

# Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Untersuchung des Aminosäure- und Acylcarnitinstoffwechsels

Kumulative Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor Medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Romy Brauer  
geboren am 03.09.1984 in Leipzig

angefertigt am  
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik (ILM)  
der Universität Leipzig  
(Direktor Prof. Dr. med. Joachim Thiery)

Betreuer  
Priv. Doz. Dr. rer. nat. habil. Uta Ceglarek  
Prof. Dr. med. Joachim Thiery

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: *17.07.2012*

---

<b>Bibliographische Beschreibung</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einführung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Metaboliteprofiling des Aminosäure- und Acylcarnitinstoffwechsels .....	4
1.1.1 Metabolomics .....	4
1.1.2 Aminosäuren .....	5
1.1.3 Acylcarnitine .....	9
1.1.4 Rolle von Aminosäuren und Acylcarnitinen im Energiestoffwechsel .....	12
1.2 Labormedizinische Präanalytik .....	15
1.3 Massenspektrometrische Analytik von Aminosäuren und Acylcarnitinen .....	15
1.4 Ziele der Arbeit .....	18
<b>2. Publikation</b> .....	<b>19</b>
2.1 Indroduction .....	20
2.2 Materials and methods .....	21
2.3 Results and discussion .....	22
2.4 Conclusions .....	25
2.5 References .....	27
<b>3. Zusammenfassung</b> .....	<b>29</b>
<b>4. Anlagen</b> .....	<b>34</b>
4.1 Literaturverzeichnis .....	34
4.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole .....	39
4.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	40
4.4 Erklärung über die eigenständige Anfertigung der Arbeit .....	41
4.5 Curriculum vitae.....	42
4.6 Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics .....	44
4.7 Danksagung .....	50
<b>5. Supplement</b> .....	<b>51</b>

## Bibliographische Beschreibung

Brauer, Romy

### **Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Untersuchung des Aminosäure- und Acylcarnitinstoffwechsels**

Universität Leipzig, Dissertation

50 Seiten Textteil, 73 Literaturstellen, 12 Abbildungen, 2 Tabellen, 35 Seiten Supplement

#### **Referat:**

Quantitative Untersuchungen krankheitsspezifischer oder krankheitsassoziierter metabolischer Signaturen in humanen Körperflüssigkeiten („*Clinical Metabolomics*“) haben zum Ziel neue Ansätze für diagnostische oder therapeutische Konzepte zu entwickeln. Die simultane quantitative Analytik von Aminosäuren (AS) und Acylcarnitinen (AC) mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ermöglicht die Erfassung wichtiger Stoffwechselwege des humanen Metabolismus. Hierzu zählen der Stoffwechsel der ketogenen AS, des Harnstoffzyklus oder der  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren. Allerdings wird die Konzentration der verschiedenen metabolischen Parameter in humanen Körperflüssigkeiten durch eine Vielzahl präanalytischer *in vitro* Störfaktoren und *in vivo* Einflussgrößen beeinflusst. Diese können zu signifikanten Veränderungen der Laborergebnisse führen. Im Rahmen meiner Promotionsarbeit wurden *in vitro* Störfaktoren (Probenmaterial, Lagerung u. a.) und *in vivo* Einflussgrößen (Ernährung, physische Aktivität) untersucht und ein standardisiertes Präanalytik-Protokoll entwickelt. Dazu wurden pro Probe 3  $\mu$ L Trockenblut (TB), 10  $\mu$ L Serum oder Plasma nach Butylierung mittels Elektrospray-Ionisations-MS/MS analysiert und jeweils 26 AS und 35 AC in 1,5 Minuten simultan bestimmt.

Als Ergebnis der zahlreichen systematischen Präanalytik-Untersuchungen konnten signifikante Konzentrationsunterschiede der Metabolite zwischen kapillärer und venöser Blutentnahme sowie in Abhängigkeit des Hämatokrits gefunden werden. Im Vergleich zu Serum und antikoagulierte Plasma (EDTA, Citrat, Heparin) waren die Konzentrationen der langkettigen AC im TB 5-fach höher. Nahrungsaufnahme und körperliche Aktivität führten ebenfalls zu signifikanten Veränderungen der AS- und AC-Konzentrationen. Durch Optimierung des Probenaufarbeitungsprotokolls konnte die Variabilität zwischen den Messtagen für 17 AS und 6 AC auf  $< 20\%$  gesenkt werden.

Die Ergebnisse meiner Promotionsarbeit unterstreichen den Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Metabolomanalytik. Durch Etablierung und Einhaltung standardisierter präanalytischer Protokolle kann die präanalytische Varianz der Ergebnisse deutlich verringert werden. Sie stellen somit eine wichtige Voraussetzung für eine qualitativ hochwertige Metabolomanalytik im Rahmen klinischer Studien zur Identifizierung neuer Biomarker dar.

# 1. Einführung

## 1.1 Metaboliteprofiling des Aminosäure- und Acylcarnitinstoffwechsels

### 1.1.1 Metabolomics

Metaboliten sind kleine Moleküle (small molecules) mit einem Molekulargewicht bis 1500 Da<sup>1-3</sup> (z. B. Kohlenhydrate, Fette, Aminosäuren), die durch zahlreiche physikalische und chemische Eigenschaften (z.B. Polarität, Flüchtigkeit und Löslichkeit) charakterisiert sind<sup>1,4</sup>. Die Untersuchung von Metaboliten, Metabolitenklassen oder metabolischen Netzwerken wird als „*Metabolomics*“ bezeichnet.

Das „*Metabolomics*“-Konzept hat sich komplementär zu den anderen „-omics“-Wissenschaften, *Genomics* und *Proteomics*, entwickelt<sup>5</sup> (Abbildung 1). Dabei bezieht sich *Genomics* auf die Analyse der Genexpression des gesamten Genoms eines Organismus<sup>6</sup> und *Proteomics* auf die Identifikation von Proteinen mittels Separation und Quantifizierung aus biologischem Probenmaterial<sup>7</sup>. Durch Vernetzung dieser wissenschaftlichen Plattformen erhofft man sich, tiefere Einblicke in den menschlichen Stoffwechsel gewinnen zu können und dadurch neue Zusammenhänge zu verstehen.

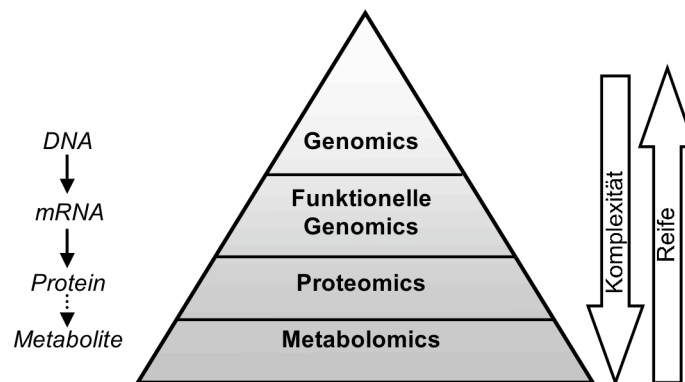


Abbildung 1: Genomics, Proteomics und Metabolomics<sup>8</sup>

Die Quantifizierung von Metaboliten gewinnt immer mehr an Bedeutung, da hierdurch Einblicke in molekulare Netzwerke sowie in das Zusammenspiel von Umwelteinflüssen, Ernährung und Genetik ermöglicht werden<sup>1, 9, 10</sup>. Das Ziel des „*Clinical Metabolomics*“-Konzeptes ist es, krankheitsspezifische oder krankheitsassoziierte metabolische Signaturen in Körperflüssigkeiten zu analysieren, um neue Ansätze für diagnostische oder therapeutische Konzepte entwickeln zu können. Durch die fortlaufende technische Weiterentwicklung innovativer analytischer Verfahren, wie beispielsweise der Massenspektrometrie (MS), ist es heute möglich, simultan in einer Analyse eine Vielzahl von Metaboliten oder gesamte



metabolische Netzwerke darzustellen. Die quantitative Analytik von Aminosäuren (AS) und Acylcarnitinen (AC) mit MS aus Trockenblut (TB) ermöglicht es, wichtige Stoffwechselwege des humanen Metabolismus, wie den der ketogenen AS, des Harnstoffzyklus oder der  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren, abzubilden, die bisher diagnostisch beschränkt oder gar nicht zugänglich waren.

## 1.1.2 Aminosäuren

### Allgemeine Eigenschaften

Aminosäuren sind organische Verbindungen, die aus mindestens einer Carboxyl- (-COOH) und einer Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>) bestehen (Abbildung 2). Bei  $\alpha$ -AS befindet sich die Aminogruppe wie auch die Carboxylgruppe am C-2-Atom, bei  $\beta$ -AS am C-3-Atom, bei  $\gamma$ -AS am C-4-Atom. Alle proteinogenen AS (Tabelle 1) sind  $\alpha$ -AS<sup>11</sup>.

