2a}$ in der Zellkultur von Schweinehepatozyten

Der Metabolismus von PGF $_{2\alpha}$  und anderen Prostaglandinen ist eingehend in der Zellkultur von Hepatozyten untersucht worden [404,405]. Auch wurde die Zellkultur von Hepatozyten zur Gewinnung von mit Isotopen markierten Metaboliten von Prostaglandinen eingesetzt [406]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sandwich-Kultur von Hepatozyten hat den Vorteil, dass die physiologischen Funktionen des Hepatozyten erhalten bleiben [360]. Mit der Sandwich-Kultur von Schweinehepatozyten wurde der Metabolismus von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  untersucht. Als Hauptmetabolit von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  wurde 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  gefunden. 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  konnte eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden. Daneben wurde die Kinetik des Metabolismus von 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  untersucht. Nach 18 Stunden fanden sich im Zellüberstand noch 31 % des ursprünglichen 8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$ , während 48 % zu 2,3-Di-nor-8-iso- $^3\text{H}$ PGF $_{2\alpha}$  umgewandelt worden waren. Damit ist 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in der Sandwich-Kultur von Schweinehepatozyten der Hauptmetabolit. Für den Menschen ist dagegen 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  der Hauptmetabolit im Urin [156]. C. Chiabrando *et al.* fanden in der Zellkultur von Rattenhepatozyten neben 2,3-Dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  als weiteren Metaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  noch 2,3,4,5-Tetranor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  [157]. Ebenfalls den Tetranor-Metaboliten wiesen T. Sago *et al.* in der Rattenhepatozytenkultur als Metaboliten von PGF $_{2\alpha}$  nach. Als weiteren Metaboliten von PGF $_{2\alpha}$  fanden sie 2,3-Dinor-5,6-dihydro-PGF $_{2\alpha}$ , jedoch kein 2,3-Dinor-PGF $_{2\alpha}$  [404]. Möglicherweise unterscheidet sich der

---

Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und PGF<sub>2α</sub> in der Zellkultur unabhängig von der Spezies der eingesetzten Zellen. Auch beim Menschen ist der Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> offensichtlich anders als der von PGF<sub>2α</sub> [154-156].

### 5.2.2 Korrelation zwischen 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub> und seinem Metaboliten in menschlichem Urin

Ein Vergleich der Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seinem Hauptmetaboliten 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den menschlichen Urin zeigt, dass letztere etwa doppelt so groß ist wie die von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (506 ±255 vs. 223 ±135 pg/mg Kreatinin). Die Korrelation zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist recht hoch (r=0,86, n=14). Eine ähnlich hohe Korrelation (r=0,77) wird auch von C. Chiabrando *et al.* berichtet, jedoch sind dort die Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seinem Metaboliten etwa gleich groß (8,14 ±2,05 ng/h und 6,37 ±1,30 ng/h [157]). Dies könnte mehrere Gründe haben. Zum einen setzen Chiabrando *et al.* eine indirekte Methode ohne echten internen Standard zur GC-MS-Quantifizierung von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein. Im Gegensatz dazu wurde für die in der vorliegenden Arbeit entwickelten GC-Tandem-MS-Methoden jeweils ein eigener interner Standard synthetisiert. Ein weiterer Unterschied liegt in der Probenvorbereitung vor der GC-MS-Analyse. Chiabrando *et al.* reinigten die Proben mit Immunoaffinitätschromatographie auf. Der verwendete Antikörper, der gegen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> gerichtet ist, zeigt eine sehr hohe Enantioselektivität. Daher wird z.B. *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> nicht zurückgehalten [157]. Mithin könnte *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen Teil des in der vorliegenden Arbeit mit GC-Tandem-MS quantifizierten 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ausmachen. Dieses würde bei der Messung mit GC-MS nach Immunoaffinitätschromatographie nicht erfasst. Gleiches gilt natürlich auch für 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Aufgrund der radikalischen Entstehung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist die Bildung von 64 Isomeren des PGF<sub>2α</sub> möglich [115]. Einige Isomere werden jedoch bei der Autooxidation von Arachidonsäure bevorzugt [86,87]. In der hier vorliegenden Arbeit konnten die (15*R*)- und (15*S*)-Isomere von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> weder chromatographisch noch massenspektrometrisch voneinander unterschieden werden. Gleiches gilt auch für 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> und die (15*R*)- und (15*S*)-Isomere von *ent*-2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Nun könnte sich jedoch der Metabolismus der (15*R*)- und (15*S*)-Isomere der beiden Enantiomere von 8-iso-

---

PGF<sub>2α</sub> im Menschen voneinander unterscheiden. Dies würde zur Messung unterschiedlicher Verhältnisse von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zu 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> mit GC-Tandem-MS und mit GC-MS nach Immunoaffinitätschromatographie führen.

### 5.2.3 Metabolismus von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen

Bisher wurden zwei tierexperimentelle Studien zum Metabolismus von 3-Nitrotyrosin in der Ratte durchgeführt [225,306]. In der ersten Untersuchung sind 100 µg 3-Nitrotyrosin oral verabreicht worden [225]. In der zweiten Studie wurde die Kinetik von 3-Nitrotyrosin im Blutplasma nach Bolus-Injektion von 10 mg/kg bzw. 30 mg/kg 3-Nitrotyrosin untersucht [306]. In keiner der beiden tierexperimentellen Studien konnte unmetabolisiertes 3-Nitrotyrosin im Urin der Ratte nachgewiesen werden. In beiden Untersuchungen fand sich jedoch 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure als Metabolit von 3-Nitrotyrosin im Urin [225,306]. Die nicht-invasive Erfassung von 3-Nitrotyrosin sollte daher über die 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure-Ausscheidung in den Urin möglich sein.

Nach Bolus-Injektion von 10 mg 3-Nitrotyrosin (3,6 mg/kg) in die Ohrvene eines Kaninchens wurde die Kinetik der Elimination von 3-Nitrotyrosin im Blutplasma bestimmt. Es wurde eine Halbwertszeit von 175 min ermittelt. Die Halbwertszeit für 3-Nitrotyrosin im Blutplasma des Kaninchens ist damit etwa dreimal so lang wie die im Blutplasma der Ratte (65 min [306]). Als Metabolit von 3-Nitrotyrosin wurde 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure in den Urin des Kaninchens ausgeschieden. Die nach 3 Stunden in den Urin ausgeschiedene Menge an 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure wurde mit einer hierfür entwickelten GC-Tandem-MS-Methode zu 883,8 ± 12,2 µg bestimmt. Mit einem Anteil von 8,8 % an der dosierten Menge von 3-Nitrotyrosin entspricht dies sehr gut den für Ratten gefundenen Anteilen (6,1 % für 10 mg/kg und 4,7 % für 30 mg/kg 3-Nitrotyrosin [306]). Nach oraler Gabe von 100 µg 3-Nitrotyrosin wurden jedoch 44 % als 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure in den Urin der Ratte ausgeschieden [225]. Offensichtlich bestehen also große Unterschiede zwischen dem Metabolismus von 3-Nitrotyrosin nach oraler Aufnahme in den Gastrointestinaltrakt und nach Injektion (i.v.). Eine Erklärung könnte die Umwandlung von 3-Nitrotyrosin durch Darmbakterien in 3-Nitro-4-hydroxyphenylelessigsäure sein. Für Tyrosin ist dies seit langem bekannt [407]. Offenbar zeigen die beteiligten Enzyme keine große Selektivität bezüglich des Substrates. Dies hat wichtige Konsequenzen für die nicht-invasive Quantifizierung von 3-Nitro-4-

hydroxyphenylessigsäure im menschlichen Urin. Schon 1974 wurde von Knowles *et al.* die 3-Nitrotyrosin-Bildung unter den im Magen vorherrschenden sauren Bedingungen gezeigt [224]. Mit der Nahrung aufgenommenes 3-Nitrotyrosin oder im Magen gebildetes 3-Nitrotyrosin könnte so überproportional zur im Urin ausgeschiedenen Menge an 3-Nitro-4-hydroxyphenylessigsäure beitragen.

### 5.3 Biologische Bedeutung der Isoprostane und von 3-Nitrotyrosin

Während sich die biologische Bedeutung der Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> nicht nur auf einen Indexparameter pathologischer Veränderungen beschränkt, wird 3-Nitrotyrosin keine biologische Aktivität zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Untersuchungen zur biologischen Aktivität und zur enzymatischen Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> durchgeführt. Als ein pathologischer Mechanismus der 3-Nitrotyrosin-Bildung wurde die Tyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit untersucht.

#### 5.3.1 Biologische Aktivität und enzymatische Bildung von 8-iso-Prostaglandin F<sub>2a</sub> und 8-iso-Prostaglandin E<sub>2</sub>

Die biologische Aktivität der Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ist bekannt [76,78]. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist ein hochpotenter Vasokonstriktor arterieller Blutgefäße [179-181], der Niere [161], des Bronchialsystems [170-174] und ein Antagonist der Plättchenaggregation [164,186]. Während PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> entgegengesetzte Effekte auf das Blutgefäßsystem haben [165], wirken 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> beide als Vasokonstriktoren [162,163]. Die biologische Aktivität der Isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> wurde bisher jedoch fast ausschließlich an tierischem Gewebe untersucht. In dieser Arbeit wurde die Pharmakologie der vasokonstriktiven Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> an menschlichen arteriellen Blutgefäßen untersucht. Im Organbad-Versuch konnte die konzentrationsabhängige Vasokonstriktion der *arteria mammaria* gezeigt werden. Folgende Reihenfolge der vasokonstriktiven Potenz (EC<sub>50</sub>-Werte) ließ sich ermitteln: 8-iso-PGE<sub>2</sub> > 8-iso-PGF<sub>2α</sub> > PGF<sub>2α</sub> > PGE<sub>2</sub>. Während die Reihenfolge 8-iso-PGF<sub>2α</sub> > PGF<sub>2α</sub> > PGE<sub>2</sub> die Ergebnisse für arterielle Blutgefäße von Ratten, Rindern und Schweinen bestätigt [180,182], konnte bisher eine so hohe vasokonstriktorische Potenz für 8-iso-PGE<sub>2</sub> nicht festgestellt werden [162,163].

Die vasokonstriktorische Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> lässt sich durch eine Reihe von Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten aufheben: SQ 29548 [161,162,166,176-177,180,181], BM 13505 [180], ICI 192605 [172,182] und GR 32191 [185]. Demgegenüber zeigen Inhibitoren der Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthase und α-Rezeptor-Antagonisten keinen Effekt auf die Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> [170,174]. Daher wurde im durchgeführten Experiment nicht nur die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> ausgelöste konzentrationsabhängige Vasokonstriktion der *arteria mammaria* untersucht, sondern auch ihre Inhibierung durch den Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten ICI 192605. Durch ICI 192605 (10<sup>-4</sup> M) wurde die vasokonstriktorische Wirkung zu 96 % für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und zu 75 % für 8-iso-PGE<sub>2</sub> gehemmt. Offensichtlich wird die vasokonstriktorische Wirkung beider Isoprostane über den Thromboxan-Rezeptor vermittelt. Dies bestätigt die Ergebnisse von G. A. FitzGerald und Mitarbeitern: Knock-out-Mutanten der Maus, denen das Gen des Thromboxan-Rezeptors fehlt, reagieren nicht mehr auf 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> mit Vasokonstriktion [408]. Wird das Gen in der gleichen Spezies überexprimiert, so kommt es zu einer verstärkten Vasokonstriktion [408].

Wie gezeigt werden konnte, werden die vasokonstriktorisches Eigenschaften von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> über den Thromboxan-Rezeptor vermittelt. Thromboxan wird im menschlichen Organismus durch die Thromboxan-Synthase enzymatisch gebildet [80]. Auch für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist die enzymatische Bildung als Nebenprodukt der PGH<sub>2</sub>-Synthase berichtet worden [144-148,151]. Mit *in vitro*-Ansätzen aufgereinigter PGH<sub>2</sub>-Synthase-I und -II konnte neben der Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch die enzymatische Bildung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> gezeigt werden. Zur Trennung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> wurde eine TLC-Methode entwickelt. Die Quantifizierung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> wurde mit GC-Tandem-MS durchgeführt. Eine besondere Derivatisierungstechnik erlaubte zudem die eindeutige massenspektrometrische Unterscheidung von 8-iso-PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>. Die Menge an durch PGH<sub>2</sub>-Synthase gebildetem 8-iso-PGE<sub>2</sub> lag in der gleichen Größenordnung wie die von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Der Anteil der beiden gebildeten Isoprostane an den entsprechenden Prostaglandinen betrug 1,2 % bzw. 1 % für die PGH<sub>2</sub>-Synthase-I und -II. Damit liegt die Bildungsrate deutlich unterhalb der für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Literatur beschriebenen (6 % [151]). Um zu zeigen, dass die Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> enzymatisch erfolgt, wurde den Ansätzen der PGH<sub>2</sub>-Synthase-Inhibitor Diclofenac zugesetzt. Sowohl die Prostaglandin- als auch die Isoprostan-Bildung erwiesen sich als Enzym-katalysiert, da sie zu > 90 % gehemmt wurden. Neben der Hemmung der Isoprostan-Bildung durch Diclofenac konnte auch eine Hemmung durch die S-Nitroso-substanzen SNC und GSNO gezeigt werden. Die durch S-Transnitrosylierung über NO

gebildeten *S*-Nitrososubstanzen werden als Transportform des vasodilatierenden EDRF diskutiert [409]. Eine Hemmung der PGH<sub>2</sub>-Synthase durch *S*-Nitrososubstanzen könnte somit die Bildung der vasoaktiven Prostaglandine und Isoprostane verhindern.

Die physiologische Bedeutung des als Nebenprodukt der PGH<sub>2</sub>-Synthase gebildeten Isoprostanes 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde evaluiert, indem die 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub>-, 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>- und 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung eines gesunden Probanden bei fünftägiger Gabe von Diclofenac (100 mg/Tag) untersucht wurde. Für 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> kam es bereits am ersten Tag zur einer bis zu 76 %igen Hemmung der Prostanoid-Biosynthese. Die Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den Urin wurde jedoch erst nach drei Tagen um 36 % reduziert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer 21 %igen Reduktion der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung nach zweitägiger Indomethacin-Gabe (1,85 mg/kg/d [150,151]). Die Ausscheidung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wird jedoch nicht in gleichem Ausmaß reduziert wie die Ausscheidung von 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Auch setzt die Reduktion der Ausscheidung im Gegensatz zu 2,3-Dinor-TxB<sub>2</sub> und 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> erst nach mehrtägiger Gabe von Diclofenac ein. Für Naproxen und niedrige Dosen von Aspirin findet sich jedoch kein Effekt auf die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung [149,152].

Nachdem Beispiele für die enzymatische Bildung und biologische Aktivität beider Isoprostane gezeigt worden sind, sollte neben 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auch 8-iso-PGE<sub>2</sub> im menschlichen Urin quantifizierbar sein. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 8-iso-PGE<sub>2</sub> in wässrigen Puffern der raschen Umlagerung zu PGE<sub>2</sub> und PGB<sub>2</sub> unterliegt. Diese Umlagerung könnte auch *in vivo* stattfinden und eine Erklärung dafür sein, dass bisher kein 8-iso-PGE<sub>2</sub> in menschlichem Urin bei Normalprobanden nachgewiesen werden konnte [402].