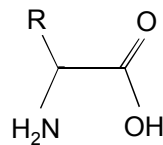


Abbildung 2: Struktur von  $\alpha$ -Aminosäuren

Aminosäuren können anhand der körpereigenen Synthesefähigkeit in essentiell und nicht-essentiell unterteilt werden<sup>12</sup> (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der proteinogenen und nicht-proteinogenen MS/MS-gemessenen Aminosäuren

	Proteinogen			Nicht-proteinogen
	<i>Nicht-essentiell</i>	<i>Semi-essentiell</i>	<i>Essentiell</i>	
Mittels MS/MS in der vorliegenden Arbeit gemessen	Alanin	Arginin	Isoleucin	Hydroxyprolin
	Asparaginsäure	Histidin	Leucin	Pipecolinsäure
	Glutamin		Lysin	Abscisinsäure
	Glutaminsäure		Methionin	Methyl-Histidin
	Glycin		Phenylalanin	Ornithin
	Prolin		Threonin	Carnosin
	Serin		Tryptophan	Citrullin
	Tyrosin		Valin	Sarcosin
			Taurin	
	Asparagin			
	Cystein			
	Pyrrolysin			
	Selenocystein			

Essentielle AS können vom Körper nicht synthetisiert werden und müssen somit durch die Nahrung zugeführt werden. Dazu zählen die verzweigtkettigen AS (Isoleucin, Leucin, Valin) sowie Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin und Tryptophan. Semi-essentielle AS, wie Arginin und Histidin, können in bestimmten Stoffwechselsituationen, wie beispielsweise bei schweren Verletzungen oder während Wachstumsphasen, aufgrund des gesteigerten Bedarfs essentiell werden. Cystein und Tyrosin sind für Kinder essentiell, da die Enzymsysteme zur Synthese (z. B. Tyrosin aus Phenylalanin via Phenylalaninhydroxylase) noch nicht ausgereift sind. Die nicht-essentiellen AS werden durch *in vivo* Biosynthese aus den  $\alpha$ -Ketosäuren (Alanin durch die Alanin-Aminotransferase aus Pyruvat und Glutamat, Aspartat durch die Aspartat-Aminotransferase aus Oxalacetat, Glutamat durch Transaminierung einer Amino-Gruppe aus  $\alpha$ -Ketoglutarat), durch die Amid-Biosynthese (Glutamin aus Glutamat und  $\text{NH}_3$ , Aspargin aus Aspartat und Amid-Stickstoff von Glutamin) oder durch andere Biosynthesereaktionen (Prolin, Serin und Glycin) hergestellt<sup>12</sup>.

Weiterhin können AS anhand des Säure-Base-Verhaltens unterschieden werden. Lysin, Arginin und Histidin sind die basischen proteinogenen AS und können im Sinne eines Protonenakzeptors ein positiv geladenes Ion aufnehmen. Glutaminsäure und Asparaginsäure stellen die sauren proteinogenen AS dar, können als Protonendonator also ein Proton abgeben<sup>11</sup>.

Man unterscheidet weiterhin zwischen glukogenen und ketogenen AS. Bis auf Leucin und Lysin sind alle proteinogenen AS glukogen und stehen somit als Ausgangsstoff für die Gluconeogenese zur Verfügung. Weitere Besonderheiten sind die Schwefelhaltigkeit von Methionin und Cystein. Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan besitzen einen aromatischen Ring<sup>12</sup>.

Die humanen Plasmakonzentrationen der meisten AS liegen relativ konstant zwischen 20 und 200  $\mu\text{mol/L}$ . Ausnahmen bilden Alanin mit rund 350  $\mu\text{mol/L}$  und Glutamin mit etwa 700  $\mu\text{mol/L}$ . Die Leber sorgt für konstante Konzentrationen im Blut. Nach Nahrungsaufnahme werden die AS in der Leber durch Aminotransferasen ineinander umgewandelt. Außerdem findet eine exzessive Proteinbiosynthese, beispielsweise von Plasmaproteinen, statt. Mittels Harnstoffzyklus entsorgt die Leber auch den überschüssigen Stickstoff, der peripher beim AS-Abbau anfällt und durch Transaminasen auf Glutaminsäure übertragen wird. Eine Erhöhung der Transaminase-Werte kann auf eine Leberzellschädigung hinweisen. Es wird zwischen begrenzter (Alanin-Aminotransferase [ALT], v.a. im Zytosol), schwerer (Aspartat-Aminotransferase [AST], v.a. im Mitochondrium) und sehr schwerer Schädigung (Glutamatdehydrogenase, [GLDH], ausschließlich im Mitochondrium) unterschieden. Auch in den Muskelzellen läuft der Aminosäure-Metabolismus ab. Die

Muskelproteine dienen in Hungerzeiten sowie über Nacht, wenn die Glykogenreserven der Leber verbraucht sind, als Substrate für die Glukoneogenese<sup>12</sup>.

## **Aufgaben und Funktion von Aminosäuren**

### ***Protein-Biosynthese***

Proteine sind aus AS zusammengesetzte Makromoleküle. Momentan sind 22 proteinogene, also am Aufbau der Proteine beteiligte, AS bekannt (Tabelle 1). Die 21. Aminosäure, das Selenocystein, wurde 1986<sup>13</sup>, die 22. Aminosäure, Pyrrolysin, erst 2002<sup>14</sup> als proteinogen identifiziert. Eine besondere Rolle nimmt die schwefelhaltige Aminosäure Methionin in der Protein-Biosynthese ein, da sie an den Anfang eines jeden Proteins gebaut wird<sup>15</sup>. Aminosäure-Ketten, die aus weniger als 100 AS bestehen, nennt man Peptide, die aus mehr als 100 AS bestehen, Proteine<sup>12</sup>.

### ***Energiegewinnung***

Der Abbau der AS endet über Zwischenprodukte, wie Acetyl-CoA (aus Phenylalanin, Leucin, Isoleucin und Lysin) oder Pyruvat (aus Alanin), im Citratzyklus. Glukogene AS können im Rahmen der Gluconeogenese in Leber und Niere über Oxalacetat in Glukose umgewandelt werden und sind somit wichtige Vorstufen der Gluconeogenese. Die bedeutsamsten Vertreter dieser Gruppe sind Glutamin, Alanin und Aspartat. Da die C-Skelette von Leucin und Lysin nur Acetyl-CoA liefern, sind diese rein ketogen. Sie stehen somit ausschließlich der Ketonkörper-Synthese zur Verfügung und können nicht in die Gluconeogenese eingehen. Der auch unter physiologischen Umständen ablaufende Prozess der Ketonkörper-Synthese stellt eine enge Verbindung zu dem Fettsäure-Stoffwechsel her. Threonin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind sowohl glukogen als auch ketogen<sup>12</sup>.

Die verzweigtkettigen AS (branched-chain amino acids [BCAA]) Valin, Leucin und Isoleucin spielen eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung des Muskels über Acetyl-CoA. Sie passieren die Leber und werden hauptsächlich von der Muskulatur metabolisiert. Im Gegensatz zu den anderen AS, die nur in der Portalvene postprandial starke Konzentrationsanstiege zeigen, steigt bei den verzweigtkettigen AS auch die systemische Konzentration an. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die Konzentrationen der BCAA den Ernährungszustand direkt widerspiegeln. Vor allem das Leucin nimmt wichtige Funktionen im Metabolismus ein. So stellt es u. a. als ketogene AS eine Vorstufe der Ketonkörper- und Fettsäuresynthese dar und unterstützt gemeinsam mit Insulin die Insulinausschüttung des Pankreas<sup>12</sup>.

### ***Harnstoffzyklus und Entgiftung von Ammoniak***

Der Abbau der AS ist, bedingt durch die Strukturvielfalt, ein sehr komplexes Thema. Meist beginnt der Abbau mit der Transaminierung. Der entstehende Stickstoff wird über Glutamat und Aspartat in den Harnstoffzyklus eingeführt. In den vier Einzelreaktionen des Harnstoffzyklus spielen Arginin, Ornithin und Citrullin als Zwischenprodukte eine wichtige Rolle. Die Hauptaufgabe ist die Entgiftung des toxischen Ammoniaks in Form von Harnstoff für die anschließende Ausscheidung über die Niere. Meist geht die Abspaltung der Aminogruppe durch Transaminierung und der Transport im Blut mittels Alanin und Glutamin voraus. Um den Stickstoff zu entsorgen und keine toxischen Produkte wie Ammoniak entstehen zu lassen, wird er über Glutamat und Aspartat in den Harnstoffzyklus eingeführt. Der Harnstoffzyklus findet teilweise im Mitochondrium und teilweise im Zytosol von Hepatozyten statt<sup>12</sup>.