### 5.3.2 Peroxynitrit und 3-Nitrotyrosin

Die Nitrierung von Tyrosin und Tyrosin-Resten in BSA wurde für Peroxynitrit-Konzentrationen < 1 mM untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es für 100 – 500 μM zu einer Ausbeute von 4 bis 5 % 3-Nitrotyrosin kommt. Dies entspricht den Literaturwerten für 1 mM Peroxynitrit [239,241]. Auch konnte gezeigt werden, dass es unter Zusatz von 20 mM NaHCO<sub>3</sub> zu einer Erhöhung der Ausbeute auf 8,6 % kommt. Dies bestätigt die Ergebnisse von Santos *et al.* [238]. Im Gegensatz dazu findet die Nitrierung von Tyrosin-Resten im

Albumin für kleine Peroxynitrit-Konzentrationen in wesentlich geringerem Umfang statt, als bisher angenommen. Der für 300  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit ermittelte Anteil an 3-Nitrotyrosin-Resten von 11 mmol/mol Albumin liegt weit unter dem für 1 – 2 mM Peroxynitrit in der Literatur gefundenen Werten von 391 mmol/mol und 1330 mmol/mol Albumin [239,261]. Die Ausbeute der Nitrierung von Tyrosin-Resten ist somit für kleinere Peroxynitrit-Konzentrationen und physiologische Albumin-Konzentrationen sehr gering.

## 5.4 Schlussfolgerungen

### 5.4.1 Isoprostane

Die selektive Messung eines  $\text{F}_2$ -Isoprostanes im Urin, z.B. 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ , erfordert eine Reihe von chromatographischen Aufreinigungsschritten oder Immunoaffinitätschromatographie zur Isolation des Analyten [149,150,208-210,217]. Daher werden oft mehrere  $\text{F}_2$ -Isoprostane zusammen quantifiziert [189,200-205]. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist jedoch nicht in jedem Fall gegeben und oft von den eingesetzten Methoden abhängig. Die selektive Messung eines definierten Messparameters erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Eine vereinfachte Probenvorbereitung für die quantitative Bestimmung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  in humanem Blutplasma ist von Nourooz-Zadeh *et al.* vorgeschlagen worden [201,202]. Im Gegensatz zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  im Blutplasma erlaubt die nicht-invasive Quantifizierung im Humanurin eine höhere Zuverlässigkeit aufgrund der geringen Mengen an oxidierbaren Lipiden. Diese können zu einer artifiziellen, d.h. *ex vivo*-Bildung von Isoprostanen beitragen [73]. Einen Vorteil für die Probenvorbereitung bieten die in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur selektiven Quantifizierung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  mit GC-Tandem-MS. Durch den Einsatz der CAD-Technik gelingt es, die Probenvorbereitung auf eine Kombination von SPE und TLC zu reduzieren. Zudem konnte die höhere Zuverlässigkeit der Messung mit der GC-Tandem-MS-Technologie gegenüber einfacher GC-MS gezeigt werden.

Der Ursprung unmetabolisierter Isoprostane im Urin ist bisher noch nicht bekannt. Die relativ großen Mengen an unmetabolisiertem 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  wurden zum Teil auf eine lokale Bildung in der Niere zurückgeführt [122]. Eine mögliche Lösung des Problems bietet die quantitative Bestimmung des Hauptmetaboliten von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  im Urin. In der vorliegenden Arbeit



wurde eine GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung des Hauptmetaboliten von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, im menschlichen Urin entwickelt. Die hiermit gefundene gute Korrelation zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seinem Metaboliten legt die Vermutung nahe, dass sowohl urinäres 8-iso-PGF<sub>2α</sub> als auch sein Hauptmetabolit im menschlichen Urin in engem Zusammenhang stehen, und dass beide die systemische Produktion von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> widerspiegeln. Diesem Ergebnis steht die kürzlich tatsächlich nachgewiesene lokale Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in der Niere gegenüber, die jedoch im Vergleich zur systemischen Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eher unbedeutend sein könnte [410]. Im Gegensatz zu 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wird PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Organismus extensiver metabolisiert und als Tetranor-PGF-MUM (5α,7α-Dihydroxy-11-keto-tetranorprostan-1,16-dicarbonsäure) renal eliminiert [154,155]. Es ist also durchaus möglich, dass die relativ hohen Konzentrationen von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im menschlichen Urin einen verminderten Metabolismus von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> reflektieren. So ist durchaus denkbar, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seine Abbauprodukte schlechtere Substrate für die beteiligten metabolischen Enzyme darstellen. Dies könnte auch eine Erklärung für die unterschiedliche Metabolisierung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und PGF<sub>2α</sub> in der Zellkultur von Hepatozyten sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch gezeigt, dass es zu einer enzymatischen Bildung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 8-iso-PGE<sub>2</sub> durch die PGH<sub>2</sub>-Synthase kommt. Der Anteil an den durch freie Radikale gebildeten Isoprostanen ist jedoch gering. Eine Möglichkeit, einen Anteil der enzymatisch gebildeten Isoprostane an den insgesamt gebildeten Isoprostanen auszuschließen, liegt in der Quantifizierung von Regioisomeren von F<sub>2</sub>-Isoprostanen, deren Bildung nicht von der PGH<sub>2</sub>-Synthase katalysiert wird [127,207].

#### 5.4.2 Bedeutung der Isoprostane als BOSS (*biomarker of oxidative stress status*)

Die Isoprostane, insbesondere das hier untersuchte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und sein Hauptmetabolit im menschlichen Urin, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, stellen in erster Linie einen geeigneten Indexparameter für die *in vivo*-Lipid-Peroxidation und möglicherweise in zweiter Linie einen Biomarker des oxidativen Stresses dar. Sowohl reaktive Stickstoffspezies (RNS) als auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) tragen zur Lipid-Peroxidation bei. Doch sind es die radikalischen Vertreter dieser Spezies, die die Lipid-Peroxidation initiieren und terminieren. Der Initiation durch freie Radikale folgt die Peroxidation; hier ist Sauerstoff beteiligt. So

handelt es sich auch im engeren Sinne um oxidative Veränderungen. Doch nicht nur RNS und ROS können zur Bildung von Isoprostanen führen; im Tiermodell wurde sie durch  $\text{CCl}_4$  initiiert [89,93,101,141]. Mit der in dieser Arbeit entwickelten GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> konnte der enge Zusammenhang zwischen *in vivo*-Lipid-Peroxidation und urinärer 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung gezeigt werden. In einer tierexperimentellen Studie verringerte das lipidlösliche Vitamin E eindeutig die 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung [397]. Unter der Therapie mit Bezafibrat wurde eine Verringerung des Vitamin E-Plasmaspiegels bei gleichzeitig erhöhter 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung bei Hypertriglycerinämie-Patienten gemessen [401].

### 5.4.3 3-Nitrotyrosin

Die Nitrierung von Tyrosin und Tyrosin-Resten in Proteinen ist für eine ganze Reihe von pathophysiologischen Abläufen berichtet worden [226,227]. Einen großen Beitrag hat hier der semiquantitative immunohistochemische Nachweis von 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen unterschiedlicher Gewebe geleistet [269,270,275]. Die eingesetzten Methoden sind jedoch ungenau und wenig selektiv. Die Spezifität des gegen nitrierte Tyrosin-Reste in BSA gerichteten Antikörpers für 3-Nitrotyrosin-Reste in anderen Proteinen ist fraglich. Auch die UV-Detektion von 3-Nitrotyrosin hat viel zur anfänglichen Begeisterung über extrem hohe Werte an 3-Nitrotyrosin bei verschiedenen Krankheitsbildern beigetragen [307-310]. Doch auch diese Methode ist für *in vivo*-Untersuchungen nicht selektiv genug.

Methoden, die eine Derivatisierung der Proben vor der eigentlichen Quantifizierung von 3-Nitrotyrosin erforderlich machen, haben die Konzentration von 3-Nitrotyrosin vermutlich oft "überschätzt" [263,326,327,330]. Probleme bereitet die artifizielle Bildung von 3-Nitrotyrosin bei der Probenaufarbeitung aus Tyrosin und Nitrat bzw. Nitrit. Die in dieser Arbeit vorgestellte GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in humanem Blutplasma setzt daher eine im Vergleich zu anderen Methoden etwas aufwendigere Probenvorbereitung voraus. Die Methode stellt eine Kombination aus Ultrafiltration, HPLC und GC-Tandem-MS dar. Ultrafiltration und HPLC-Trennung sorgen für eine vollständige und schonende Trennung des Analyten von Proteinen, Tyrosin, Nitrat und Nitrit. Es konnte gezeigt werden, dass es nicht mehr zu einer artifiziellen Bildung von 3-Nitrotyrosin bei der Probenaufarbeitung kommt. Auch für die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Resten in

Plasmaproteinen wurde die Methode nach enzymatischer Hydrolyse der Proteine eingesetzt. Mit dieser Methode wurden die bisher kleinsten Plasmakonzentrationen von 3-Nitrotyrosin und 3-Nitrotyrosin-Resten in Proteinen gemessen. Offensichtlich ist das Ausmaß der Nitrierung von Tyrosin und Tyrosin-Resten in Proteinen, zumindest in humanem Plasma, weitaus geringer als bisher angenommen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure im Urin der Hauptmetabolit von 3-Nitrotyrosin im Kaninchen. Da 3-Nitrotyrosin selbst nur in sehr geringen Mengen im Urin zu finden ist [225], stellt die Quantifizierung von 3-Nitro-4-hydroxyphenylgssigsäure eine Alternative dar. Bisher konnte noch keine Methode zur zuverlässigen Quantifizierung von 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure im Humanurin entwickelt werden. Ein mögliches Problem bei der Quantifizierung von 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure im Urin könnte jedoch der Beitrag von Darmbakterien an der Entstehung von 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure im Gastrointestinaltrakt sein.

#### 5.4.4 Bedeutung von 3-Nitrotyrosin als BOSS

Neben den reaktiven Stickstoffspezies (RNS) können auch eine Reihe von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) oder die Hypochlorige Säure (HOCl) an der Entstehung von 3-Nitrotyrosin beteiligt sein [247-249,251-254]. Doch darf nicht übersehen werden, dass die Nitrierung von Tyrosin die Beteiligung von Stickstoff einschließt. Wird vorausgesetzt, dass die endogene Bildung von Stickstoffdioxid im Vergleich zu Stickstoffmonoxid eher gering sein dürfte, ist 3-Nitrotyrosin als Biomarker des NO-abhängigen oxidativen Stresses anzusehen. So konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Peroxynitrit zur Nitrierung von Tyrosin und Tyrosin-Resten unter Bildung von 3-Nitrotyrosin führt. Kleine Peroxynitrit-Konzentrationen nitrieren Tyrosin-Reste jedoch nur in geringem Ausmaß. Die Bedeutung von Peroxynitrit für die Nitrierung von Tyrosin-Resten sollte daher nicht überschätzt werden. Für pathologische Veränderungen bei denen sowohl NO als auch  $O_2^-$  in besonderem Maße gebildet werden, z.B. bei erhöhter Aktivität von Makrophagen, könnte es dennoch zu einer nicht unbedeutenden Nitrierung von Tyrosin und Tyrosin-Resten in Proteinen durch Peroxynitrit kommen.

## 5.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten GC-Tandem-MS-Methoden zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> stellen zur Zeit die genauesten und zuverlässigsten Methoden zur Erfassung der *in vivo*-Lipid-Peroxidation dar. Eine Validierung und Überprüfung der eleganten und einfachen immunoaffinitätschromatographischen Aufreinigungstechnik von Bachi und Chiabrando *et al.* [157,217] mit den hier entwickelten GC-Tandem-MS-Methoden könnte eine ähnliche Genauigkeit und Zuverlässigkeit auch für die Kombination von Immunoaffinitätschromatographie und GC-MS ergeben. Bisher stand der breiten Anwendung der Immunoaffinitätschromatographie für die Isoprostan-Analyse die kommerzielle Nichtverfügbarkeit entsprechenden chromatographischen Materiales entgegen. Seit kurzem ist jedoch zumindest für die Aufreinigung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein auf Sepharose immobilisierter Antikörper kommerziell erhältlich (Cayman).

Bisher konnte nicht geklärt werden, aus welchen Gründen sich 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Vergleich zu seinem Hauptmetaboliten 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> in so großer Konzentration im menschlichen Urin findet. Die Prostanoiden finden sich dagegen im Vergleich zu ihren urinären Hauptmetaboliten nur in wesentlich kleineren Konzentrationen im menschlichen Urin [198,411]. Ein Beitrag der Niere zu unmetabolisierten Prostanoiden im menschlichen Urin ist lange bekannt [412]. Solch eine Erklärung dürfte für die gefundenen Konzentrationen von unmetabolisiertem 8-iso-PGF<sub>2α</sub> jedoch nicht ausreichen. Die in dieser Arbeit durchgeführte massenspektrometrische Analyse von verschiedenen Isomeren von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigte, dass (15*R*)- und (15*S*)-Isomere beider Verbindungen und die Enantiomere von 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> weder massenspektrometrisch noch chromatographisch voneinander getrennt werden konnten. Ein unterschiedlicher Metabolismus der einzelnen Isomere im menschlichen Organismus ist jedoch nicht auszuschließen. Die von Bachi und Chiabrando *et al.* entwickelte Immunoaffinitätschromatographie zur Probenaufarbeitung für 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> ist hoch enantioselektiv [157,217]. Ein direkter Vergleich mit den in dieser Arbeit entwickelten GC-Tandem-MS-Methoden der Analyse von Urinproben mit und ohne Immunoaffinitätschromatographie zur Probenaufarbeitung sollte derartige Unterschiede im Metabolismus bestätigen.

Nicht nur als Metabolit von 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, sondern auch als Oxidationsprodukt der  $\gamma$ -Linolensäure wurde 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> diskutiert [395]. Mit den in dieser Arbeit entwickelten GC-Tandem-MS-Methoden wurde eine hohe Korrelation zwischen 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und seinem Hauptmetaboliten in menschlichem Urin, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, ermittelt. Diese Korrelation lässt den Beitrag der  $\gamma$ -Linolensäure als weitere Quelle für endogenes 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> jedoch als eher unbedeutend erscheinen. Für Kinder mit dem Zellweger-Syndrom fand sich in der GC-Tandem-MS-Analyse der Urinproben eine 124-fache Erhöhung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung gegenüber gesunden Kindern. Diese Erhöhung ist weniger als ein Indikator für erhöhten oxidativen Stress, als vielmehr eine Verringerung der peroxisomalen **b**-Oxidation zu deuten. Die Unfähigkeit zur peroxisomalen **b**-Oxidation sollte jedoch mit einer starken Verringerung bzw. kompletten Wegfallen der 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Ausscheidung in den Urin der erkrankten Kinder einhergehen. Das Ausmaß dieser Verringerung gegenüber gesunden Kindern könnte direkt Rückschlüsse auf den Beitrag der  $\gamma$ -Linolensäure als weitere Quelle für endogenes 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zulassen. Die Unfähigkeit zur peroxisomalen **b**-Oxidation im Krankheitsbild des Zellweger-Syndroms bietet so die einzige Möglichkeit diese Fragestellung *in vivo* zu klären.

Zuverlässige Daten über die 3-Nitrotyrosin-Konzentration im humanen Blutplasma lassen sich bisher nicht in der Literatur finden. Dies liegt an der mangelnden Sensitivität und Spezifität der bisher eingesetzten Methoden. Mit der in dieser Arbeit entwickelten GC-Tandem-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin konnten zum ersten Mal solche Daten über die im menschlichen Blut zirkulierenden Mengen an 3-Nitrotyrosin erhalten werden. Zur Zeit ist der Ursprung dieser äußerst geringen Mengen zirkulierenden 3-Nitrotyrosins nicht bekannt. Mit der aus dieser Arbeit hervorgegangenen GC-Tandem-MS-Methode konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Tyrosin-Reste im Albumin nitriert werden. In diesem Zusammenhang interessant, ist die Fragestellung, inwieweit Albumin *in vivo* nitriert wird. Die Weiterentwicklung der hier vorgestellten GC-Tandem-MS-Methode zur selektiven quantitativen Bestimmung der 3-Nitrotyrosin-Reste im Albumin könnte diese Frage klären. Eine Möglichkeit zur selektiven Abtrennung von Albumin von anderen Plasmaproteinen bietet die Immunoaffinitätschromatographie mit Sepharose Blau [409].

Nicht nur für Albumin ist die Frage interessant, welche Tyrosin-Reste in bestimmten Proteinen nitriert werden. So konnte für eine Reihe von Enzymen gezeigt werden, dass die selektive Nitrierung eines Tyrosin-Restes zu deren Inaktivierung führt [241,265,266,303]. Die

Entwicklung einer sensitiven LC-Tandem-MS-Methode zur selektiven Bestimmung von nitrierten Tyrosin-Resten in Polypeptiden stellt sicher eine Herausforderung für die Zukunft dar. Erst wenn der Ursprung, das Ausmaß und die Selektivität der Nitrierung von Tyrosin und Tyrosin-Resten in Proteinen im humanen Blutplasma geklärt worden sind, wird sich herausstellen, ob zirkulierendes 3-Nitrotyrosin ein geeigneter Indexparameter für den nitrativen, d.h. NO-abhängigen oxidativen Stress ist.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure der Hauptmetabolit von 3-Nitrotyrosin im Urin des Kaninchens. Bisher konnte 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure jedoch nicht im Urin von Menschen quantitativ bestimmt werden. Die Validierung der hier vorgestellten massenspektrometrischen Methode zur Detektion von 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure für menschlichen Urin sollte Aufschluss darüber geben, ob sich möglicherweise 3-Nitro-4-hydroxyphenyllessigsäure als Indexparameter für den NO-abhängigen oxidativen Stress eignet. Dies ist auch für klinische Studien von Bedeutung, da der nicht-invasiven Erfassung des NO-abhängigen oxidativen Stresses der Vorzug zu geben ist. Von besonderem Interesse ist die Erfassung des NO-abhängigen oxidativen Stresses bei der Untersuchung der Ursachen der Nitrat-Toleranz bei der Gabe von organischen Nitraten [413]. Entsprechende klinische Studien mit geeigneten Indexparametern könnten hier hilfreich bei der Klärung der Ursachen der Nitrat-Toleranz sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Betteridge, D.J. What is oxidative stress? *Metabolism* (2000) 49 (Suppl. 1), 3-8.
- [2] Davies, K.J.A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* (1995) 61, 1-31.
- [3] Sies, H. Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* (1986) 98, 1061-1075.
- [4] Halliwell, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* (1996) 24, 1023-1027.

- 
- [5] Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies of optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Res.* (1996) 25, 57-74.
- [6] Sies, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* (1991) 91, 31S-38S.
- [7] Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., Packer, L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Anim. Nutr.* (1999) 52, 203-222.
- [8] Halliwell, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nut. Rev.* (1999) 57, 104-113.
- [9] Pryor, W. A. Oxidative stress status: OSS, BOSS, and "Wild Bill" Donovan. *Free Radical Biol. Med.* (1999) 27, 1135-1136.
- [10] Winterbourn, C.C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* (1995) 82/83, 969-74.
- [11] Koppenol, K.W. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyntirite. *Free Radical Biol. Med.* (1998) 25, 385-391.
- [12] Togashi, H., Shinzawa, H., Matsuo, T., Takeda, Y., Takahashi, T., Aoyama, M., Oikawa, K., Kamada, H. Analysis of hepatic oxidative stress status by electron spin resonance spectroscopy and imaging. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 846-853.
- [13] Miura, Y., Ozawa, T. Noninvasive study of radiation-induced oxidative damage using in vivo electron spin resonance. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 854-859.
- [14] Hughes, M.N. Relationship between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyntirite. *Biochim. Biophys. Acta* (1999) 1411, 263-272.
- [15] Arnelle, D.R., Stamler, J.S.  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}$ , and  $\text{NO}^-$  donation by *S*-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by *S*-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995) 318, 279-285.
- [16] Sharpe, M.A., Cooper, C.E. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion with peroxyntirite. *Biochem. J.* (1998) 332, 9-19.
- [17] Huie, R.E., Padmaja, S. The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* (1993) 18, 195-199.
- [18] Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. Peroxyntirite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* (1992) 5, 834-842.
- [19] Uppu, R.M., Squadrito, G.L., Pryor, W.A. Acceleration of peroxyntirite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996) 327, 335-343.

- 
- [20] Moslen, M.T. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1994) 366, 43-58.
- [21] Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley-Usmar, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta* (1999) 1411, 385-400.
- [22] Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84, 9265-9269.
- [23] Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987) 327, 524-526.
- [24] Murad, F. Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* (1999) 111, 1976-1989.
- [25] Furchgott, R.F. Der relaxierende Faktor aus Endothelzellen: Entdeckung, frühe Untersuchungen und Identifizierung als Stickstoffmonoxid (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* (1999) 111, 1990-2000.
- [26] Ignarro, L.J. Stickstoffmonoxid: ein einzigartiges Signalmolekül in der Gefäßbiologie (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* (1999) 111, 2002-2013.
- [27] Hogg, N., Kalyanaraman, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (1999) 378-384.
- [28] Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* (1995) 369, 131-135.
- [29] Xu, K.Y. Does nitric oxide synthase catalyze the synthesis of superoxide? *FEBS Lett.* (2000) 23619, 1-2.
- [30] Schmidt, H.H.H.W., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z.S., Cunningham, D.D., Feelisch, M. No NO<sup>•</sup> from NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 93, 14492-14497.
- [31] Hassan, H.M. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radical Biol. Med.* (1988) 5, 377-385.
- [32] Beckman, J.S., Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* (1996) 271, C1424-C1437.
- [33] Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B., Ohshima, H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. Mol. Life Sci.* (1999) 55, 1068-1077.



- 
- [34] Fukuto, J.M., Ignarro, L.J. In vivo aspects of nitric oxide (NO) chemistry: does peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) play a major role in cytotoxicity? *Acc. Chem. Res.* (1997) 30, 149-152.
- [35] Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., Crow, J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* (1994) 233, 229-240.
- [36] Pryor, W.A., Squadrito, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* (1995) 268, L699-L722.
- [37] Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M., Radi, R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996) 333, 49-58.
- [38] Squadrito, G.L., Pryor, W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biol. Med.* (1998) 25, 392-403.
- [39] Goldstein, S., Czapski, G. Viscosity effects on the reaction of peroxynitrite with CO<sub>2</sub>: evidence for radical formation in a solvent cage. *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121, 2444-2447.
- [40] Bonini, M.G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Da C. Ferreira, A.M., Augusto, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 10802-10806.
- [41] Lehnig, M. Radical mechanisms of the decomposition of peroxynitrite and the peroxynitrite-CO<sub>2</sub> adduct and of reactions with L-tyrosine and related compounds as studied by <sup>15</sup>N chemically induced dynamic nuclear polarization. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999) 368, 303-318.
- [42] Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J., Merényi, G. Tyrosine nitration by simultaneous generation of NO<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>-•</sup> under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 3031-3036.
- [43] Harman, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78, 7124-7128.
- [44] Jacob, R.A., Burri, B.J. Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* (1996) 63, 985S-990S.
- [45] Frei, B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *FASEB J.* (1999) 13, 963-964.
- [46] Sies, H., Stahl, W. Vitamins E and C, β-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* (1995) 62, 1315S-1321S.
- [47] Carr, A., Frei, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* (1999) 13, 1007-1024.

- 
- [48] Offer, T., Russo, A., Samuni, A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J.* (2000) 14, 1215-1223.
- [49] Goss, S.P.A., Hogg, N., Kalyanaraman, B. The effect of  $\alpha$ -tocopherol on nitration of  $\gamma$ -tocopherol by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999) 363, 333-340.
- [50] Van der Vliet, A., Smith, D., O'Neill, C.A., Kaur, H., Darley-Usmar, V., Cross, C.E., Halliwell, B. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.* 303 (1994), 295-301.
- [51] Chevion, S., Roberts, M.A., Chevion, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 860-870.
- [52] Kasai, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* (1997) 387, 147-63.
- [53] Moore, K., Roberts II, L.J., Darley-Usmar, V. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Res.* (1998) 28, 659-671.
- [54] Kinter, M. Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *J. Chromatogr. B* (1995) 671, 223-236.
- [55] Gutteridge, J.M.C., Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* (1990) 15, 129-135.
- [56] Aghdassi, E., Allard, J.P. Breath alkanes as a measure of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 880-886.
- [57] Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol. Med.* (1990) 9, 515-540.
- [58] Guichardant, M., Valette-Talbi, L., Cavadini, C., Crozier, G., Berger, M. Malondialdehyde measurement in urine. *J. Chromatogr. B* (1994) 655, 112-116.
- [59] Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* (1998) 39, 1529-1542.
- [60] Berlett, B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 20313-20316.
- [61] Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biol. Med.* (1999) 27, 1151-1163.
- [62] Hausladen, A., Stamler, J.S. Nitrosative stress. *Methods Enzymol.* (1999) 300, 389-395.

- 
- [63] Tsikas, D., Raida, M., Sandmann, J., Rossa, S., Forssmann, W.G., Frölich, J.C. Electrospray ionization mass spectrometry of low-molecular-mass S-nitroso compounds and their thiols. *J. Chromatogr. B* (2000) 742, 99-108.
- [64] Frölich, J.C. Nobelpreis für Medizin 1982: Prostaglandine. *Deut. Med. Wochenschr.* (1982) 50, 1932-1934.
- [65] Samuelsson, B. Von Untersuchungen biochemischer Mechanismen zu neuen biologischen Mediatoren: Prostaglandinendoperoxide, Thromboxane und Leukotriene (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* (1983) 95, 854-864.
- [66] Van Dorp, D.A., Beethuis, R.K., Nugteren, D.H., Vonkeman, H. The biosynthesis of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta* (1964) 90, 204-207.
- [67] Bergström, S., Danielsson, H., Samuelsson, B. The enzymatic formation of prostaglandin E<sub>2</sub> from arachidonic acid: prostaglandins and related factors. *Biochim. Biophys. Acta* (1964) 90, 207-210.
- [68] Daniels, E.G., Krüger, W.C., Kupiecki, F.P., Pike, J.E., Schneider, W.P. Isolation and characterization of a new prostaglandin isomer. *J. Am. Chem. Soc.* (1968) 90, 5894.
- [69] Nugteren, D.H., Vonkelman, H., van Dorp, D.A. Non-enzymatic conversion of all-cis-8,11,14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E<sub>1</sub>. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* (1967) 86, 1237-1245.
- [70] Pryor, W.A., Stanley, J.P., Blair, E. Autooxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* (1976) 11, 370-379.
- [71] Taylor, P.L. The 8-isoprostaglandins: evidence for eight compounds in human semen. *Prostaglandins* (1979) 17, 259-267.
- [72] Wendelborn, D.F., Seibert, K., Roberts II, L.J. Isomeric prostaglandin F<sub>2</sub> compounds arising from prostaglandin D<sub>2</sub>: A family of eicosanoids produced in vivo in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1988) 85, 304-308.
- [73] Morrow, J.D., Harris, T., Roberts II, L.J. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* (1990) 184, 1-10.
- [74] Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., Roberts II, L.J. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1990) 87, 9383-9387.
- [75] Roberts II, L.J., Morrow, J.D. The isoprostanes: Novel markers of lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* (1995) 23, 219-224.

- 
- [76] Roberts II, L.J., Morrow, J.D. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim. Biophys. Acta* (1997) 1345, 121-135.
- [77] Morrow, J.D., Roberts II, L.J. The isoprostanes, current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* (1996) 51, 1-9.
- [78] Morrow, J.D., Roberts II, L.J. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid Res.* (1997) 36, 1-21.
- [79] Samuelsson, B. On the incorporation of oxygen in the conversion of 8,11,14-Eicosatrienoic acid to prostaglandin E<sub>1</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* (1965) 87, 3011-3013.
- [80] Smith, W.L., Marnett, L.J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* (1991) 1083, 1-17.
- [81] Smith, W.L. and Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.* (1996) 62, 167-215.
- [82] Porter, N.A., Funk, M.O. Peroxy radical cyclization as a model for prostaglandin biosynthesis. *J. Org. Chem.* (1975) 40, 3614-3615.
- [83] Nugteren, D.H., van Dorp, D.A., Bergström, S., Hamberg, M. Samuelsson, B. Absolute configuration of the prostaglandins. *Nature* (1966) 212, 38-39.
- [84] Lehmann, W.D. (S)-type lipooxygenase and cyclooxygenase reaction box models characterizing the stereochemistry of the dioxygenation reaction. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1997) 400A, 41-45.
- [85] Kiefer, J.R., Pawlitz, J.L., Moreland, K.T., Stegeman, R.A., Hood, W.F., Gierse, J.K., Stevens, A.M., Goodwin, D.C., Rowlinson, S.W., Marnett, L.J., Stallings, W.C., Kurumbail, R.G. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature* (2000) 405, 97-101.
- [86] Corey, E.J., Shih, C., Shih, N.-Y., Shimoji, K. Preferential formation of 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> via the corresponding endoperoxide by biomimetic cyclization. *Tetrahedron Lett.* (1984) 25, 5013-5016.
- [87] O'Connor, D.E., Mihelich, E.D., Coleman, M.C. Stereochemical course of the autoxidative cyclization of lipid hydroperoxides to prostaglandin-like bicyclic endoperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* (1984) 106, 3577-3584.
- [88] Woodward, R.B., Hoffmann, R. Die Erhaltung der Orbitalsymmetrie. *Angew. Chem.* (1969) 21, 797-870.
- [89] Morrow, J. D., Awad, J. A., Kato, T., Takahashi, K., Badr, K. F., Roberts II, L. J., and Burk R. F. (1992). Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F<sub>2</sub>-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Clin. Invest.*, 90, 2502-2507.

- 
- [90] Morrow, J. D., Awad, J. A., Boss, H. J., Blair, I. A., Roberts II, L. J. (1992). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F<sub>2</sub>-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10721-10725.
- [91] Kayganich-Harrison, K. A., Rose, D. M., Murphy, R. C., Morrow, J. D., Roberts II, L. J. (1993). Collision-induced dissociation of F<sub>2</sub>-isoprostane-containing phospholipids. *J. Lipid Res.*, 34, 1229-1235.
- [92] Sevanian, A., Kim, E. Phospholipase A<sub>2</sub> dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *Free Radical Biol. Med.* (1985) 1, 263-271.
- [93] Morrow, J.D., Minton, T.A., Mukundan, C.R., Campbell, M.D., Zackert, W.E., Daniel, V.C., Badr, K.F., Blair, I.A., and Roberts II, L.J. Free radical-induced generation of Isoprostanes in vivo. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 4317-4326.
- [94] Morrow, J.D., Scruggs, J., Chen, Y., Zackert, W.E., and Roberts II, L. J. Evidence that the E<sub>2</sub>-isoprostane, 15-E<sub>2t</sub>-isoprostane (8-iso-prostaglandin E<sub>2</sub>) is formed in vivo. *J. Lipid Res.* (1998) 39, 1589-1593.
- [95] Pace-Asciak, C., Granström, E. Prostaglandins and related subjects. *New Comprehensive Biochemistry* (1983) Band 5, Elsevier.
- [96] Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morris, A.R., Lefkowitz, J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* (1986) 55, 69-102.
- [97] Morrow, J.D., Roberts, L.J., Daniel, V.C., Awad, J.A., Mirochnitchenko, O., Swift, L.L., and Burk, R.F. Comparison of formation of D<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>-isoprostanes and F<sub>2</sub>-isoprostanes in vitro and in vivo – effects of oxygen tension and glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* (1998) 353, 160-171.
- [98] Morrow, J.D., Awad, J.A., Wu, A., Zackert, W.E., Daniel, V.C., and Roberts II, L.J. Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) in vivo. *J. Biol. Chem.* (1996) 271, 23185-23190.
- [99] Harrison, K.A., Murphy, R.C. Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 17273-17278.
- [100] Roberts II, L.J., Salomon, R.G., Morrow, J.D. Brame C J. New developments in the isoprostane pathway: identification of novel highly reactive gamma-ketoaldehydes (isolevuglandins) and characterization of their protein adducts. *FASEB J.* (1999) 13, 1157-68.
- [101] Chen, Y., Morrow, J.D., and Roberts II, L.J. Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 10863-10868.
- [102] Chen, Y., Zackert, W.E., Roberts II, L.J., Morrow, J.D. Evidence for the formation of a novel cyclopentenone isoprostane, 15-A<sub>2t</sub>-isoprostane (8-iso-prostaglandin A<sub>2</sub>) in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* (1999) 1436, 550-556.