### ***Signalmoleküle***

Einige AS nehmen durch ihre Funktionen im Neurotransmitterstoffwechsel eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel des Zentralnervensystems ein. So dienen beispielsweise Glutaminsäure<sup>16</sup> (exzitatorisch) und Glycin<sup>17</sup> (inhibitorisch) als Transmitter. Tyrosin<sup>18</sup> und Tryptophan<sup>19</sup> sind Transmitter-Vorstufen.

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül im menschlichen Organismus ist das Stickstoffmonoxid (NO), das mittels NO-Synthase (NOS) aus Arginin gebildet wird<sup>20</sup>. Der potente endotheliale Vasodilatator NO reguliert vor allem die Weite von Blutgefäßen, dient aber ebenfalls als Neurotransmitter<sup>21</sup>. Die exogene Arginin-Bereitstellung erhöht die NO-Produktion. Paradoxerweise musste allerdings die größte kontrollierte Studie zur oralen Arginin-Nahrungsergänzung nach Myokardinfarkt aufgrund von Mortalitätsanstieg abgebrochen werden<sup>22</sup>. Arginin ist die einzige Quelle für die NOS. Die NO-Bioverfügbarkeit spielt bei endothelialer Dysfunktion und daraus folgend bei kardiovaskulären Krankheiten eine Rolle. Es wurde gezeigt, dass die Arginin-Bioverfügbarkeit und der Arginin-Ornithin-Quotient mit Markern der endothelialen Dysfunktion assoziiert sind. Außerdem erhöhten sie das Risiko für kardiovaskuläre Mortalität<sup>23</sup>. Arginin als Nahrungsergänzungsmittel zeigte sich als effektiv in der Bekämpfung von infizierten Wunddehiszenzen nach Operationen<sup>24</sup>. Außerdem verbesserte Arginin bei pulmonaler Hypertension, verursacht durch pulmonale Embolien, die Symptome (Kurzatmigkeit, Abgeschlagenheit), die Herzinsuffizienz und die Belastbarkeit<sup>25</sup>. Im Gehirn wird Arginin durch die neuronale NOS zu NO und Citrullin verstoffwechselt. Untersuchungen zeigten zudem, dass ein Zusammenhang zwischen Arginin und Depressionen besteht<sup>26</sup>.

### 1.1.3 Acylcarnitine

#### Allgemeine Eigenschaften

Acylcarnitine sind Verbindungen aus Carnitin und Fettsäuren (FS). Carnitin wird mit der Nahrung aufgenommen oder aus den essentiellen Aminosäuren Lysin und Methionin synthetisiert<sup>27</sup>. In Abbildung 3 ist die Struktur von AC schematisch dargestellt.

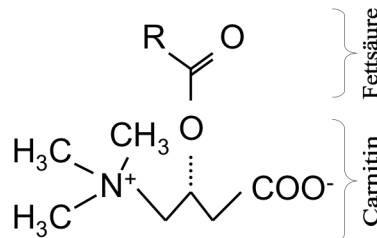


Abbildung 3: Struktur von Acylcarnitinen

Die Kopplung der FS an das Carnitin dient dem Transport der FS in die Mitochondrien, wo sie dann der Energiegewinnung via  $\beta$ -Oxidation zur Verfügung stehen<sup>28</sup>. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten AC.

Tabelle 2: Übersicht von Acylcarnitinen, die im Rahmen der Arbeit mit MS/MS quantifiziert wurden

Gesättigte FS				Ungesättigte FS	
C0	Carnitin	C3DC	Malonylcarnitin	C5:1	Tiglylcarnitin
C2	Acetylcarnitin	C4-OH	Hydroxy-Butyrylcarnitin	C8:1	Octenoylcarnitin
C3	Propionylcarnitin	C5-OH	Hydroxy-Isovalerylcarnitin	C10:1	Decenoylcarnitin
C4	Butyrylcarnitin	C6DC	Adipylcarnitin	C14:1	Tetradecenoylcarnitin
C5	Isovalerylcarnitin	MMA	Methylmalonylcarnitin	C16:1	Hexadecenoylcarnitin
C6	Hexanoylcarnitin	Glut	Glutarylcarntin	C16:1OH	Hydroxy-Hexadecenoylcarnitin
C8	Octanoylcarnitin	MeGlut	Methylglutarylcarntin	C18:1	Octadecenoylcarnitin
C10	Decanoylcarnitin	C14OH	Hydroxy-Tetradecenoylcarnitin	C18:1OH	Hydroxy-Octadec-1-enoylcarnitin
C12	Dodecanoylcarnitin	C16OH	Hydroxy-Hexadecenoylcarnitin	C18:2OH	Hydroxy-Octadec-2-enoylcarnitin
C14	Myristoylcarnitin	C18OH	Hydroxy-Octadecenoylcarnitin	C18:2	Octadecadiencarnitin
C16	Palmitoylcarnitin			C20:1	Eicosaencarnitin
C18	Stearoylcarnitin			C20:2	Eicosadiencarnitin
				C20:3	Eicosatriencarnitin

FS bestehen aus einer Carboxylgruppe (-COOH) und einer Kohlenwasserstoffkette und werden anhand ihrer Länge eingeteilt. FS mit bis zu 7 Kohlenstoffatomen nennt man kurzkettig, mit 8 bis 12 Kohlenstoffatomen mittelkettig, mit 13 bis 22 Kohlenstoffatomen langkettig und FS mit über 22 Kohlenstoffatomen werden als überlangkettig bezeichnet. Die

Speicherung der FS im Fettgewebe erfolgt als Triglyceride, die bei Bedarf freigesetzt werden und der Energiegewinnung mittels  $\beta$ -Oxidation zugeführt werden können. Triglyceride mit langkettigen FS (long chain triglycerides [LCT]) werden im Darm langsamer gespalten als Triglyceride mit mittelkettigen FS (medium chain triglycerides [MCT]). LCT werden an Chylomikronen über die Lymphe zur Leber transportiert. MCT hingegen erreichen die Leber direkt über die Vena portae<sup>29</sup>.

FS werden als gesättigt bezeichnet, wenn alle Bindungsstellen durch Wasserstoffatome besetzt sind. Gesättigte FS kommen vor allem in tierischen Fetten vor und werden schneller als ungesättigte FS gespeichert. Ungesättigte FS enthalten Doppelbindungen und haben offene Bindungsstellen. Sie besitzen einen niedrigeren Schmelzpunkt und liegen im Gegensatz zu gesättigten FS meist flüssig vor. Abbildung 4 zeigt exemplarisch Dodecansäure als gesättigte FS und Octadecaensäure als ungesättigte FS. Nach Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung sollte die tägliche Aufnahme zu maximal 10 % aus gesättigten FS, zu 12 % aus einfach ungesättigten FS und zu etwa 8 % aus mehrfach ungesättigten FS, also Fettsäuren mit mehr als einer Doppelbindung, bestehen<sup>30</sup>.

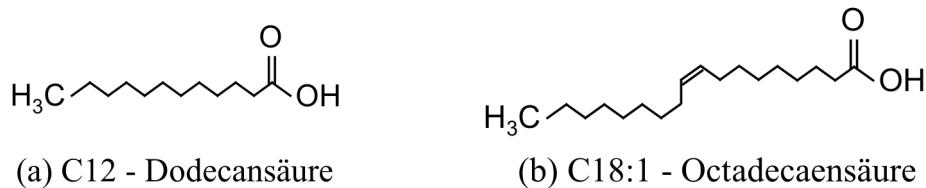


Abbildung 4: Strukturformel einer (a) gesättigten und (b) ungesättigten Fettsäuren

Analog zu den AS werden die FS in essentielle und nicht-essentielle FS unterteilt. Essentielle FS, die mindestens eine Doppelbindung jenseits des 9. C-Atoms enthalten, müssen mit der Nahrung aufgenommen werden, da der Körper sie nicht selber synthetisieren kann<sup>29</sup>.

### Carnitinstoffwechsel

Das wasserlösliche Carnitin wurde 1905 von Gulewitsch und Krimberg entdeckt. Alle Gewebe, die durch Fettsäuren Energie gewinnen, benötigen Carnitin, da es eine Schlüsselrolle im Transport von aktivierten langkettigen FS vom Zytosol in die Mitochondrienmatrix einnimmt. In den Mitochondrien laufen dann die Prozesse der  $\beta$ -Oxidation, des Citratzyklus und der Atmungskette (diese in der inneren Mitochondrienmembran) zur Energiegewinnung aus FS ab. Allerdings können die im Blut freien langkettigen Fettsäuren nicht in ihrer ursprünglichen Form durch die innere Mitochondrienmembran gelangen. Dazu müssen sie zunächst unter ATP-Verbrauch mit dem Co-Enzym A zu Acyl-CoA, einer sog. aktivierten Fettsäure, verestert werden. Im nächsten Schritt wird die aktivierte Fettsäure durch das Enzym

Carnitin-Acyltransferase I an Carnitin gebunden und kann somit durch die äußere Mitochondrienmembran transportiert werden. Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase transportiert die AC weiter durch den Intermembranraum. An der inneren Mitochondrienmembran wird das Carnitin an der FS durch die Carnitin-Acyltransferase II wieder durch das Co-Enzym A ersetzt. Die damit wieder aktivierte FS (Acyl-CoA) kann zur Energiegewinnung in die  $\beta$ -Oxidation eintreten. Das anfallende Acetyl-CoA kann außerdem als Baustein für Ketonkörper, Fettsäuren oder Cholesterol dienen<sup>31</sup>. Der beschriebene Transport der FS ins Mitochondrium, das Carnitin-Shuttle-System, ist in Abbildung 5 dargestellt<sup>28, 32-36</sup>.