- 
- [103] Roberts, L.J., Montine, T.J., Markesbery, W.R., Tapper, A.R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W.D., Morrow, J.D. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 13605-13612.
- [104] Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H.C., Änggard, E.E., and Halliwell, B. F<sub>4</sub>-isoprostanes: a novel class of prostanoids formed during peroxidation of docosahexaenoic acid (DHA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998) 242, 338-344.
- [105] Reich, E.E., Zackert, W.E., Brame, C.J., Chen, Y., Roberts, L.J., Hachey, D.L., Montine, T.J., Morrow, J.D. Formation of novel D-ring and E-ring isoprostane-like compounds (D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *Biochemistry* (2000) 39, 2376-2383.
- [106] Conner, W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* (2000) 71, 171S-175S.
- [107] von Schackay, C. n-3 Fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* (2000) 71, 224S-227S.
- [108] Miller, C.C., Ziboh, V.A., Wong, T., Fletcher, M.P. Dietary supplementation with oils rich in (n-3) and (n-6) fatty acids influences in vivo levels of epidermal lipoxygenase products in guinea pigs. *J. Nutr.* (1990) 120, 36-44.
- [109] Räderstorff, D., Moser, U. Influence of an increased intake of linolenic acid on the incorporation of dietary (n-3) fatty acids in phospholipids and on prostanoid synthesis in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* (1992) 1165, 194-200.
- [110] Nourooz-Zadeh, J., Halliwell, B., and Änggard, E.E. Evidence for the formation of F<sub>3</sub>-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 236, 467-472.
- [111] Nourooz-Zadeh, J., Halliwell, B., and Änggard, E.E. Formation of a novel class of F<sub>3</sub>-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid (EPA). *Adv. Exp. Med. Biol.* (1997) 433, 185-188.
- [112] Bundy, G.L. Nonmammalian sources of eicosanoids. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* (1985) 14, 229-262.
- [113] Parchmann, S., Mueller, M. Evidence for the formation of dinor isoprostanes E<sub>1</sub> from  $\alpha$ -linolenic acid in plants. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 32650-32655.
- [114] Imbusch, R., Müller, M.J. Formation of isoprostane F<sub>2</sub>-like compounds (phytoprostanes F<sub>1</sub>) from  $\alpha$ -linolenic acid in plants. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 720-726.
- [115] Taber, D.F., Morrow, J.D., Roberts II, L.J. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* (1997) 53, 63-67.

- 
- [116] Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.-W., Adiyaman, M., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* (1997) 54, 853-873.
- [117] Longmire A.W., Swift, L.L., Roberts II, L.J., Awad, J.A., Burk, R.F., Morrow, J.D. Effect of oxygen tension on the generation of F<sub>2</sub>-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* (1994) 47, 1173-1177.
- [118] Mathews, W.R., McKenna, R. Guido, D.M., Petry, T.W., Jolly, R.A., Morrow, J.D. and Roberts II, L.J. A comparison of gas chromatography-mass spectrometry assays for in vivo lipid peroxidation. *Proc. 41th ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics* (1993) 865a-865b.
- [119] Richelle, M., Turini, M.E., Guidoux, R., Tavazzi, I., Metairon, S., Fay, L.B. Urinary isoprostane excretion is not confounded by lipid content of the diet. *FEBS Lett.* (1999) 459, 259-262.
- [120] Gopaul, N.K., Zacharowski, K., Halliwell, B., Änggard, E.E. Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F<sub>2</sub>-isoprostane levels. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 806-814.
- [121] Morrow, J.D., Roberts II, L.J. Quantification of noncyclooxygenase derived prostanoids as a marker of oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* (1991) 10, 195-200.
- [122] Roberts II, L.J., Morrow, J.D. Measurement of F<sub>2</sub>-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 505-513.
- [123] Praticò, D. F<sub>2</sub>-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* (1999) 147, 1-10.
- [124] Morrow, J.D., Minton, T.A., Badr, K.L., Roberts II, L.J. Evidence that the F<sub>2</sub>-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub>, is formed in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* (1994) 1210, 244-248.
- [125] Wendelborn, D.F., Morrow, J.D., Roberts II, L.J. Quantification of 9α,11β-Prostaglandin F<sub>2</sub> by stable isotope dilution mass spectrometry. *Methods Enzymol.* (1990) 187, 51-62.
- [126] Praticò, D., Barry, O.P., Lawson, J.A. Urinary excretion of IPF<sub>2α-1</sub> and 8-epi PGF<sub>2α</sub>: specific analysis of distinct F<sub>2</sub> isoprostanes as noninvasive indices of oxidant stress in vivo. *Circulation* (1997) 96, I-417.
- [127] Praticò, D., Barry, O.P., Lawson, J.A., Adiyaman M., Hwang, S.-W., Khanapure, S.P., Iuliano, L., Rokach, J., and FitzGerald, G.A. IPF<sub>2α-I</sub>: An index of lipid peroxidation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95, 3449-3454.
- [128] Lawson, J.A., Li, H., Rokach, J., Adiyaman, M., Hwang, S.-W., Khanapure S.P., FitzGerald, G.A.. Identification of two major F<sub>2</sub> isoprostanes, 8,12-iso- and 5-epi-8,12-iso-isoprostane F<sub>2α</sub>-VI, in human urine. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 29295-29301.

- 
- [129] Larock, R.C., Lee, N.H. Organopalladium approaches to prostaglandins. 11. synthesis of PGF<sub>2α</sub> and 12-epi-PGF<sub>2α</sub> by the controlled, one step, palladium-promoted intermolecular coupling of three different alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113, 7815-7816.
- [130] Hwang, S.W., Adiyaman, M., Khanapure, S.P., Rokach, J. Total synthesis of 12-epi-PGF<sub>2α</sub>. *Tetrahedron Lett.* (1996) 37, 779-782.
- [131] Hwang, S.W., Adiyaman, M., Khanapure, S.P., Schio, L., Rokach, J. Total synthesis of 8-epi-PGF<sub>2α</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116, 10829-10830.
- [132] Taber, D.F., Herr, R.J., Gleave, D.M. Diastereoselective synthesis of an isoprostane: (±)-8-epi-PGF<sub>2α</sub> ethyl ester. *J. Org. Chem.* (1997) 62, 194-198.
- [133] Adiyaman, M., Lawson, J.A., Hwang, S.-W., Khanapure, S.P., FitzGerald, G.A., Rokach, J. Total synthesis of a novel isoprostane IPF<sub>2α</sub>-I and its identification in biological fluids. *Tetrahedron Lett.* (1996) 37, 4849-4852.
- [134] Adiyaman, M., Li, H., Lawson, J.A., Hwang, S.-W., Khanapure, S.P., FitzGerald, G.A., Rokach, J. First total synthesis isoprostane IPF<sub>2α</sub>-III. *Tetrahedron Lett.* (1996) 38, 3339-3342.
- [135] Adiyaman, M., Lawson, J.A., Khanapure, S. P., FitzGerald, G.A., Rokach, J. Total synthesis of 17,17,18,18-d<sub>4</sub>-iPF<sub>2α</sub>-VI and quantification of iPF<sub>2α</sub>-VI in human urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1998) 262, 45-56.
- [136] Granström, E., Samuelsson, B. On the metabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> in female subjects. *J. Biol. Chem.* (1971) 246, 5254-5263.
- [137] Granström, E., Samuelsson, B. On the metabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> in female subjects. II. Structures of six metabolites. *J. Biol. Chem.* (1971) 246, 7470-7485.
- [138] Green, K. The metabolism of prostaglandin F<sub>2α</sub> in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* (1971) 231, 419-444.
- [139] Morrow, J.D., Prakash, C., Awad, J.A., Duckworth, T.A., Zackert, W.E., Blair, I.A., Oates, J.A., Roberts II, L.J. Quantification of the major urinary metabolite of prostaglandin D<sub>2</sub> by stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal Biochem.* (1991) 193, 142-148.
- [140] Awad, J.A., Morrow, J.D., Takahashi, K., Roberts II, L.J. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F<sub>2</sub>-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 4161-4169.
- [141] Waugh, R.J., Morrow, J.D., Roberts II, L.J., Murphy, R.C. Identification and relative quantitation of F<sub>2</sub>-isoprostane regioisomers formed in vivo in the rat. *Free Radical Biol. Med.* (1997) 23, 943-954.



- 
- [142] Kunapuli, P., Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A. Functional characterization of the ocular prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PG  $F_{2\alpha}$ ) receptor. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 27147-27154.
- [143] Kunapuli, P., Lawson, J.A., Rokach, J., Meinkoth, J.L., FitzGerald, G.A. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PG $F_{2\alpha}$ ) and the isoprostane, 8,12-iso-isoprostane  $F_{2\alpha}$ -III, induce cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 22442-22452.
- [144] Praticó, D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. Cyclooxygenase dependent formation of the isoprostane, 8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 9800-9808.
- [145] Praticó, D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. Cyclooxygenase dependent formation of 8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$  by human platelets. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* (1995) 23, 229-231.
- [146] Praticó, D., FitzGerald, G.A. Generation of 8-epiprostaglandin  $F_{2\alpha}$  by human monocytes. *J. Biol. Chem.* (1996) 271, 8919-8924.
- [147] Patrignani, P.P., Santini, G., Panara, M.R., Sculli, M. G., Greco, A., Rotondo, M.T., di Gamberardino, M., Maclouf, J., Ciabattini, G., Patrono, C. Introduction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human monocytes associated with cyclooxygenase-dependent  $F_2$ -isoprostane formation. *Br. J. Pharmacol.* (1996) 118, 1285-1293.
- [148] Watkins, M.T., Patton, G.M., Soler, H.M., Albadawi, H., Humphries, D.E., Evans, J.E., Kadowaki, H. Synthesis of 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  by human endothelial cells: role of prostaglandin  $H_2$  synthase. *Biochem. J.* (1999) 344, 747-754.
- [149] Catella, F., Reilly, P.M., Delanty, N., Lawson, J.A., Moran, N., Meagher, E., and FitzGerald, G.A. Physiological formation of 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  *in vivo* is not affected by cyclooxygenase inhibition. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* (1995) 23, 233-236.
- [150] Schweer, H., Watzer, B., Seyberth, W. and Nüsing, R.M. Improved quantification of 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and  $F_2$ -isoprostanes by gas chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry: partial cyclooxygenase-dependent formation of 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in humans. *J. Mass Spectrom.* (1997) 32, 1362-1370.
- [151] Klein, T., Reutter, F., Schweer, H., Seyberth, H.W., Nüsing, R.M. Generation of isoprostane 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  *in vivo* and *in vitro* via the cyclooxygenases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1997) 282, 1658-1665.
- [152] Bachi, A., Brambilla, R., Fanelli, R., Bianchi, R., Zuccato, E., Chiabrando, C. Reduction of urinary 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  during cyclooxygenase inhibition in rats but not in man. *Br. J. Pharmacol.* (1997) 121, 1770-1774.
- [153] Nugteren, D.H., Hazelhof, E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* (1973) 326, 448-461.

- 
- [154] Granström, E., Samuelsson, B. The structure of a urinary metabolite of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in man. *J. Am. Chem. Soc.* (1969) 91, 3398-3400.
- [155] Hamberg, M. Quantitative studies on prostaglandin synthesis in man II. Determination of the major urinary metabolite of prostaglandin  $F_{1\alpha}$  and  $F_{2\alpha}$ . *Anal. Biochem.* (1973) 55, 368-378.
- [156] Roberts, L.J., Moore, K.P., Zackert, W.E., Oates, J.A., Morrow, J.D. Identification of the major urinary metabolite of the  $F_2$ -isoprostane 8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in humans. *J. Biol. Chem.* (1996) 271, 20617-20620.
- [157] Chiabrando, C., Valagussa, A., Rivalta, C., Durand, T., Guy, A., Zuccato, E., Villa, P., Rossi, J.-C., and Farnelle, R. Identification and measurement of endogenous  $\beta$ -oxidation metabolites of 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 1313-1319.
- [158] Basu, S. Metabolism of 8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *FEBS Lett.* (1998) 428, 32-36.
- [159] Green, K. Metabolism of prostaglandin  $E_2$  in rat. *Biochemistry* (1971) 10, 1072-1086.
- [160] Hamberg, M. Inhibition of prostaglandin synthesis in man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1972) 49, 720-726.
- [161] Takahashi, K., Nammour, T.M., Fukunaga, M., Ebert, J., Morrow, J.D., Roberts II, L.J., Hoover, R.L., Badr, K.F. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin  $F_{2a}$ , in the rat. *J. Clin. Invest.* (1992) 90, 136-141.
- [162] Fukunaga, M., Takahashi, K., Badr, K.F. Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-iso-prostaglandin  $E_2$ , an  $E_2$ -isoprostane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) 195, 507-515.
- [163] Möbert, J., Becker, B.F., Zahler, S., Gerlach, E. Hemodynamic effects of isoprostanes (8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and  $E_2$ ) in isolated guinea pig hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1997) 29, 789-794.
- [164] Longmire, A.W., Roberts, L.J., Morrow, J.D. Actions of the  $E_2$ -Isoprostane 8-iso-PGE<sub>2</sub> on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor. *Prostaglandins* (1994) 48, 247-256.
- [165] Campbell, W.B., Halushka, P.V. In Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York (1996), 601-616.
- [166] Fukunaga, M., Makita, N., Roberts II, L.J., Morrow, J.D., Takahashi, K., Badr, K.F. Evidence for the existence of  $F_2$ -isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* (1993) 264, C1619-C1624.

- 
- [167] Yura, T., Fukunaga, M., Khan, R., Nassar, G.N., Badr, K.F., Montero, A. Free-radical generated  $F_2$ -isoprostanes stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.* (1999) 56, 471-478.
- [168] Sametz, W., Grobuschek, T., Hammer-Kogler, S., Juan, H., Wintersteiger, R. Influence of isoprostanes on vasoconstrictor effects of noradrenaline and angiotensin II. *Eur. J. Pharmacol.* (1999) 378, 47-55.
- [169] Romero, J.C., Reckelhoff, J.F. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* (1999) 34, 943-949.
- [170] Banerjee, M., Kang, K.H., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Newman, J.H. Effects of novel prostaglandin, 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ , in rabbit lung in situ. *Am. J. Physiol.* (1992) 263, H660-H663.
- [171] Kang, K.H., Morrow, J.D., Roberts II, L.J., Newman, J.H., Banerjee, M. (1993). Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.*, 74, 460-465.
- [172] Kawikova, I., Barnes, P.J., Takahashi, T., Tadjkarimi, S., Yacoub, M.H., Belvisi, M. G. 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ , a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (1996) 153, 590-596.
- [173] Okazawa, A., Kawikova, I., Cui, Z.-H., Skoogh, B.-E., Lötvall, J. 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo. *Am. J. Crit. Care Med.* (1997) 155, 436-441.
- [174] Bernareggi, M., Rossoni, G., Berti, F. Bronchopulmonary effects of 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  in anaesthetised guinea pigs. *Pharmacol. Res.* (1998) 37, 75-80.
- [175] Hill, A.A., Coleman, R.A., Taylor, G.W., Moore, K.P., Taylor, I.K. Effect of the isoprostanes, 8-iso prostaglandin  $E_2$  and 8-iso prostaglandin  $F_{2\alpha}$  on the rabbit lung in vivo. *Prostaglandins* (1997) 53, 69-82.
- [176] Marley, R., Harry, D., Anand, R., Fernando, B., Davies, S., and Moore, K. 8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$ , a product of lipid peroxidation, increases portal pressure in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology* (1997) 112, 208-213.
- [177] Kromer, B.M., Tippins, J.R. The vasoconstrictor effects of 8-epi prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in hypoxic rat heart. *Br. J. Pharmacol.* (1999) 126, 1171-1174.
- [178] Jourdan, K.B., Evans, T.W., Goldstraw, P., Mitchell, J.A. Isoprostanes and PGE $_2$  production in human isolated pulmonary artery smooth muscle cells: concomitant and differential release. *FASEB J.* (1999) 13, 1025-1030.
- [179] Wagner, R.S., Weare, C., Jin, N., Mohler, E.R. and Rhoades, R.A. Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-prostaglandin (PG)  $F_{2\alpha}$  in rat aortic rings. *Prostaglandins* (1997) 54, 581-599.