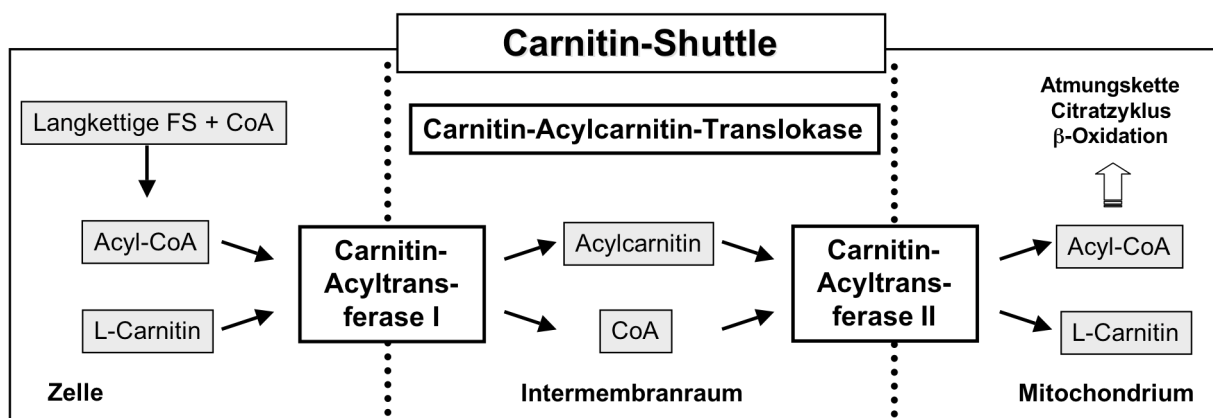


Abbildung 5: Mitochondrialer Transport der Fettsäuren<sup>37</sup>

Es sind drei Carnitin-Acyltransferasen mit unterschiedlichen Spezifitäten für die speziellen Kettenlängen der Substrate bekannt. Die Carnitin-Acetyltransferase (CAT) transportiert kurzkettige AC, die Carnitin-Oktanyltransferase (COT) mittelkettige AC und Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) langkettige AC in die Mitochondrien<sup>38, 39</sup>. Im Gegensatz zu langkettigen FS können mittelkettige FS auch unabhängig von fettsäurebindenden Proteinen in die Mitochondrien aufgenommen werden.

Die Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPT I) spielt eine Schlüsselrolle im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, da sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der  $\beta$ -Oxidation katalysiert. Durch Malonyl-CoA, ein Zwischenprodukt der Fettsäurebiosynthese, wird die CPT I gehemmt, sodass Fettsäureauf- und -abbau nicht gleichzeitig stattfinden<sup>28, 40</sup>.

Mehr als 90% des Carnitins ist im Skelettmuskel gespeichert<sup>27, 35</sup>. Hingegen liegt weniger als 1% des Carnitins im Plasma vor<sup>41-43</sup>. Die ausgewogene Carnitinhomöostase in verschiedenen Körpergeweben wird durch Membrantransporter, wie den Organic Cation Transporter, gesteuert<sup>44</sup>. Bei angeborenen oder erworbenen Defekten dieser Transporter entsteht ein primärer oder sekundärer systemischer Carnitinmangel<sup>45</sup>.

### **Mitochondriale $\beta$ -Oxidation der langkettigen Fettsäuren**

Die  $\beta$ -Oxidation, der biochemische Abbauweg der FS, wurde Anfang des 19. Jahrhunderts von Knoop und Dakin entdeckt<sup>46</sup>. Sie besteht aus vier Teilreaktionen, deren katalysierende Enzyme in dem mitochondrialen Matrixraum lokalisiert sind. Ungesättigte FS müssen vor dem Eintritt in die  $\beta$ -Oxidation in die richtige Konfiguration gebracht werden. Die generell reaktionsträgen Fettsäuren werden zunächst unter ATP-Verbrauch zu Acyl-CoA aktiviert. Das dazu benötigte Enzym Acyl-CoA-Synthase befindet sich sowohl intra- als auch extramitochondrial. Im Zuge der  $\beta$ -Oxidation entsteht aus Acyl-CoA Acetyl-CoA und ein um zwei C-Atome kürzeres Acyl-CoA, das anschließend erneut die  $\beta$ -Oxidation durchlaufen kann. Beim Abbau geradzahliger FS entstehen im letzten Reaktionsschritt zwei Acetyl-CoA, die über den Citratzyklus und die Atmungskette der Energiegewinnung zugeführt werden. Beim Abbau ungeradzahliger FS, die natürlicherweise viel seltener vorkommen, entsteht hingegen beim letzten Reaktionsschritt Acetyl-CoA sowie ein aus drei C-Atomen bestehendes Propionyl-CoA. Dieses wird zu Succinyl-CoA metabolisiert und anschließend auch über den Citratzyklus abgebaut<sup>37</sup>.

### **Entgiftung kurzkettiger organischer Säuren**

Carnitin trägt, neben dem Transport langkettiger, aktivierter Fettsäuren vom Zytosol zum Mitochondrium, im Falle eines übermäßigen Anstieges der freien FS zur Entgiftung bei, indem es kurzkettige organische Säuren, wie bspw. Milchsäure (Laktat und  $H^+$ ), Essigsäure (Acetat und  $H^+$ ) oder Zitronensäure (Citrat und  $H^+$ ), aus dem Mitochondrium entfernt<sup>33, 35, 36</sup>. Das ist insofern wichtig, da die Kapazität des Citratzyklus begrenzt ist. Das überschüssige Acetyl-CoA wird im Organismus dann zur Produktion von Ketonkörpern verwendet (Acetoacetat, Aceton und Hydroxybutyrat)<sup>47</sup>. Zusätzlich dient das Carnitin in Form von Acetylcarnitin als Energie-Depot, falls es zu einem vorübergehenden Ungleichgewicht kommt. Als Acetylcarnitin kann die Acetyl-Gruppe aus der Zelle transportiert werden<sup>33</sup>.

#### **1.1.4 Rolle von Aminosäuren und Acylcarnitinen im Energiestoffwechsel**

Es bestehen zahlreiche Beziehungen zwischen Aminosäure-, Fettsäure- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Auf einzelne soll im Folgenden beispielhaft eingegangen werden.

Eine zentrale Rolle im Stoffwechsel nimmt das Acetyl-CoA ein. Es kann aus AS, FS, Glukose (durch Pyruvat) und Ketonkörpern gebildet werden. Unter physiologischen Bedingungen wird das in der  $\beta$ -Oxidation gebildete Acetyl-CoA im Citratzyklus und der Atmungskette weiter



verstoffwechselt, wodurch der Energiebedarf der Zelle sichergestellt wird. Wie in Abbildung 6 dargestellt, ist Acetyl-CoA auch Vorstufe der Synthese von FS, Phospholipiden, Eicosanoiden, Cholesterol und Ketonkörpern.

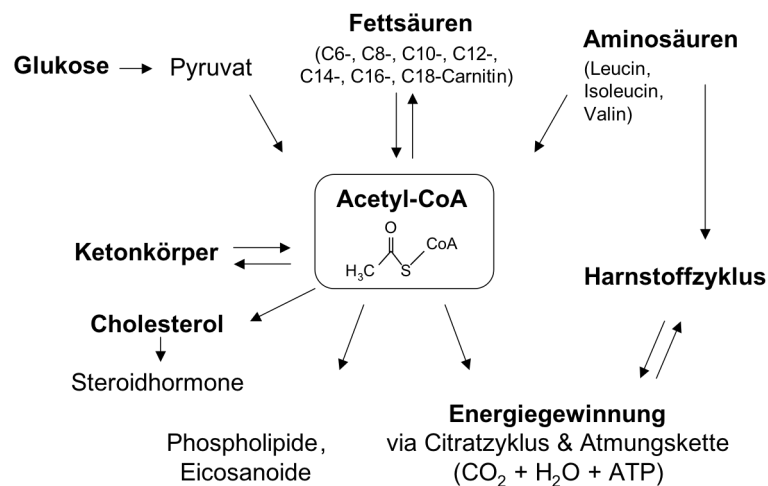


Abbildung 6: Stoffwechselwege des Acetyl-CoA

Der Citratzyklus, nach seinem Entdecker auch als Krebs-Zyklus bezeichnet, dient dem Abbau organischer Stoffe mit dem Ziel der Energiegewinnung. Dabei ist er der verbindende Endpfad des Aminosäure-, Fettsäure- und Kohlenhydrat-Katabolismus, in dem das Zwischenprodukt Acetyl-CoA zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut wird. Bei diesem Prozess entstehen sowohl wichtige Stoffwechselzwischenprodukte, als auch direkte (GTP) und indirekte ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ) Energie, die in der anschließenden Atmungskette zu ATP umgewandelt wird.

Darüber hinaus sind sowohl die Stoffwechselwege der verzweigt-kettigen AS, das Carnitin-Shuttle-System und die  $\beta$ -Oxidation der FS in den Energiehaushalt und die Produktion von Energie involviert. Die Untersuchung von lebensstil-assoziierten Veränderungen dieser Stoffwechselwege ist besonders bei Erkrankungen wie Diabetes Mellitus oder dem Metabolischen Syndrom von großem Interesse<sup>48, 49</sup>.

Ein weiteres Zusammenspiel von AS und AC wird bei der Carnitin-Synthese deutlich. Diese erfolgt über mehrere Zwischenschritte in verschiedenen Geweben aus den beiden Aminosäuren Lysin (Grundgerüst) und Methionin (Methylgruppe). Die Synthese deckt allerdings nur einen geringen Teil des Bedarfs, weshalb über 75% der Gesamtkonzentration an Carnitin im Körper durch die Nahrung zugeführt werden muss<sup>36</sup>. Sowohl der intrazelluläre als auch der Transport zwischen den einzelnen Organen spielen für die Aufrechterhaltung der Carnitinhomöostase im Körper eine entscheidende Rolle<sup>50</sup>.

### Aerobe und anaerobe Energiegewinnung

Unter aeroben Bedingungen bezieht der Muskel seine Energie ausschließlich aus der Oxidation von Sauerstoff. Wenn der Körper allerdings mehr Energie benötigt, als auf diesem Wege bereitzustellen ist, geht er in den so genannten anaeroben Stoffwechsel über. Diese Schwelle ist individuell sehr unterschiedlich und kann durch Training beeinflusst werden<sup>51,52</sup>. Da der Muskel das aus der Glykolyse anfallende Pyruvat unter anaeroben Bedingungen nicht weiter verstoffwechseln kann, weil nicht genügend Sauerstoff zur Verfügung steht, entstehen vermehrt Laktat und Alanin, was sich durch Metaboliteprofiling via MS/MS-Analytik darstellen lässt. Über das Blut erfolgt ihr Transport zur Leber, wo beide Metabolite über Gluconeogenese wieder in Glukose umgewandelt werden und somit der Muskulatur erneut zur Verfügung stehen (Abbildung 7)<sup>53,54</sup>.

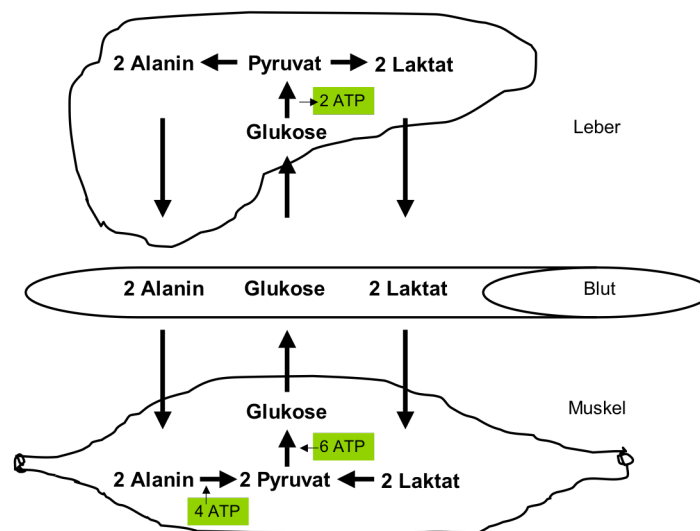


Abbildung 7: Alanin-Glukose-Zyklus<sup>12, 53, 54</sup>

Auch Glutamin ist ein glukogener Ausgangsstoff und somit zur Gluconeogenese fähig. Aus Glutamin kann der Prozess sowohl in der Leber, als auch in den Nieren stattfinden<sup>55</sup>.

Verschiedene Studien zeigen, dass unter anaerober Belastung ausschließlich die Konzentration von Acetylcarnitin (C2) im Blut ansteigt, da es durch den Sauerstoff-Mangel via Citratzyklus und Atmungskette vermutlich nicht schnell genug abgebaut werden kann<sup>56,57</sup>. Die anaerobe Energiegewinnung ist nur wenige Minuten möglich, da der Körper eine Sauerstoffschuld eingeht, die wieder ausgeglichen werden muss. Zudem entsteht eine Azidose (Übersäuerung). Durch die daraus resultierende Hemmung der Enzymsysteme wird einem weiteren Abfall des Blut-pH-Wertes entgegengewirkt.

## 1.2 Labormedizinische Präanalytik

Die Analytik humaner Körperflüssigkeiten ist bedingt durch ihre enorme präanalytische Variabilität eine Herausforderung. Wie in Abbildung 8 dargestellt, unterscheidet man im Bereich der Präanalytik zwischen Störfaktoren und Einflussgrößen (EG). Störfaktoren treten *in vitro*, also außerhalb des lebenden Organismus, auf und beinhalten beispielsweise das Probenmaterial, den Ort der Blutentnahme oder die Trockenzeit des Filterpapiers. Die *in vivo*, also im lebendigen Organismus, auftretenden EG hingegen werden weiter in veränderlich und unveränderlich unterschieden. Besonders die unveränderlichen EG Alter, Geschlecht und Genetik sowie die veränderlichen EG Lebensstil, Ernährung und körperliche Aktivität üben einen großen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse von Metaboliten aus<sup>58</sup>. Auch der Hämatokrit ist eine zusätzliche Variable, die Unsicherheit in die Messung von AS und AC bringt<sup>59</sup>.

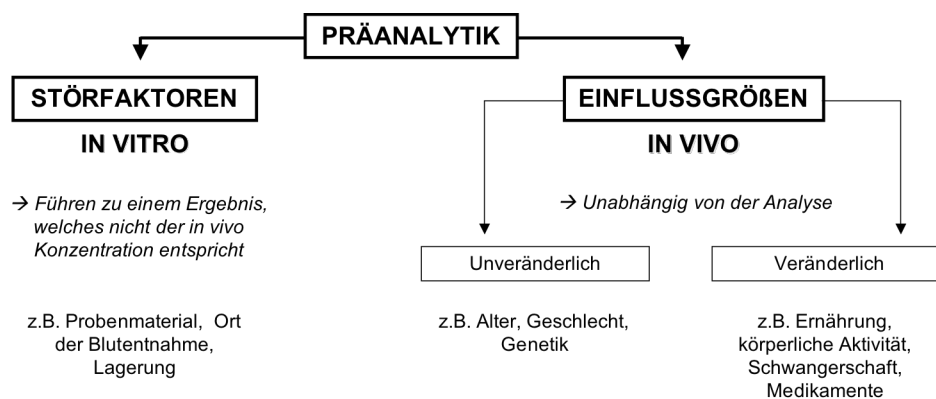


Abbildung 8: Systematik der Präanalytik<sup>57</sup>

Die Standardisierung der präanalytischen Faktoren ist somit Voraussetzung, um eine zuverlässige Analytik von humanen Körperflüssigkeiten in geplanten Studien zu gewährleisten<sup>60, 61</sup>.

## 1.3 Massenspektrometrische Analytik von Aminosäuren und Acylcarnitinen

Die Analytik von AS und AC erfolgt mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Das Ziel der Massenspektrometrie besteht darin, mittels Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) von Molekülen, Substanzen zu identifizieren und zu quantifizieren. Der Probeneinlass erfolgt bei der angewandten Methode direkt, ohne chromatographische Trennung. Man spricht von Flow-Injection-Analysis (FIA). Es schließt sich der Ionisierungsvorgang an. Die Ionisierung der eingelassenen Probe ist ein elementarer

Bestandteil der MS, da sich die zu analysierenden Moleküle nur ionisiert und durch Anlegen einer Spannung im Massenspektrometer beeinflussen lassen. Als Ionisierungsmethode wird die Elektrospray-Ionisation (ESI) angewandt. Dies ist eine weiche und somit schonende Ionisationstechnik, bei der Lösungen geladener oder polarer Substanzen, wie beispielsweise AS und AC, kontinuierlich durch eine Kapillare versprüht werden. Da im Analysator des Massenspektrometers ein Hochvakuum besteht, ist es nötig, das Aerosol, also die im Lösungsmittel gelöste Probe, vor dem Eintritt in das Vakuum durch elektrische Kräfte und hohe Temperaturen in den gasförmigen Aggregatzustand zu überführen. Dabei verdampft das Lösungsmittel und die Tröpfchen schrumpfen. Die Ladungsdichte erhöht sich, bis die Tröpfchen zu sog. Mikrotröpfchen zerplatzen. Das wird als Coulomb-Explosion bezeichnet<sup>62</sup>. Bei der MS/MS werden zwei Massenanalytoren über eine Kollisionszelle verbunden, was zu einer erhöhten Selektivität und Sensitivität führt (Abbildung 9).