- 
- [180] Kromer, B.M., Tippins, J.R. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *Br. J. Pharmacol.* (1996) 119, 1276-1280.
- [181] Kromer, B.M., Tippins, J.R. Actions of 8 epi prostaglandin  $F_{2\alpha}$  on isolated rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1998) 32, 471-478.
- [182] Jourdan, K.B., Evans, T.W., Cruzen, N.P., Mitchell, J.A. Evidence for a dilator function of 8-iso prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in rat pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* (1997) 120, 1280-1285.
- [183] Hoffman, S.W., Moore, S., Ellis, E.F. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* (1997) 28, 844-849.
- [184] Crankshaw, D. Effects of the isoprostane, 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , on contractility of the human myometrium in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* (1995) 285, 151-158.
- [185] Cracowski, J., Stanke-Labesque, F., Devillier, P., Chavanon, O., Hunt, M., Souvignet, C., Bessard, G. Human internal mammary artery contraction by isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$  type-III (8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ ). *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 397, 161-168.
- [186] Morrow, J.D., Minton, T.A., Roberts II, L.J. The  $F_2$ -isoprostane, 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ , a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* (1992) 44, 155-163.
- [187] Leitinger, N., Blazek, I., Sinzinger, H. The influence of isoprostanes on ADP-induced platelet aggregation and cyclic AMP-generation in human platelets. *Thromb. Res.* (1997) 86, 337-342.
- [188] Minuz, P., Andrioli G., Degan, M., Gaino, S., Ortolani, R., Tommasoli, R., Zuliani, V., Lechi, A., Lechi, C. The  $F_2$ -isoprostane 8-epiprostaglandin  $F_{2\alpha}$  increases in platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* (1998) 18, 1248-56.
- [189] Morrow, J.D., Roberts II, L.J. Mass spectrometry of prostanoids:  $F_2$ -isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. *Methods Enzymol.* (1994) 233, 163-174.
- [190] Lawson, J.A., Brash, A.R., Doran, J., FitzGerald, G.A. Measurement of urinary 2,3-dinor-thromboxane  $B_2$  and thromboxane  $B_2$  using bonded-phase phenylboronic acid columns and capillary gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1985) 150, 463-470.
- [191] Weber, C., Höller, M., Beetens, J., de Clerck, F., Tegtmeyer, F. Determination of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ , 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ , thromboxane  $B_2$ , 2,3-dinor-thromboxane  $B_2$ , PGE $_2$ , PGD $_2$  and PGF $_{2\alpha}$  in human urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1991) 562, 599-611.

- 
- [192] Ferretti, A., Flanagan, A. A simple, rapid selected ion monitoring method for the determination of prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> in human urine. *Biomed. Mass Spectrom.* (1979) 6, 431-434.
- [193] Schweer, H., Seyberth, H.W., Meese, C.O., Fürst, O. Negative ion chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry of prostanoid pentafluorobenzyl ester/methoxime/trimethylsilyl ether derivatives. *Biol. Mass Spectrom.* (1988) 15, 143-151.
- [194] Ferretti, A., Flanagan, V.P. Assay of urinary 2,3-dinor-6-oxo prostaglandin F<sub>1α</sub> by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1993) 622, 109-115.
- [195] Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Böhme, M., Fuchs, I., Frölich, J. C. Solid- and liquid phase extraction for the gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of 2,3-dinor-thromboxane B<sub>2</sub> and 2,3-dinor-6-oxo-prostaglandin F<sub>1α</sub> in human urine. *J. Chromatogr. A* (2000) 885, 351-359.
- [196] Gréen, K., Granström, E., Samuelsson, B., Axen, U. Methods for quantitative analysis of PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, 9α,11α-dihydroxy-15-keto-prost-5-enoic acid and 9α,11α,15-trihydroxy-prost-5-enoic acid from body fluids using deuterated carriers and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1973) 54, 434-453.
- [197] Waddell, K.A., Blair, I.A., Wellby J. Combined capillary column gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry of prostanoids. *Biomed. Mass Spectrom.* (1983) 10, 83-88.
- [198] Tsikas, D. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess *in vivo* synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. *J. Chromatogr. B* (1998) 717, 201-245.
- [199] Lawson, J. A., Rokach, J., and FitzGerald, G. A. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 24441-24444.
- [200] Morrow, J.D., Roberts II, L.J. Mass spectrometric quantification of F<sub>2</sub>-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* (1999) 300, 3-12.
- [201] Nourooz-Zadeh, J., Gopaul, N.K., Barrow, S., Mallet, A. , Anggard, E.E. Analysis of F<sub>2</sub>-isoprostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation *in vivo* by gas chromatography-mass spectrometry: development of solid-phase extraction procedure. *J. Chromatogr. B* (1995) 667, 199-208.
- [202] Nourooz-Zadeh, J. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for measurement of plasma isoprostanes. *Methods Enzymol.* (1999) 300, 13-17.
- [203] Wübert, J., Reder, E., Kaser, A., Weber, P.C., Lorenz, R.L. Simultaneous solid phase extraction, derivatization, and gas chromatographic mass spectrometric quantification of thromboxane and prostacyclin metabolites, prostaglandins, and isoprostanes in urine. *Anal. Chem.* (1997) 69, 2143-2146.

- 
- [204] Mori, T.A., Croft, K.D., Puddy, I B., Beilin, L.J. An improved method for the measurement of urinary and plasma F<sub>2</sub>-isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1999) 268, 117-125.
- [205] Walter, M.F., Blumberg, J.B., Dolnikowsky, G.G., Handelman, G.J. Streamlined F<sub>2</sub>-isoprostane analysis in plasma and urine with high-performance liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (2000) 280, 73-79.
- [206] Mallat, Z., Nakamura, T., Ohan, J., Lesèche, G., Tedgui, A., Maclouf, J., Murphy, R.C. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F<sub>2</sub>-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* (1999) 103, 421-427.
- [207] Li, H., Lawson, J.A., Reilly, M., Adiyaman, M., Hwang, S.W., Rokach, J. FitzGerald, G.A. Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F<sub>2</sub>-isoprostanes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 13381-13386.
- [208] Ferretti, A., Flanagan, V.P. Isolation and measurement of urinary 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1997) 694, 271-276.
- [209] Wang, Z., Ciabattoni, G., Créminon, C., Lawson, J., FitzGerald, G.A., Patrono, C., Maclouf, J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2a</sub> excretion in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1995) 275, 94-100.
- [210] Basu, S. Radioimmunoassay of 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub>: an index for oxidative injury via free radical catalysed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* (1998) 58, 319-325.
- [211] Oguogho, A., Karanikas, G., Kritz, H., Riehs, G., Wagner, O., Sinzinger, H. 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> and 8-epi-PGF<sub>2α</sub> in human atherosclerotic vascular tissue. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* (1999) 60, 129-134.
- [212] Hoffman, S.W., Roof, R.L., Stein, D.G. A reliable and sensitive enzyme immunoassay for the measuring 8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub>: a marker for lipid peroxidation after experimental brain injury. *J. Neurosci. Meth.* (1996) 68, 133-136.
- [213] Hazbun, M.E., Hamilton, R., Holian, A., Eschenbacher, W.L. Ozone-induced increase in substance P and 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> in the airway of human subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1993) 9, 568-572.
- [214] Hart, C.M., Karman, R.J., Blackburn, T.L., Gupta, M.P., Garcia, J.G.N., Mohler III, E.R. Role of 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, 8-isoprostane, in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced derangements of pulmonary artery endothelial cell barrier function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* (1998) 58, 9-16.

- 
- [215] Goil, S., Truog, W.E., Barnes, C., Norberg, M., Rezaiekhlig, M., Thibeault, D. Eight-epi-PGF<sub>2α</sub>: a possible marker of lipid peroxidation in term infants with severe pulmonary disease. *J. Pediatr.* (1998) 132, 349-351.
- [216] Proudfoot, J.M., Barden, A., Mori, T.A., Burke, V., Croft, K.D., Beilin, L.J., Puddey, I.B. Measurement of urinary F<sub>2</sub>-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation – a comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1999) 272, 209-215.
- [217] Bachi, A., Zuccato, E., Baraldi, M., Fanelli, R., Chiabrando, C. Measurement of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2a</sub>, a novel index of lipid peroxidation in vivo, by immunoaffinity extraction/gas chromatography-mass spectrometry. Basal levels in smokers and nonsmokers. *Free Radical Biol. Med.* (1995) 20, 619-624.
- [218] A. Strecker. Über ein Zersetzungsprodukt des Tyrosins. *Liebigs Ann. Chem.* (1850) 73, 70-80.
- [219] Johnson, T.B., Kohmann, E.F. Studies on nitrated proteins: I. The determination of the structure of nitrotyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* (1915) 37, 1863-1884.
- [220] Waser, E., Lewandowski, M. Untersuchungen in der Phenylalanin-Reihe I. Synthese des 1-3,4-Dioxy-phenylalanins. *Helv. Chim. Acta.* (1921) 4, 657-666.
- [221] Sokolovsky M., Riordan, J.F., Vallee, B.L. Tetranitromethane: a reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry* (1966) 5, 3582-3589.
- [222] Giese, R.W., Riordan, J.F. Nitrotyrosine internal standard for amino acid analysis. *Anal. Biochem.* (1975) 64, 588-592.
- [223] Bible, K.C., Boerner, S.A. Kaufmann, S.H. A one-step method for protein estimation in biological samples: nitration of tyrosine in nitric acid. *Anal. Biochem.* (1999) 267, 217-221.
- [224] Knowles, M.E., McWeeny, M.J., Couchman, L., Thorogood, M. Interaction of nitrite with proteins at gastric pH. *Nature* (1974) 247, 288-289.
- [225] Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., Bartsch, H. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem. Toxicol.* (1990) 28, 647-652.
- [226] Ischiropoulos, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* (1998) 356, 1-11.
- [227] Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M. Kalyanaraman, B. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a persona view of recent controversies. *Free Radical Res.* (1999) 31, 651-669.
- [228] Carey, F.A., Sundberg, R.J. *Organische Chemie.* VCH Verlag (1995) 3. Auflage, 1325-1367.

- 
- [229] Vollhard, K.P.C. *Organische Chemie*. VCH Verlag (1990) 1. Auflage, 921-934.
- [230] Sykes, P. *Reaktionsmechanismen der organischen Chemie*. VCH Verlag (1988) 9. Auflage, 390-394.
- [231] Pfeiffer, S., Mayer, B. Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 27280-27285.
- [232] Halliwell, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* (1997) 411, 157-160.
- [233] Van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E., Kaur H.. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett.* (1994) 339, 89-92.
- [234] Pfeiffer, S., Schmidt, K., Mayer, B. Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 6346-6352.
- [235] Tews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wiss. Verl.-Ges. (1991) 4. Auflage, 82.
- [236] Lymar, S.V., Jiang, Q., Hurst, J.K. Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemistry* (1996) 35, 7855-7861.
- [237] Lemercier, J.-N., Padmaja, S., Cueto, R., Squadrito, G.L., Uppu, R.M., Pryor, W.A. Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 345, 160-170.
- [238] Santos, C.X.C., Bonini, M.G., Augusto, O. Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (2000) 377, 146-152.
- [239] Gow, A., Duran, D., Thom, S.R., Ischiropoulos, H. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996) 333, 42-48.
- [240] Tien, M., Berlett, B.S., Levine, R.L., Chock, P.B., Stadtman, E.R. Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 7809-7814.
- [241] Minetti, M., Pietraforte, D., Carbone, V., Salzano, A.M., Scorza, G., Marino, G. Scavenging of peroxynitrite by oxyhemoglobin and identification of modified globin residues. *Biochemistry* (2000) 39, 6689-6697.
- [242] Zou, M., Martin, C. and Ullrich, V. (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.*, 378, 707-713.



- 
- [243] Zhu, L., Gunn, C., Beckman, J.S. Bacterial activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (1992) 298, 452-457.
- [244] Ischiropoulos, H., Zhu, L., Beckman, J.S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* (1992) 298, 446-451.
- [245] Arteel, G.E., Briviba, K., Sies, H. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* (1999) 445, 226-230.
- [246] Oury, T.D., Tatro, L., Ghio, A. J., Piantadosi, C.A. Nitration of tyrosine by hydrogen peroxide and nitrite. *Free Radical Res.* (1995) 23, 537-547.
- [247] Eiserich, J.P., Cross, C.E., Jones, A.D., Halliwell, B., van der Vliet, A. (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite and hypochlorous acid. *J. Biol. Chem.* (1996) 271, 19199-19208.
- [248] Panasenko, O.M., Briviba, K., Klotz, L.-O., Sies, H. Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 343, 254-259.
- [249] Whiteman, M., Halliwell, B. Loss of 3-nitrotyrosine on exposure to hypochlorous acid: Implications for the use of 3-nitrotyrosine as a bio-marker in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) 258, 168-172.
- [250] Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* (1989) 320, 365-76.
- [251] Kettle, A.J., van Dalen, C.J., Winterbourn, C.C. Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. *Redox Rep.* (1997) 3, 257-258.
- [252] Hazen, S.L., Hsu, F.F., Gaut, J.P., Crowley, J.R., Heinecke, J.W. Modifications of proteins and lipids by myeloperoxidase. *Methods Enzymol.* (1999) 300, 88-105.
- [253] Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., van der Vliet, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* (1998) 391, 393-397.
- [254] Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Halliwell, B., Cross, C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 7617-7625.
- [255] Van Dalen, C.J., Winterbourn, C.C., Senthilmohan, R., Kettle, A.J. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 11638-11644.
- [256] Wu, W., Chen, Y., Hazen, S.L. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 25933-25944.
- [257] Sampson, J.B., Ye, Y., Rosen, H., Beckman, J.S. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosin nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* (1998) 356, 207-213.

- 
- [258] Guittet, O., Roy, B., Lepoivre, M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol. Life Sci.* (1999) 55, 1054-1067.
- [259] Eiserich, J.P., Butler, J., van der Vliet, A., Cross, C.E., Halliwell, B. Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals. *Biochem. J.* (1995) 310, 745-749.
- [260] Prutz, W.A., Monig, H., Butler, J., Land, E.J. Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* (1985) 243, 125-34.
- [261] Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E. Tyrosine modifications by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995) 319, 341-349.
- [262] Eiserich, J.P., Vossen, V., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E., van der Vliet, A. Molecular mechanism of damage by excess nitrogen oxides: nitration of tyrosine by gas-phase cigarette smoke. *FEBS Lett.* (1994) 353, 53-56.
- [263] Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulerà N., Baliva, F., Fornai, E., Giuntini, C. Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* (1997) 156, 1902-1907.
- [264] Eiserich, J.P., Estévez, A.G., Bamberg, T.V., Ye, Y.Z., Chumley, P.H., Beckman, J.P., Freeman, B.A. Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of  $\alpha$ -tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 6365-6370.
- [265] Roberts, E.S., Lin, H., Crowley, J.R., Vuletich, J. L., Osawa, Y., Hollenberg, P.F. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of catalytic activity of cytochrome P450 2B1. *Chem. Res. Toxicol.* (1998) 11, 1067-1074.
- [266] Guittet, O., Decottignies, P., Serani, L., Henry, Y., Le Marechal, P., Laprevote, O., Lepoivre, M. Peroxynitrite-mediated nitration of the stable free radical tyrosine residue of the ribonucleotide reductase small subunit. *Biochemistry* (2000) 39, 4640-4648.
- [267] Pennathur, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Heinecke, J.W. Mass spectrometric quantification of 3-Nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 34621-34628.
- [268] Hensley, K., Maitt, M.L., Yu, Z.Q., Sang, H., Markesbery, W.Y., Floyd, R.A. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J. Neurosci.* (1998) 18, 8126-8132.
- [269] Oleszak, E.L., Zaczynska, E., Bhattacharjee, M., Butunoi, C., Legido, A., Katsetos, C.D. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (1998) 5, 438-445.