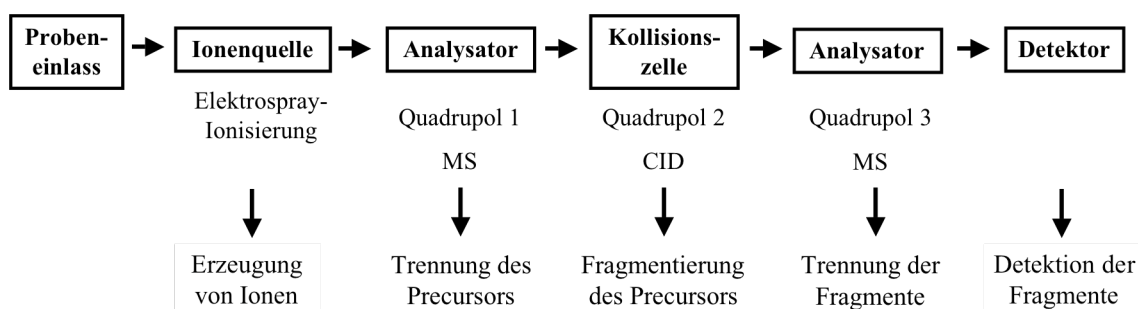
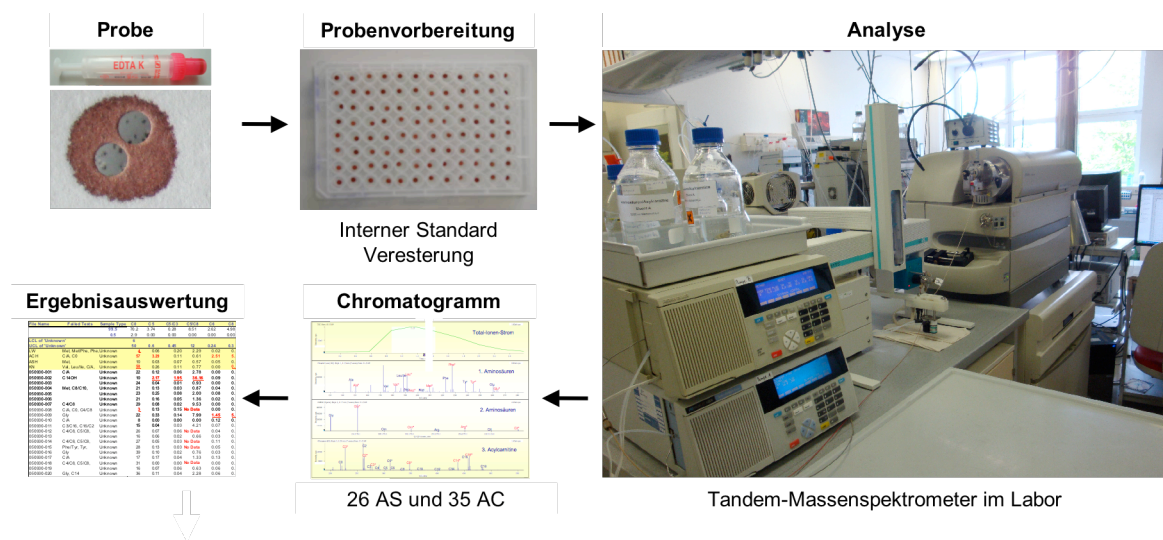


Abbildung 9: Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers

In den Analysatoren werden die geladenen Ionen proportional zu dem  $m/z$  aufgetrennt. Als Analysatoren werden Quadrupol-Massenspektrometer verwendet. Diese bestehen aus vier quadratisch angeordneten, parallelen Metallstäben. An den diagonal gegenüberliegenden Stäben wird eine Gleichspannung mit gleicher Polarität angelegt. Die nebeneinander liegenden Stäbe sind somit gegensätzlich gepolt. Durch gleichzeitige Anlage einer Wechsellspannung im Hochfrequenzbereich durchfliegen die erzeugten Ionen in stabilen oszillierenden Bahnen den Analysator. Befinden sich neben den zu analysierenden Ionen auch größere oder kleinere Ionen auf der Flugbahn, so vergrößert oder verkleinert sich deren Abstand zur Mittellinie, bis sie den Einflussbereich des elektromagnetischen Feldes verlassen. Sie werden somit nicht detektiert. Die Optimierung von Frequenz und Spannung muss für jedes zu messende Ion durchgeführt werden. Im ersten Quadrupol (Q1) erfolgt die Isolierung von Vorläuferionen, sog. Precursor-Ionen. Diese werden anschließend in der Kollisionszelle (Q2), welche mit einem Inertgas (Stickstoff oder Argon) gefüllt ist, fragmentiert. Im dritten Quadrupol (Q3) werden dann die Produktionen bestimmt. Die Ionen werden schließlich im

Detektor detektiert. Anhand der Signalintensitäten der Ionen werden mittels einer Software die Konzentrationen der Analyten berechnet. Für die Analyse der AS werden Multiple Reaction Monitoring (MRM) und Neutral Loss (NL 102) Experimente durchgeführt. Die Analyse der AC erfolgt im Precursor Ion Scan (PS 85)<sup>63</sup>. Weitere Informationen zu Molekulargewichten und Massenübergängen der Analyten sind im Supplement aufgelistet. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgt durch Verwendung isotonenmarkierter interner Standards (<sup>13</sup>C-markiert oder <sup>2</sup>H) über die Signalintensität. In 1,5 Minuten Analysezeit können simultan 26 AS und 34 AC sowie freies Carnitin bestimmt werden. Dadurch ist die MS/MS eine Spitzentechnologie, die als Hochdurchsatzmethode für große klinische Studien sehr gut geeignet ist<sup>61</sup>. Abbildung 10 zeigt zusammenfassend den gesamten Prozess der Analytik von AS und AC mittels MS/MS von der Probe bis zum Ergebnis.



**Abbildung 10: Prozessgrafik - Bestimmung von AS und AC mittels MS/MS<sup>64</sup>**

Im Zuge der Etablierung des Neugeborenen-Screenings im Jahr 2001 wurden Probenaufarbeitungsprotokolle entwickelt, um extrem erhöhte pathologische Werte für spezielle AS oder AC, die auf angeborene Stoffwechselerkrankungen hinweisen, zu detektieren<sup>64-66</sup>. Nun aber wird der Blick mehr und mehr auf die Suche nach Biomarkern, also Kenngrößen, die objektiv gemessen und ausgewertet werden, gelenkt. Diese können Indikatoren für normale biologische oder pathologische Prozesse sowie pharmakologisches Ansprechen einer therapeutischen Intervention sein<sup>67</sup>. Allerdings sind die Unterschiede zwischen physiologisch und pathologisch bei Erwachsenen durch die interindividuellen Unterschiede wie Lebensstil, Alter, Geschlecht, Gewicht bzw. Body-Mass-Index (BMI) oder Taillenumfang<sup>68</sup> fließender zu erwarten als bei Neugeborenen mit angeborener Stoffwechselstörung, was die Anforderung an die Analytik noch erhöht.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Um die komplizierten präanalytischen Einflüsse auf hochdifferenzierte Metabolom-Untersuchungen zu minimieren, sind standardisierte Protokolle für die Validität der Ergebnisse von wesentlicher Bedeutung. Ich habe mich in meiner Arbeit mit der Untersuchung und Aufklärung präanalytischer Faktoren der Metabolomanalytik mittels Tandem-Massenspektrometrie beschäftigt. Insbesondere wurde die Frage bearbeitet, wie sich Ernährungsverhalten, physische Aktivität sowie laboranalytische Parameter (Lagerung, Probenmaterial, Einfluss des Hämatokrits) auf die Qualität und Validität der Aminosäure- und Acylcarnitin-Analytik auswirken.

## **2. Publikation**

**Preanalytical standardization of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling in human blood using tandem mass spectrometry**

Romy Brauer, Alexander Leichtle, Georg Martin Fiedler, Joachim Thiery, Uta Ceglarek

IF: 3.608 (2010)

Metabolomics  
DOI 10.1007/s11306-010-0256-1

SHORT COMMUNICATION

## Preanalytical standardization of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling in human blood using tandem mass spectrometry

Romy Brauer · Alexander Benedikt Leichtle ·  
Georg Martin Fiedler · Joachim Thiery ·  
Uta Ceglarek

Received: 19 August 2010 / Accepted: 25 October 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** Quantitative metabolite profiling in biological samples has the potential to reflect physiological status and to identify disease associated disturbances in metabolic networks. However, this approach is hampered by a wide range of preanalytical variables. Hence, the aim of our study was to develop a standardized preanalytical protocol for metabolite profiling of amino acids and acylcarnitines in human blood. Amino acids and acylcarnitines were simultaneously analyzed after butylation of 3  $\mu$ L dried blood or 10  $\mu$ L whole blood, serum and anticoagulated plasma using electrospray tandem-mass spectrometry. The influence of exogenous and endogenous preanalytical variables was investigated in healthy volunteers. Different sampling materials and anticoagulants for blood taking were investigated. Concentrations of long-chain acylcarnitines were 5-fold higher in EDTA-whole blood or dried whole blood

compared to serum and anticoagulated plasma. Significant differences in amino acid concentrations were found for capillary versus venous blood taking. Fasting for 8 h before specimen collection minimized the nutritional influence. Physical activity significantly alters amino acid and short chain acylcarnitine concentrations. As a result of our pre-analytical investigation we developed a pre-treatment protocol based on EDTA whole blood dried on filter paper to reduce the preanalytical variability and facilitate reproducible quantitative metabolite profiling in clinical trials.

**Keywords** Metabolite profiling · Preanalytical standardization · Amino acids · Acylcarnitines · Dried blood

### 1 Introduction

The quantification of small molecular weight components (metabolites) of biological systems becomes more and more important to get deep insight into molecular networks and the influence of genetics, epigenetic environmental exposures, diet and behaviour (Dunn 2008; Hall 2006; Mashego et al. 2007). Clinical metabolomics is a rapidly growing area of contemporary science focussing on various disease-related metabolic effects. In large scale clinical studies standardized preanalytical protocols are necessary to minimize in vivo and in vitro variability (Bruce et al. 2008; Gika et al. 2008). Careful validation of the experimental setup and consideration of the biological variations are essential for metabolome analysis in human body fluids because actual dietary and environmental factors may significantly affect metabolite concentrations. A wide range of exogenous (e.g. sample specimen, storage conditions) and endogenous factors (e.g. physical activity,

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11306-010-0256-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Brauer · A. B. Leichtle · G. M. Fiedler · J. Thiery ·  
U. Ceglarek (✉)  
Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry  
and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig,  
Liebigstrasse 27, 04103 Leipzig, Germany  
e-mail: uta.ceglarek@medizin.uni-leipzig.de

R. Brauer  
e-mail: romy.brauer@medizin.uni-leipzig.de

A. B. Leichtle  
e-mail: alexander.leichtle@medizin.uni-leipzig.de

G. M. Fiedler  
e-mail: martin.fiedler@medizin.uni-leipzig.de

J. Thiery  
e-mail: thiery@medizin.uni-leipzig.de

Published online: 11 November 2010

 Springer



nutrition) have to be considered (Ceglarek et al. 2009; Narayanan 2000; Zivkovic et al. 2009a).

In our study we developed a standardized protocol for reproducible profiling of amino acid (AA) and acylcarnitine (AC) analysis in various human blood specimens. AAs and ACs are actually determined in worldwide screening programs for the diagnosis of inborn metabolic disorders of the amino acid and fatty acid metabolism (Arn 2007; Chace et al. 1997; Chace and Kalas 2005; Wilcken 2007; Wilcken and Wiley 2008). Sample pretreatment protocols were established with the focus on an accurate diagnosis of inborn errors, associated with a dramatic increase or decrease of specific amino acids or acylcarnitines (Ceglarek et al. 2002; De Jesus et al. 2010; Rashed et al. 1995). Beyond that, the different metabolic pathways, which could be mapped by the metabolic screening of amino acids and acylcarnitines, are modulated by a wide variety of enzyme systems. As example, the pathways of branched chain amino acids, the fatty acid beta oxidation cycle, or the carnitine shuttle system are involved in the production of energy or in energy balance (Foster 2004) and seem to be equally exciting for metabolome studies in the field of life-style associated disease as metabolic syndrome or diabetes mellitus (Jogl et al. 2004; Ronnett et al. 2005). However, for the prospective detection of commonly slighter effects of disease-related metabolic alterations, additional emphasis should be placed on the preanalytical variability of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling. Hence, the aim of this study was to establish a well-defined protocol for blood sample collection, storage, and processing procedures for precise metabolite analyses and minimization of variability of preanalytical origin. We optimized sample storage and pretreatment procedures to improve accuracy and data reproducibility. Applying the standardized protocol, we additionally investigated the influences of diet and physical activity as examples for in vivo variability on the amino acid and acylcarnitine metabolite profile.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemical and reagents

Methanol and isopropanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water (HPLC grade) was obtained from J. T. Baker (Deventer, Netherlands). AA and AC reference isotope labelled standard kits (NSK-A, NSK-B, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) were used as internal standard. 3N butanolic HCl was made in-house using 1-butanol (for spectroscopy) from Merck (Darmstadt, Germany) and acetyl chloride (p.a.) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Dried blood

controls for amino acids and acylcarnitines (Levels 1 and 2) were obtained from Chromsystems (Munich, Germany). Amino acid standards (A6407 acidic and neutral and A6282 alkaline) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Lactate was measured on the Cobas 6000 system from Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany) using capillary plasma taken with heparin-fluorid microvettes of Sarstedt (Nümbrecht, Germany).

Filter paper grade 903 was obtained from Whatman GmbH (Dassel, Germany). Multifly needle sets and polypropylene monovettes with and without anticoagulants (EDTA, citrate, and lithium-heparinate) were obtained from Sarstedt (Nümbrecht, Germany). Tubes for capillary blood taking (200 µL) were purchased by Kabe (Nümbrecht-Elsenroth, Germany). Foil-barrier ziploc bags and desiccant packets were obtained from Whatman GmbH (Dassel, Germany).

### 2.2 Study subjects

Blood samples from 5 healthy volunteers (3 female and 2 male; age range 24–34 years) were obtained by peripherally collected native and EDTA whole blood dropped on filter paper, serum, EDTA plasma, lithium-heparinate plasma, and citrate plasma.

To examine the influence of nutrition we analyzed 10 healthy volunteers (5/5 m/f, age 22–29 years, BMI 18–25) fasting >5 h, 3 h postprandial and 5 h postprandial after a standardized meal. For the investigation of physical activity, residual whole blood from lactate determinations of 15 healthy volunteers (15/0 m/f, age 17–36 years, BMI 22–29) before, directly after intense running exercise (running speed 4.5 m/s maximum for 1600 m, total 8000 m), and after a recovery phase (running speed 2.5 m/s for 1600 m) was used. All volunteers gave informed consent. The study was conducted according to the Helsinki declaration and approved by the local Ethics Committee.

### 2.3 Sample collection

Venous native and EDTA whole blood was spotted on filter paper in 40 µL portions. Samples were dried at least 3 h before processing. Dried blood spots were punched using a Multipuncher (PerkinElmer Wallac GmbH; Freiburg, Germany). Samples were analyzed in three replicates for each specimen and volunteer. For investigation of blood taking conditions (venous versus capillary blood taking) venous blood was collected in EDTA monovettes and capillary blood in 200 µL EDTA tubes with capillaries ( $n = 12$  for each material and volunteer). The influence of the hematocrit was examined by obtaining samples (hematocrit range 39.5–46.3%) of peripherally collected EDTA whole blood. We prepared 5 dilutions from 100%

EDTA whole blood to 33% EDTA whole blood ( $n = 12$  for each dilution and volunteer). Central and peripheral spots from the dropped whole blood were punched out. To evaluate the influence of the drying time, pooled EDTA whole blood was dropped on filter paper for a drying time of 3 and 24 h at room temperature and 4°C ( $n = 12$ ). To examine batch versus consecutive processing and analysis, dried EDTA whole blood was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in foil-barrier ziploc bags containing MiniPax sorbent packets until pretreatment ( $n = 10$ ).

To investigate the influence of physical activity, dried whole blood, lactate, AS and AC concentrations were measured before, at the point of maximum exercise and after the recovery phase.