- 
- [270] Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P.G., Chen, J., Accavitti, M.A., Tarpey, M.M., White C.R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* (1994) 375, 81-88.
- [271] Heinecke, J.W. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *FASEB J.* (1999) 13, 1113-1120.
- [272] Thuraishingham, R.C., Nott, C.A., Dodd, S.M., Yaqoob, M.M. Increased nitrotyrosine staining in kidneys from patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* (2000) 57, 1968-72
- [273] Skinner, K.A., Crow, J.P., Skinner, H.B., Chandler, R.T., Thompson, J.A., Parks, D.A. Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 342, 282-288.
- [274] Shigenaga, M.K., Lee, H.H., Blount, B.C., Christen, S., Shigeno, E.T., Yip, H., Ames B.N. Inflammation and NO<sub>x</sub>- induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997) 94, 3211-3216.
- [275] Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Villari, D., Caputi, A.P., Longo, G. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci.* (1998) 63, PL25-PL30.
- [276] Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y.-C., Murad F. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95, 11584-11589.
- [277] Lightfoot, R.T., Shuman, D., Ischiropoulos, H. Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* do not reduce 3-nitrotyrosine. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 1132-1136.
- [278] Greenacre, S.A.B., Evans, P., Halliwell, B., Brain, S.D. Formation and loss of nitrated proteins in peroxynitrite-treated rat skin in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) 262, 781-786.
- [279] Balabanli, B., Kamisaki, Y., Martin, E., Murad, F. Requirements for heme and thiols for the nonenzymatic modification of nitrotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 13136-13141.
- [280] Ischiropoulos, H., Al-Mehdi, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* (1995) 364, 279-282.
- [281] Yi, D., Smythe, G.A., Blount, B.C., Duncan, M.W. Peroxynitrite-mediated nitration of peptides: Characterization of the products by electrospray and combined gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 344, 253-259.
- [282] Souza, J.M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C.S., Ischiropoulos, H. Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999) 371, 169-178.

- 
- [283] Masuda, M., Mower, H.F., Pignatelli, B., Celan, I., Friesen, M.D., Nishino, H., Ohshima, H. Formation of N-nitrosamines and N-nitramines by the reaction of secondary amines with peroxynitrite and other reactive nitrogen species: comparison with nitrotyrosine formation. *Chem. Res. Toxicol.* (2000) 13, 301-308.
- [284] Ohshima, H., Celan, I., Chazotte, L., Pignatelli, B., Mower, H.F. Analysis of 3-nitrotyrosine in biological fluids and protein hydrolyzates by high-performance liquid chromatography using a postpreparation, on-line reduction column and electrochemical detection: results with various nitrating agents. *Nitric Oxide* (1999) 3, 132-141.
- [285] Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science* (1978) 201, 875-880.
- [286] Mates, J.M., Sanchez-Jimenez, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.* (1999) 4, D339-D345
- [287] Brown, R.H. SOD1 aggregates in ALS: cause, correlate or consequence? *Nature Med.* (1998) 4, 1362-1364.
- [288] Ferrante, R., Shinobu, L.A., Schulz, J.B., Matthews, R.T., Thomas, C.E., Kowall, N.W., Gurney, M.E., Beal, M.F. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann. Neurol.* (1997) 42, 326-334.
- [289] Bruijn, L. I., Beal, M.F., Becher, M.W., Schulz, J.B., Wong, P.C., Price, D.L., Cleveland, D.W. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-like superoxide dismutase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94, 7606-7611.
- [290] MacMillan-Crow, L.A., Thompson, J.A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999) 366, 82-88.
- [291] Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., Murayama, K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 14085-14089.
- [292] Luoma, J.S., Stralin, P., Marklund, S.L., Hiltunen, T.P., Sarkioja, T., Yla-Herttuala, S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1998) 18, 157-67
- [293] Fukai, T., Siegfried, M. R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kodja, G., Harrison, D. G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.* (2000) 105 1631-1639.

- 
- [294] Smith, W.L., Marnett, L.J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* (1991) 1083, 1-17.
- [295] Garavito, R.M., DeWitt, D.L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta* (1999) 1441, 278-287.
- [296] Goodwin, D.C., Landino, L.M., Marnett, L.J. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* (1999) 13, 1121-1136.
- [297] Salvemini, D., Settle, S.L., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G., Needleman, P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br. J. Pharmacol.* (1995) 114, 1171-1178.
- [298] Gunther, M.R., Hsi, L.C., Curtis, J.F., Gierse, J.K., Marnett, L.J., Eling, T.E., Mason, R.P. Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 17086-17090.
- [299] Goodwin, D.C., Gunther, M.R., Hsi, L.C., Crews, B.C., Eling, T.E., Mason, R.P., Marnett, L.J. Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 8903-8909.
- [300] Kennedy, T.A., Smith, C.J., Marnett, L.J. Investigation of the role of cysteines in catalysis by prostaglandin endoperoxide synthase. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 27357-27364.
- [301] Landino, L.M., Crews, B.C., Timmons, M.D., Morrow, J.D., Marnett L.J. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93, 15069-15074.
- [302] Boulos, C., Jiang, H., Balazy, M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2000) 293, 222-229.
- [303] Zou, M., Martin, C., Ullrich, V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.* (1997) 378, 707-713.
- [304] Lerner, A.B. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *Adv. Enzymol.* (1953)14, 73-128.
- [305] Petitclerc, C., Benoiton, N.L., D'Iorio, A. Metabolism of o-hydroxy-L- and o-hydroxy-D-phenylalanine-2-14C in rat. *Can. J. Biochem.* (1969) 47, 1147-1154.
- [306] Tabrizi-Fard, M. A., Maurer, T.S., Fung, H.-L. In vivo disposition of 3-Nitro-L-tyrosine in rats: implications on tracking systemic peroxynitrite exposure. *Drug Metab. Dispos.* (1999) 27, 429-431.

- 
- [307] Kaur, H., Halliwell, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* (1994) 350, 9-12.
- [308] Yi, D., Ingelse, B.A., Duncan, M. W., Smythe, G. A. Quantification of 3-nitrotyrosine in biological tissues and fluids: generating valid results by eliminating artifactual formation. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* (2000) 11, 578-586.
- [309] Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Hida, M., Ishida, H., Ichimori, K., Nakazawa, H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radical Biol. Med.* (1997) 22, 771-774.
- [310] Ter Steege, J.C.A., Koster-Kamphuis, L., Van Straaten, E.A., Forget, P.P., Buurman, W.A. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radical Biol. Med.* (1998) 25, 953-963.
- [311] Skatchkov, M., Larina, L.L., Larin, A.A., Fink, N., Bassenge, E. Urinary nitrotyrosine content as a marker of peroxynitrite-induced tolerance to organic nitrates. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1997) 2, 85-96.
- [312] Tohgi, H., Takashi, A., Yamazaki, K., Takahiko, M., Ishizaki, E., Isobe, C. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-Nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* (1999) 46, 129-131.
- [313] Herce-Pagliai, C., Kotecha, S., Shuker, D.E.G. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* (1998) 2, 324-336.
- [314] Crow, J.P. Measurement and significance of free and protein-bound 3-nitrotyrosine, 3-chlorotyrosine, and free 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid in biological samples: a high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection. *Methods Enzymol.* (1999) 301, 151-160.
- [315] Liu, H., Huang, T., Kissinger, C.B., Kissinger, P.T. Comparison of detection methods for liquid chromatographic determination of 3-nitro-L-tyrosine. *J. Chromatogr. B.* (1998) 713, 289-295.
- [316] Viera, L., Ye, Y.Z., Estévez, A.G., Beckman, J.S. Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods Enzymol.* (1999) 301, 373-381.
- [317] Khan, J., Brennan, D.M., Bradley, N., Gao, B., Bruckdorfer, R., Jacobs, M. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem. J.* (1998) 330, 795-801.
- [318] Kaur, H., Lyras, L., Jenner, P., Halliwell, B. Artefacts in HPLC detection of 3-nitrotyrosine in human brain tissue. *J. Neurochem.* (1998) 70, 2220-2223.
- [319] Crow, J.P., Ischiropoulos, H. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* (1996) 269, 185-94.

- 
- [320] Sodum, R.S., Akerkar, S.A., Fiala, E.S. Determination of 3-nitrotyrosine by high-pressure liquid chromatography with dual-mode electrochemical detector. *Anal. Biochem.* (2000) 280, 278-285.
- [321] Hensley, K., Maidt, M.L., Pye, Q.N., Stewart, C.A., Wack, M., Tabatabaie, T., Floyd, R.A. Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal. Biochem.* (1997) 251, 187-195.
- [322] Hensley, K., Williamson, K.S., Floyd, R.A. Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro- $\gamma$ -tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 520-528.
- [323] Maruyama, W., Hashizume, Y., Matsubara, K., Naoi, M. Identification of 3-nitrotyrosine, a product of nitric oxide and superoxide, as an indicator of oxidative stress in the human brain. *J. Chromatogr. B* (1996) 676, 153-158.
- [324] Shigenaga, M.K. Quantification of protein-bound 3-nitrotyrosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.* (1999) 301, 27-40.
- [325] Liu, H., Duda, C.T., Huang, T., Aruda, W.O., Kissinger, P.T. Optimization of post-column photolysis and electrochemical detection for the liquid chromatographic determination of 3-nitro-L-tyrosine. *J. Chromatogr. B* (1998) 818, 69-75.
- [326] Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Kishimoto, Y., Kitano, M., Itoh, T. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* (1996) 685, 343-347.
- [327] Leeuwenburgh, C., Rasmussen, J.E., Hsu, F.F., Mueller, D.M., Pennathur, S., Heinecke, J.W. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 3520-3526.
- [328] Sokolovsky, M., Riordan, J.F., Vallee, B.L. Conversion of 3-nitrotyrosine to 3-aminotyrosine in peptides and proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1967) 27, 20-25.
- [329] Crowley, J. R., Yarashesky, K., Leeuwenburgh, C., Turk, J., Heinecke, J.W. Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine. *Anal. Biochem.* (1998) 259, 127-135.
- [330] Frost, M.T., Halliwell, B., Moore, K.P. Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem. J.* (2000) 345, 453-458.
- [331] Jiang, H., Balazy, M. Detection of 3-Nitrotyrosin in human platelets exposed to peroxynitrite by a new gas chromatography/mass spectrometry assay. *Nitric Oxide* (1998) 2, 350-359.

- 
- [332] Leeuwenburgh, C., Hardy, M.M., Hazen, S.L., Wanger, P., Oh-ishi, S., Steinbrecher, U.P., Heinecke, J.W. Reactive Nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 1433-1436.
- [333] Leeuwenburgh, C., Hansen, P., Shaish, A., Holloszy, J.O., Heinecke, J.W. Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. *Am. J. Physiol.* (1998) 274, R453-R461.
- [334] Bakhoj, A., Heegaard, N.H.H. Monitoring nitrotyrosinylation of a synthetic peptide by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* (1999) 20, 2519-2523.
- [335] De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, P.E. Biomarkers of free radical damage. *Free Radical Biol. Med.* (1999) 26, 202-226.
- [336] Kadiiska, M.B., Gladen, B.C., Baird, D.D., Dikalova, A.E., Sohal, R.S., Hatch, G.E., Jones, D.P., Mason, R.P., Barrett, J.C. Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of  $\text{CCl}_4$  poisoning? *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 838-845.
- [337] Giammarioli, S., Filesi, C., Sanzini, E. Oxidative stress markers: specificity and measurement techniques. *Ann. 1<sup>st</sup> Super Sanita* (1999) 35, 563-576.
- [338] Meagher, E.A., FitzGerald, G.A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 1745-1750.
- [339] Awad, J.A., Roberts II, L J., Burk, R.F., Morrow, J.D. Isoprostanes – prostaglandin-like compounds formed in vivo independent of cyclooxygenase. *Gastroenterol. Clin. North Am.* (1996) 25, 409-427.
- [340] Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Kaur, H., Cross, C.E., Halliwell, B. Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol.* (1996) 269, 175-84.
- [341] Siekmann, L. Reference methods, in Lawson, A. M. (Editor) *Mass spectrometry*. DeGruyter, Berlin (1989), 647-681.
- [342] Fales, H.M., Jaouni, T.M., Babashak, J.F. Simple device for preparing ethereal diazomethane without resorting to codistillation. *Anal. Chem.* (1973) 13, 2302-2303.
- [343] Jaffe, M.Z. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Physiol. Chem.* (1886) 10, 391-400.
- [344] Murphy, R.C., Clay, K.L. Preparation of  $^{18}\text{O}$  derivatives of eicosanoids for GC-MS quantitative analysis. *Methods Enzymol.* (1982) 86, 194-197.
- [345] Pickett, W.C., Murphy, R.C. Enzymatic preparation of carboxyl oxygen-18 labeled prostaglandin  $\text{F}_2\alpha$  and utility for quantitative mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1981) 111, 115-121.



- 
- [346] Tsikas, D., Bracht, S., Stichtenoth, D., Frölich, J.C. Enzymatic and chemical labelling of prostaglandin E<sub>1</sub> and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin E<sub>1</sub>. *J. Lab. Compds. Radiopharm.* (1993) 33, 1139-1149.
- [347] Tsikas D., Fauler J., Frölich J.C. Analysis of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B<sub>4</sub> by gas chromatography-(tandem) mass spectrometry. *Eicosanoids.* (1992) 5, 7-9.
- [348] Miller, O.V.; Magee, W.E. In vitro hydrolysis of prostaglandin F<sub>2α</sub> esters by serum or plasma of different animal species. *Prostaglandins* (1974) 10, 29-38.
- [349] Tsikas, D., Schwedhelm, E., Gutzki, F.-M., Jahn, O., Fakistas, P., Frölich, J.C. Enzymatic synthesis of dioxygen-18 labeled 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> and its use in quantitative GC-tandem MS. *J. Lab. Compds. Radiopharm.* (1997) 39, 531-540.
- [350] Tsikas, D., Schwedhelm, E., Fauler, J., Gutzki, F.-M., Mayatepek, E., Frölich, J. C. Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1998) 716, 7-17.
- [351] Middleditch, B.S., Desiderio, D.M. Mass spectra of prostaglandins. *Anal. Biochem.* (1973) 55, 509-520.
- [352] Green, K. Gas chromatography--mass spectrometry of O-methyloxime derivatives of prostaglandins. *Chem. Phys. Lipids.* (1969) 3, 254-272.
- [353] Lehmann, W.D. *Massenspektrometrie in der Biochemie.* Spektrum Verlag (1996) 1.Auflage, 32-35.
- [354] Delanty, N., Reilly, M., Pratico, D., FitzGerald, D.J., Lawson, J.A. & FitzGerald, G.A. 8-epi PGF<sub>2α</sub>: specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (1996) 42, 15-19.
- [355] Helmersson, J., Basu, S. (1999). F<sub>2</sub>-isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* (1999) 61, 203-205.
- [356] FitzPatrick, D.R. Zellweger syndrome and associated phenotypes. *J. Med. Genet.* (1996) 33, 863-868.
- [357] Fauler, J., Tsikas, D., Mayatepek, E., Keppler, D., and Frölich, J.C. Impaired degradation of prostaglandins and thromboxane in Zellweger syndrome. *Pediatr. Res.* (1994) 36, 449-455.
- [358] Mayatepek, E., Lehmann, W.-D., Fauler, J., Tsikas, D., Frölich, J.C., Schutgens, R.B. H., Wanders, R.J.A., and Keppler, D. Impaired degradation of leukotrienes in patients with peroxisome deficiency disorders. *J. Clin. Invest.* (1993) 91, 881-888.
- [359] Mayatepek, E., Lehmann, W.-D. 12- and 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid are excreted in the urine of peroxisome-deficient patients: evidence for peroxisomal metabolism in vivo. *Pediatr. Res.* (1996) 39, 146-149.

- 
- [360] Knop, E., Bader, A., Böker, K., Pichlmayr, R., Sewing, K.-F. Ultrastructural and functional differentiation of hepatocytes under long-term culture conditions. *Anat. Rec.* (1995) 242, 337-349.
- [361] Selgen, P.O. *Methods Cell Biol.* (1976) 13, 29-83.
- [362] Dunn, J.C., Yarmush, M.L., Koebe, H.G., Tompkins, R.G. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry longterm culture in a sandwich configuration. *FASEB J.* (1989) 3, 174-177.
- [363] Bader, A., Knop, E., Kern, A., Böker, K., Frühauf, N., Crome, O., Esselmann, H., Pape, C., Kempka, G., Sewing, K.-F. 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes – design of an organotypical model. *Exp. Cell Res.* (1996) 226, 223-233.
- [364] Elsdale, T. and Bard, J. Collagen substrate for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* (1972) 54, 626-637.
- [365] Hankin, J.A., Clay, C.E., Murphy, R.C. The effects of ethanol and acetaldehyde on the metabolism of prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> in isolated rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1998) 285, 155-161.
- [366] Guy, A., Durand, T., Roland, A., Cormenier, E. and Rossi, J.-C. Total synthesis of *ent*-15(RS)-2,3-dinor-5,6-dihydro-8-epi-PGF<sub>2α</sub>. *Tetrahedron Lett.* (1998) 39, 6181-6184.
- [367] Schwedhelm, E., Tsikas, D., Durand, T., Gutzki, F.-M., Guy, A., Rossi, J.-C., Frölich, J. C. Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> in human urine. *J. Chromatogr. B* (2000) 744, 99-112.
- [368] Morrow, J.D., Zackert, W.E., Yang, J.P., Kurhts, E.H., Callewaert, D., Dworski, R., Kanai, K., Taber, D., Moore, K., Oates, J.A., Roberts II, L.J. Quantification of the major urinary metabolite of 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal. Biochem.* (1999) 269, 326-331.
- [369] Morrow, J.D., Minton, T.A., Mukundan, C.R., Campbell, M.D., Zackert, W.E., Daniel, V.C., Badr, K.F., Blair, I.A., and Roberts II, L.J. Free radical-induced generation of Isoprostanes in vivo. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 4317-4326.
- [370] Tsikas, D., Schwedhelm, E., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C. Gas chromatographic-mass spectrometric discrimination between 8-iso-prostaglandin E<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> through derivatization by *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxyl amine. *Anal. Biochem.* (1998) 261, 230-232.
- [371] Waddell, K.A., Blair, I.A., Wellby J. Combined capillary column gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry of prostanoids. *Biomed. Mass Spectrom.* (1983) 10, 83-88.

- [372] Koshy, K.T., Kaiser, D.G., van der Slik, A.L. O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine hydrochloride as a sensitive derivatizing agent for the electron capture gas chromatographic analysis of keto steroids. *J. Chromatogr. Sci.* (1975) 13, 97-104.
- [373] Stehle, R.G. Physical chemistry, and handling of prostaglandins E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, D<sub>2</sub>, and I<sub>2</sub>: a critical summary. *Methods Enzymol.* (1982) 86, 436-458.
- [374] Hamberg, M., Israelsson, U. Metabolism of prostaglandin E<sub>2</sub> in guinea pig liver. *J. Biol. Chem.* (1970) 245, 5107-5114.
- [375] Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.-M., Frölich, J. C. Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1999) 270, 231-241.
- [376] Hawkey, C. J. COX-2 inhibitors. *Lancet* 353 (1999) 307-314.
- [377] Schweer, H., Meese, C.O., Furst, O., Kuhl, P.G., Seyberth, H.W. Tandem mass spectrometric determination of 11-dehydrothromboxane B<sub>2</sub>, an index metabolite of thromboxane B<sub>2</sub> in plasma and urine. *Anal. Biochem.* 164(1987), 156-63.
- [378] Ku, E.C., Lee, W., Kothari, H.V., Scholer, D.W. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am. J. Med.* 80 (1986) 18-23.
- [379] Förstermann, U., Mügge, A., Bode, S.M., Frölich, J.C. Response of human coronary arteries to aggregating platelets: importance of endothelium-derived relaxing factor and prostanoids. *Circ. Res.* 63 (1988) 306-312.
- [380] Tsikas, D., Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their <sup>15</sup>N-labelled analogs. *J. Chromatogr. B* (1994) 661, 185-191.
- [381] Schwedhelm, E., Sandmann, J., Tsikas, D. Synthesis of 3-nitro-L-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]tyrosine for use as internal standard for quantification of 3-nitrotyrosine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Lab. Compds. Radiopharm.* (1998) 41, 773-780.
- [382] Schwedhelm, E., Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C. Gas chromatographic tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosin in human plasma at the basal state. *Anal. Biochem.* (1999) 276, 195-203.
- [383] Carper, W.R., Dorey, R.C., Tomer, K.B., Crow, F.W. Mass spectral fragmentation pathways in 2,4,6-trinitrotoluene derived from a MS/MS unimolecular and collisionally activated dissociation study. *Org. Mass Spectrom.* (1984) 19, 623-626.
- [384] Husek, P., Macek, K. Gas chromatography of amino acids. *J. Chromatogr.* (1975) 113, 139-230.
- [385] Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Rossa, S., Bauer, H., Neumann, C., Dockendorff, K., Sandmann, J. Frölich, J.C. Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by

- gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay – solutions by gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (1997) 244, 208-220.
- [386] Matsumura, S., Kataoka, H., Makita, M. Determination of amino acids in human serum by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. B* (1996) 681, 375-380.
- [387] Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D., Pittman, K.A., Spector, S. *J. Pharm. Sci.* (1992) 81, 309-312.
- [388] Van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E., Kaur H.. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett.* (1994) 339, 89-92.
- [389] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951) 193, 265-275.
- [390] Narahashi, Y. *Pronase. Methods Enzymol.* (1970) 19, 651-664.
- [391] Peters, T. Serum albumin. *Adv. Protein Chem.* (1985) 37, 161-245.
- [392] Schomburg, G. *Gaschromatographie. VCH* (1987) 2. Auflage, 75-76.
- [393] Hill, D.B., Awad, J.A. Increased urinary F<sub>2</sub>-isoprostane excretion in alcoholic liver disease. *Free Radical Biol. Med.* (1999) 26, 656-660.
- [394] Marangon, K., Devaraj, S., Tirosh, O., Packer, L., Jialal, I. Comparison of the effect of  $\alpha$ -lipoic acid and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* (1999) 27, 1114-21.
- [395] Burke, A., Lawson, J.A., Meagher, E.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A. Specific analysis in plasma and urine of 2,3-dinor-5,6-dihydro-isoprostane F<sub>2 $\alpha$</sub> -III, a metabolite of isoprostane F<sub>2 $\alpha$</sub> -III and an oxidant product of  $\gamma$ -linolenic acid. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 2499-2504.
- [396] Oguogho, A., Mehrabi, M., Sinzinger, H. Increased plasma, serum and urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  in heterozygous hypercholesterolemia. *Wien. Klin. Wochenschr.* (1999) 111, 113-118.
- [397] Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Phivthong-ngam, L., Brandes, F.P., Schwedhelm, E., Böhme, M., Tsikas, D., Frölich, J.C. Dietary L-arginine and  $\alpha$ -tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis* (1998) 141, 31-43.
- [398] Cockcroft, J.R., Chowienczyk, P.J., Brett, S.E., Chen, C.P., Dupont, A., Van Nueten, L., Wooding, S.J., Ritter, J.M. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1995) 274, 1067-71.

- 
- [399] Troost, R., Schwedhelm, E., Rojczyk, S., Tsikas, D., Frölich, J.C. Nebivolol decreases systemic oxidative stress in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2000) 50, 377-379.
- [400] Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Sandmann, J., Schwedhelm, E., Frölich, J.C. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of human plasma and urinary nitrate after its reduction to nitrite and derivatization to the pentafluorobenzyl derivative. *J. Chromatogr. B* (1999) 731, 285-91.
- [401] De Man, F.H.A.F., Jonkers, I.J.A.M., Schwedhelm, E., Smelt, A.H.M., Onkenhout, W., van Duyvenvoorde, W., Buytenhek, R., Leuven, J.A.G., Troost, R., van der Laarse, A., Princen, H.M.G. Normal oxidative stress and enhanced lipoprotein resistance to *in vitro* oxidation in hypertriglyceridemia; effects of bezafibrate therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2000), in Druck.
- [402] Schwedhelm, E., Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C. Thin-layer chromatographic separation of two urinary isoprostanes, 8-iso-PGF<sub>2α</sub> and 8-iso-PGE<sub>2</sub>, and mass spectrometric quantification. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1999) 55, A16.
- [403] Lehninger, A. *Biochemie*. VCH (1983), 2. Auflage, 678-679.
- [404] Sago, T., Nakayama, R., Okumura, T., Saito, K. Metabolism of prostaglandins D<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* (1986) 879, 330-338.
- [405] Okumura, T., Nakayama, R., Sago, T., Saito, K. Identification of prostaglandin E metabolites from primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 837, 197-207.
- [406] Balazy, M., Brass, E.P., Gerber, J.G., Nies, A.S. Facile Method for preparation of 2,3-dinor-6-keto PGF<sub>1α</sub>, the major urinary metabolite of prostacyclin. *Prostaglandins* (1988) 36, 421-430.
- [407] Hill, M. J. *Microbial metabolism in the digestive tract*. CRC Press, Boca Rato (1986), 113-117.
- [408] Audoly, L.P., Rocca, B., Fabre, J.E., Koller, B.H., Thomas, D., Loeb, A L., Coffman, T.M., FitzGerald, G.A. Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF<sub>2α</sub>-III and iPE<sub>2</sub>-III are mediated via the thromboxane A<sub>2</sub> receptor *in vivo*. *Circulation* (2000) 101, 2833-2840.
- [409] Sandmann, J. Untersuchungen zur Bedeutung der S-Transnitrosylierungs-Reaktion für die Bildung, den Metabolismus und die Vermittlung der biologischen Aktivitäten von NO und S-Nitroso-Substanzen. (2000) Dissertation Universität Hannover.
- [410] Tarcan, T., Siroky, M.B., Krane, R.J., Azadzo, K.M. Isoprostane 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, a product of oxidative stress, is synthesized in the bladder and causes detrusor smooth muscle contraction. *Neurourol. Urodyn.* (2000) 19, 43-51.

- 
- [411] Fischer, S. Analysis of eicosanoid formation in humans by mass spectrometry. *Adv. Lipid. Res.* (1989) 23, 199-217.
- [412] Frölich, J.C., Wilson, T.W., Sweetman, B.J., Smigel, M., Nies, A.S., Carr, K., Watson, J.T., Oates, J.A. Urinary prostaglandins: Identification and origin. *J. Clin. Invest.* (1975) 55, 763-770.
- [413] Glasser, S.P. (1999). Prospects of therapy of nitrate tolerance. *Lancet* (1999) 353, 1545-1546

## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| AA               | Arachidonsäure   |
| ALS              | Amyotrophe Lateralsklerose   |
| BOSS             | <i>biomarker of oxidative stress status</i>  |
| BSA              | <i>bovine serum albumin</i>  |
| BSTFA            | <i>N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid</i>  |
| C <sub>18</sub>  | Oktadecylsilika  |
| CAD              | <i>collision-activated dissoziation</i>  |
| COX              | Cyclooxygenase   |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid   |
| DOPA             | Dihydroxyphenylalanin  |
| DTPA             | Diethylentriaminpentaessigsäure  |
| EC               | Elektrochemisch  |
| EC <sub>50</sub> | <i>effective concentration 50 %</i>  |
| EDRF             | <i>endothelium-derived relaxing factor</i>   |
| EI               | <i>electron impact</i>   |
| EIA              | <i>enzyme immunoassay</i>  |
| ELISA            | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>   |
| ESR              | Elektronen-Resonanzspektroskopie   |
| ET               | Elektronentransfer   |
| FAB              | <i>fast atom bombardment</i>   |
| FL               | Fluoreszenz  |
| GC-MS            | Gaschromatographie-Massenspektrometrie   |
| GC-tandem MS     | Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie   |
| GSH              | Glutathion   |
| GSNO             | S-Nitroso-Gluthathion  |
| HPLC             | <i>high performance liquid chromatography</i>  |
| ICI 192605       | 4(Z)-6-[2-( <i>o</i> -Chlorophenyl)-4-( <i>o</i> -hydroxyphenyl)-1,3-dioxan- <i>cis</i> -5-yl]hexensäure |
| IS               | Interner Standard  |
| LC               | <i>liquid chromatography</i>   |
| LDL              | <i>low density lipoprotein</i>   |
| MO               | <i>O</i> -Methylhydroxylamin   |
| MOX              | <i>O</i> -Methylhydroxylamin Hydrochlorid  |
| MPO              | Myeloperoxidase  |
| MS               | Massenspektrometrie  |
| MUM              | <i>major urinary metabolite</i>  |
| m/z              | Masse zu Ladungs-Verhältnis  |
| 3-NT             | 3-Nitrotyrosin   |
| NHPA             | 3-Nitro-4-hydroxyphenylalanin  |
| NICI             | <i>negative-ion chemical ionization</i>  |
| NO               | Stickstoffmonoxid  |
| NOS              | NO-Synthase  |
| 8-OHdG           | 8-Hydroxydeoxyguanosin   |
| PFB-Bromid       | Pentafluorbenzylbromid   |

|       |  |
|-------|--|
| PFBO  | <i>O</i> -(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamin              |
| PFBOX | <i>O</i> -(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamin Hydrochlorid |
| PFP   | Pentafluoropropionsäure  |
| PFPA  | Pentafluoropropionsäureanhydrid                                  |
| PG    | Prostaglandin  |
| RIA   | <i>radioimmunoassay</i>  |
| RNS   | <i>reactive nitrogen species</i>                                 |
| ROS   | <i>reactive oxygen species</i>                                   |
| RSD   | <i>relative standard deviation</i>                               |
| SD    | <i>standard deviation</i>  |
| SIM   | <i>selected-ion monitoring</i>                                   |
| SOD   | Superoxid-Dismutase  |
| SPE   | <i>solid-phase extraction</i>                                    |
| SRM   | <i>selected-reaction monitoring</i>                              |
| TBA   | Thiobarbitursäure  |
| TBARS | <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>                   |
| TEA   | <i>thermal energy analyzer</i>                                   |
| TLC   | <i>thin layer chromatography</i>                                 |
| TMS   | Trimethylsilyl   |
| TMSOH | Trimethylsilanol   |
| Tx    | Thromboxan   |
| Tyr   | Tyrosin  |
| UV    | Ultraviolett   |

## Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von größt möglicher Reinheit.

|   |                            |
|---|----------------------------|
| Aceton                                      | Baker, Holland             |
| Acetonitril                                 | Merck, Darmstadt           |
| Arachidonsäure                              | Sigma, Deisenhofen         |
| Calciumchlorid                              | Merck, Darmstadt           |
| Collagenase <i>Clostridium histolyticum</i> | Sigma, Deisenhofen         |
| Cyclooxygenase –I und –II                   | Cayman, Ann Arbor, MI, USA |
| D(+)-Glucose-Monohydrat                     | Merck, Darmstadt           |
| Diazald                                     | Aldrich, Steinheim         |
| Dichlordimethylsilan                        | Aldrich, Steinheim         |
| Diethylentriaminpentaessigsäure             | Aldrich, Steinheim         |
| DMEM/Ham's F-12 Medium                      | Biochrom, Berlin           |
| EDTA  | Merck, Darmstadt           |
| Ethanol, absolut                            | Baker, Holland             |
| <i>N</i> – Ethyldiisopropylamin             | Aldrich, Steinheim         |
| 4-Fluorobenzylbromid (4FB-Bromid)           | Aldrich, Steinheim         |
| Fötale Kälberserum (FKS)                    | Biochrom, Berlin           |
| Hämatin                                     | Sigma, Deisenhofen         |
| 4-Hydroxy-3-nitrophenylessigsäure           | Sigma, Deisenhofen         |
| ICI 192605                                  | ICI, London, UK            |
| Isotone Natriumchloridlösung (0,9%)         | Braun, Melsungen           |
| Kaliumhydrogenphosphat                      | Merck, Darmstadt           |
| Kupfersulfat                                | Merck, Darmstadt           |



|  |   |
|--|---|
| Magnesiumchlorid Hexahydrat  | Merck, Darmstadt                                    |
| <i>O</i> -Methylhydroxylamin Hydrochlorid                                    | Aldrich, Steinheim                                  |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat   | Merck, Darmstadt                                    |
| Natriumhydroxidplätzchen   | Merck, Darmstadt                                    |
| Natriumnitrat  | Riedel de Haën, Seelze                              |
| Natriumnitrit  | Riedel de Haën, Seelze                              |
| Natrium[ <sup>15</sup> N]nitrat, (98,5% <sup>15</sup> N)                     | MSD Isotopes MFC, Montreal, Canada                  |
| Natrium[ <sup>15</sup> N]nitrit, (98,5% <sup>15</sup> N)                     | Cambridge Isotope Laboratories,<br>Andover, MA, USA |
| Natriumsulfat, wasserfrei, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                   | Merck, Darmstadt                                    |
| nitriertes BSA   | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| <i>p</i> -Nitrophenylalanin  | Aldrich, Steinheim                                  |
| Nitrotyrosin   | Aldrich, Steinheim                                  |
| Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz  | Aldrich, Steinheim                                  |
| 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid   | Merck, Darmstadt                                    |
| <i>O</i> -(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)hydroxylamin<br>Hydrochlorid           | Fluka, Neu-Ulm                                      |
| Pentafluoropropionsäureanhydrid  | Pierce, Rockford, Illinois, USA                     |
| <i>o</i> -Phosphorsäure 85%  | Aldrich, Steinheim                                  |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)                                  | Sigma, Deisenhofen                                  |
| Pronase <i>Streptomyces griseus</i>  | Boehringer, Mannheim                                |
| Prostaglandin E <sub>2</sub>   | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| 8-iso-Prostaglandin E <sub>2</sub>   | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| 2,3-Dinor-8-iso-Prostaglandin F <sub>1α</sub>                                | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| Prostaglandin F <sub>2α</sub>  | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| [3,3',4,4'- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-Prostaglandin F <sub>2α</sub>      | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| 8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub>  | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| 8-iso-[3,3',4,4'- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]Prostaglandin F <sub>2α</sub> | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| <sup>3</sup> H-8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub> (50-70 Ci/mmol)           | SibTech, Elmsford, NY, USA                          |
| 8-iso-(15R)Prostaglandin F <sub>2α</sub>                                     | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| 9α,11β-Prostaglandin F <sub>2α</sub>   | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| 9β,11α-Prostaglandin F <sub>2α</sub>   | Cayman, Ann Arbor, MI, USA                          |
| RPMI 1640 Medium   | Biochrom, Berlin                                    |
| Rotizint ecoplus   | Roth, Karlsruhe                                     |
| Schwefelsäure, konz.   | Merck, Darmstadt                                    |
| SQ-29548   | Biomol, Hamburg                                     |
| Tetramethylammoniumperoxynitrit  | Alexis, San Diego, CA, USA                          |
| <i>N, O</i> -bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid                            | Pierce, IL, USA                                     |
| L-Tyrosin  | Aldrich, Steinheim                                  |
| [2',3',5',6'- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-L-Tyrosin                        | Isotec, Miamisburg, OH, USA                         |
| Dest. Wasser (Ampuva für Spülzwecke)   | Fresenius, Bad Homburg                              |
| [ <sup>18</sup> O]-Wasser (98 % <sup>18</sup> O)                             | Isotec, Miamisburg, OH, USA                         |
| <b>Für die GC-MS verwendete Gase:</b>  |   |
| Helium (5,0), Methan (5,5) und Argon (5,0)                                   | Linde, Hannover                                     |

## Biologisches Probenmaterial, Versuchstiere

Schweinehepatozyten aus dem Oststadtkrankenhaus in Hannover von PD Dr. Bader.

Kaninchen aus der Universität Freiburg von Prof. Dr. E. Bassenge.

## Laborgeräte

### Photometer

Ultrospec II UV/Visible Spektrometer LKB Biochrom, Freiburg

### UV-VIS-Spektrometer

U-2000-Spectrophotometer Hitachi, Tokyo, Japan

### Liquid Scintillation Counter

1211 Rackbeta und Counter-Drucker LKB Wallac, Berthold, Isernhagen

### Zentrifugen:

Biofuge 15 Heraeus Sepatech, Hanau  
Kühlzentrifuge RC5C Sorvall Instruments DuPont,  
Bad Homburg  
Kühlzentrifuge K2S Hettich Universal, Tuttlingen

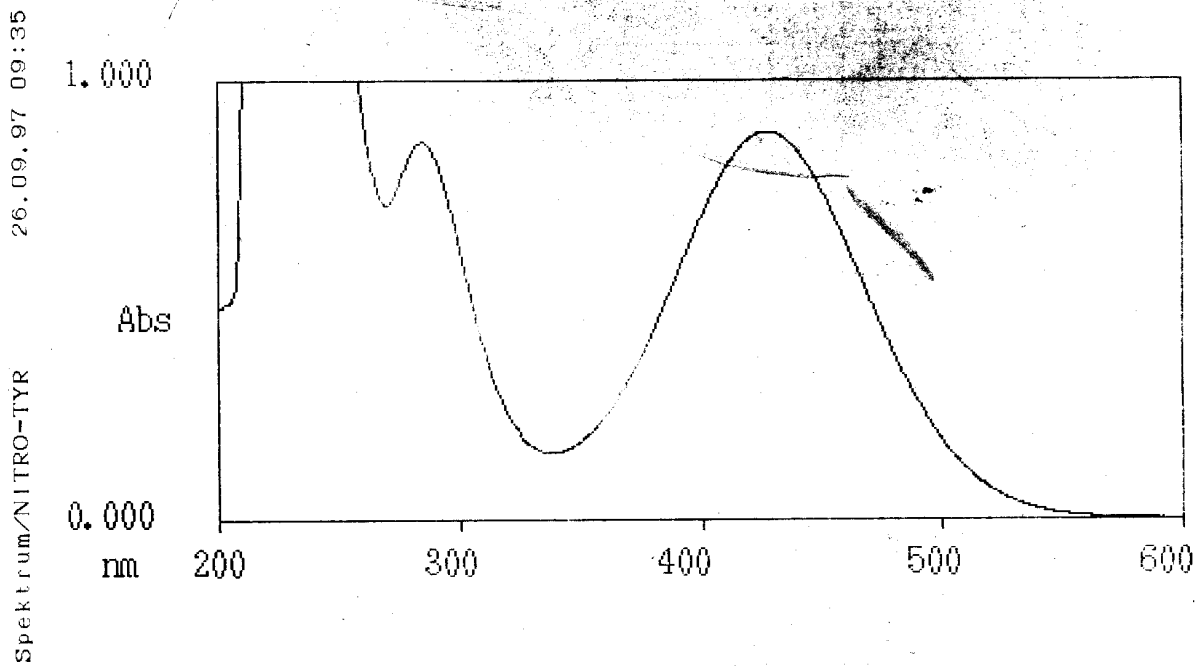
Zentrifuge CR 412 Jouan, Frankreich

## Weitere Materialien

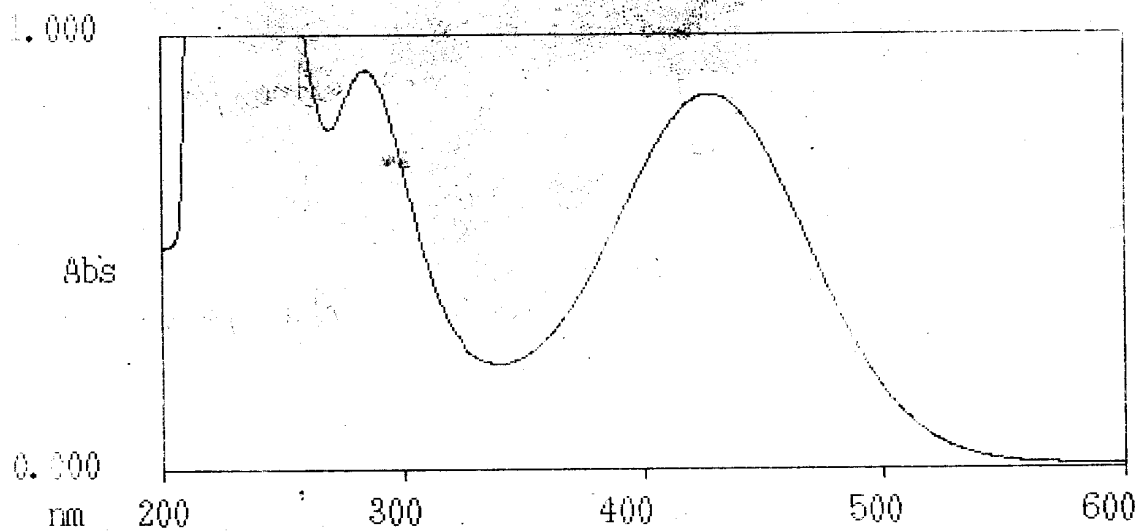
|  |   |
|--|---|
| Autosampler, Mikroeinsätze                                 | CS-Chromatographie GmbH, Langerwehn               |
| Bluecap 50ml   | Greiner, Fichtenhausen                            |
| Citrat-Monovetten, S-Monovetten 9NC, 5 ml                  | Sarstedt, Nümbrecht                               |
| EDTA-Monovetten, KE, 3 bzw. 9 ml                           | Sarstedt, Nümbrecht                               |
| Küvetten (10 x 4 x 45 mm)                                  | Sarstedt, Nümbrecht                               |
| Evaporator, TurbovapLV                                     | Zymark, Hopkinton, MA, USA                        |
| Kulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup> , 275 ml                | Corning, Cambridge, MA, USA                       |
| Magnetrührer, HI 190 M                                     | Hanna Instruments, Bedfordshire, UK               |
| Multiadapter   | Sarstedt, Nümbrecht                               |
| Pasteurpipetten  | Eppendorf, Hamburg                                |
| Polypropylenröhrchen, 10 ml, 4 ml                          | Greiner, Fichtenhausen                            |
| Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke)                          | Jürgens, Hannover                                 |
| Thermoblock, Bioblock Scientific Code 92675                | Barnstead Thermolyne Corp., Dubuque,<br>Iowa, USA |
| Thermostat 5320  | Eppendorf, Hamburg                                |
| Ultrafiltrations-Kartuschen, 20.000 Da                     | Sartorius, Göttingen                              |
| Varipetten 10,100,1000 µl                                  | Eppendorf, Hamburg                                |
| Vortexer, Reax 200   | Heidolph, Nürnberg                                |
| 6-Loch Platten 17,6x34,6 mm, 9,4 cm <sup>2</sup> , 16,8 ml | Costar, Corning, NY, USA                          |

Verwendete HPLC-, TLC- und GC-MS-Geräte werden mit den entsprechenden Methoden, in denen sie verwendet wurden, beschrieben.

## UV/vis-Spektren



200  $\mu$ M 3-Nitro-L-tyrosin in 15 mM NaOH/10 mM NaCl



ca. 200  $\mu$ M 3-Nitro-L- $[^3\text{H}_2]$ tyrosin in 15 mM NaOH/10 mM NaCl

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Schwedhelm  
Vorname: Edzard  
Anschrift: Universität Hamburg, Uni-Klinikum Eppendorf,  
Institut für Exp. u. Klin. Pharmakologie und Toxikologie,  
Martinistr. 52, 20246 Hamburg  
E-Mail: schwedhelm@stud.uni-hannover.de  
Geburtsdatum: 06. Juli 1971  
Geburtsort: Gehrden  
Familienstand: verheiratet

### **Ausbildung**

1983 - 1990 Helene-Lange-Schule, Hannover, Abitur im Juli 1990  
Nov. 1991 - Mai 1997 Universität Hannover, Studium der Chemie, Diplom im Mai 1997  
Juli 1997 - Sept. 2000 Universität Hannover, Dissertation Dez. 2000

### **Zivildienst**

Sep. 1990 - Nov. 1991 Kinderhort Wilhelm-Blum-Staße, Caritas Verband, Hannover

### **Nebenberufliche Tätigkeit**

1993 - 1996 Nachtwache im Wohnheim Liebigstaße der Gemeinschaft Geistig Behinderter e.V., Langenhagen

---

## Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

1. Tsikas, D., Schwedhelm, E., Gutzki, F.-M., Jahn, O., Fakistas, P., Frölich, J.C. Enzymatic synthesis of dioxygen-18 labeled 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and its use in quantitative GC-tandem MS. *J. Lab. Compds. Radiopharm.* (1997) 39, 531-540.
2. Tsikas, D., Schwedhelm, E., Fauler, J., Gutzki, F.-M., Mayatepek, E., Frölich, J.C. Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1998) 716, 7-17.
3. Tsikas, D., Schwedhelm, E., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C. Gas chromatographic-mass spectrometric discrimination between 8-iso-prostaglandin  $E_2$  and prostaglandin  $E_2$  through derivatization by *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxyl amine. *Anal. Biochem.* (1998) 261, 230-232.
4. Schwedhelm, E., Sandmann, J., Tsikas, D. Synthesis of 3-nitro-L- $[^2H_3]$ tyrosine for use as internal standard for quantification of 3-nitrotyrosine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Lab. Compds. Radiopharm.* (1998) 41, 773-780.
5. Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Phivthong-ngam, L., Brandes, F.P., Schwedhelm, E., Böhme, M., Tsikas, D., Frölich, J.C. Dietary L-arginine and  $\alpha$ -tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis* (1998) 141, 31-43.
6. Schwedhelm, E., Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C. Gas chromatographic tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosin in human plasma at the basal state. *Anal. Biochem.* (1999) 276, 195-203.
7. Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Sandmann, J., Schwedhelm, E., Frölich, J.C. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of human plasma and urinary nitrate after its reduction to nitrite and derivatization to the pentafluorobenzyl derivative. *J. Chromatogr. B* (1999) 731, 285-91.
8. Schwedhelm, E., Tsikas, D., Durand, T., Gutzki, F.-M., Guy, A., Rossi, J.-C., Frölich, J.C. Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in human urine. *J. Chromatogr. B* (2000) 744, 99-112.
9. Troost, R., Schwedhelm, E., Rojczyk, S., Tsikas, D., Frölich, J.C. Nebivolol decreases systemic oxidative stress in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2000) 50, 377-379.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit nicht schon als Diplomarbeit oder in anderer Form veröffentlicht wurde und dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hannover, den 14.12.2000