#### 2.4 Sample pretreatment and analysis

A sample pretreatment protocol was used according to our formerly described procedures (Ceglarek et al. 2002). 3.0 mm diameter punches (3  $\mu\text{L}$  whole blood) of the dropped filter paper were placed into 96-well polypropylene microtiter plates. Dried blood spots were extracted with 100  $\mu\text{L}$  of a methanol solution containing isotope labelled amino acid and acylcarnitine standards for 30 min. Serum and plasma samples were diluted 1:10 with methanol. After centrifugation, 10  $\mu\text{L}$  of the supernatant was diluted with 100  $\mu\text{L}$  of the internal standard solution and placed in 96-well polypropylene microtiter plates. Samples were evaporated at  $70^{\circ}\text{C}$  for 40 min and derivatized using 60  $\mu\text{L}$  of 3N butanolic-HCL at  $65^{\circ}\text{C}$ . After evaporation the samples were reconstituted with 150  $\mu\text{L}$  of the mobile phase (1/1 v/v isopropanol/water).

An API 2000 tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Germany) using a Turbo Ion Spray Source (TIS) in combination with a HTC Pal autosampler and a PE 200 micro gradient pump was used for flow injection analysis (FIA). 25  $\mu\text{L}$  of the sample were directly injected at a flow rate of 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  in an analysis time of 1.5 min. We detected AA by a neutral loss scan of 102 in the mass range of 130–280 or multiple reaction monitoring (MRM). For AC a precursor ion scan of  $m/z$  85<sup>+</sup> was used scanning from  $m/z$  200–510 (Mueller et al. 2003). Quantitative analysis using the internal standard concentrations for 26 AA, free carnitine, and 34 AC was performed using ChemoView™ 1.4.2 (AB SCIEX, Darmstadt, Germany). In Tables 1–3 of the supplement the analytes, the detection mode, and the corresponding internal standards used for quantification are summarized (Fahy et al. 2007).

#### 2.5 Precision, accuracy and linearity

Accuracy and linearity were proven for amino acids using a methanolic amino acid standard solution at 2.5, 25 and

250  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . Within-day variability was determined by analyzing 20 dried blood quality control samples in two different concentration ranges. Between-day variability was determined by analyzing two commercial dried blood quality control samples (L1 and L2) on 20 consecutive days.

#### 2.6 Statistical analysis

SPSS17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Biometrical data are reported as means  $\pm$  2 standard deviations (SD), or medians and interquartile ranges, where appropriate. The differences of the means were compared by the *F*-test or Students *t*-test. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Method validation

The application of our mass spectrometric method enables the simultaneous detection of about 26 amino acids and 35 acylcarnitines in only 1.5 min. As shown in Table 4 of the supplement, the direct quantification via a corresponding internal standard resulted in recovery rates between 80 and 120% for alanine, citrulline, glutamic acid, glycine, methionine, phenylalanine, proline, tyrosine, lysine, arginine and ornithine. For AA without corresponding isotope labelled internal standard overestimation (e.g. histidine 338–360%), or underestimation (e.g. threonine 8–18%) were observed. The lack in accuracy reflects the different ion suppression effects of the sample matrix on the analyte and the internal standard.

However, sufficient linearity from 2.5 to 250  $\mu\text{mol}/\text{L}$  and regression coefficients  $>0.96$  was achieved for all amino acids. Additionally, variation coefficients were found in the range between 4 and 30%. Hence, the semi-quantitative analysis of AA using our mass spectrometric method is appropriate for the identification of relative concentration differences between defined study groups. Similar results were shown for free carnitine, octanoylcarnitine, and hexadecanoylcarnitine as previously published (Mueller et al. 2003). For 33 amino acids and acylcarnitines between-day variability  $<25\%$  (AA) and  $<30\%$  (AC) for 2 sets of commercial dried blood controls were determined as shown in Table 5 of the supplement.

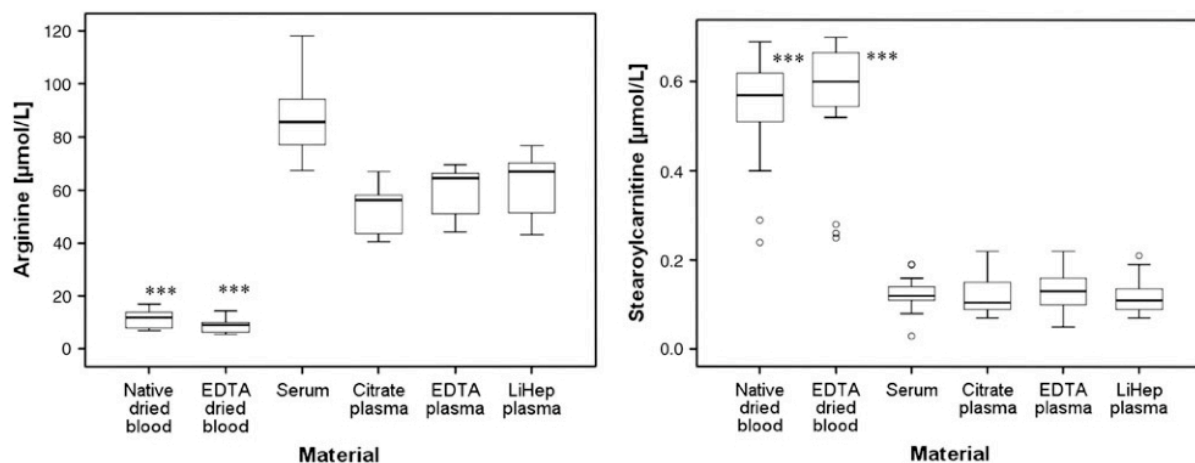
#### 3.2 Exogenous influencing factors

##### 3.2.1 Specimen collection conditions

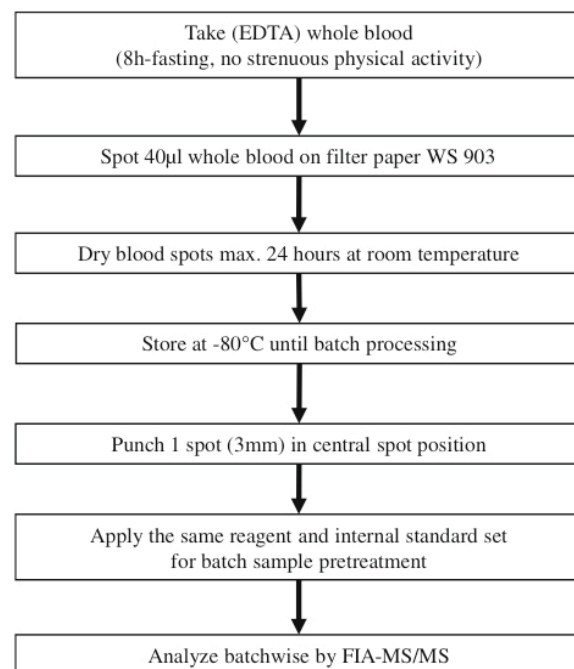
Main criteria of specimen selection for clinical studies are the availability and amount of the body fluid for sampling,

the concentration of the required analytes in the respective material, and the possibility of standardized sampling and storage. Metabolome studies were already performed using serum, plasma or urine samples (Illig et al. 2010; Lv et al. 2010; Seeger 2009; Zhao et al. 2010). However, the use of dried blood has been shown to be advantageous for large scale studies due to the easy sample management, storage and shipment (Leichtle et al. 2010; Michopoulos et al. 2010).

The comparison of dried whole blood and dried EDTA-whole blood resulted in comparable concentrations of AA and AC. In serum and anticoagulated plasma the concentrations of AA and AC (C0–C10) were 1.5–2-fold higher compared to dried whole blood, which can be explained by a lower intracellular concentration of AA in erythrocytes (Johnson and Bergeim 1951). Additionally, we obtained 10% lower concentration in plasma compared to serum. This is caused by dilution effects of the anticoagulants and its osmotic effects in the plasma samples (Fiedler and Thiery 2004). Interestingly, we detected 6–8-fold higher arginine concentrations in serum and plasma compared to dried blood (Fig. 1). It is known from literature that in erythrocytes and monocytes arginase can be released by hemolysis and could convert arginine to ornithine (Morris 2009; Omodeo-Sale et al. 2010). This may explain the low arginine concentration in dried blood samples. However, the expected increase of ornithine concentrations could not be observed. For long chain AC (C14–C18:2), which are mainly involved in the intracellular beta-oxidation, in dried blood up to 5-fold higher concentrations were found compared to serum (Fig. 1). Hence, we decided to apply native or EDTA dried whole blood in our preanalytical protocol (Fig. 2).



**Fig. 1** Differences in arginine and C18-carnitine concentrations in dried whole blood, dried EDTA-whole blood, serum, EDTA-, citrate-, and heparinate plasma ( $n = 5$ ). \*\*\*  $P < 0.001$



**Fig. 2** Standardized preanalytical protocol for blood taking and processing for the determination of amino acids and acylcarnitines in dried blood

### 3.2.2 Dried blood processing and storage

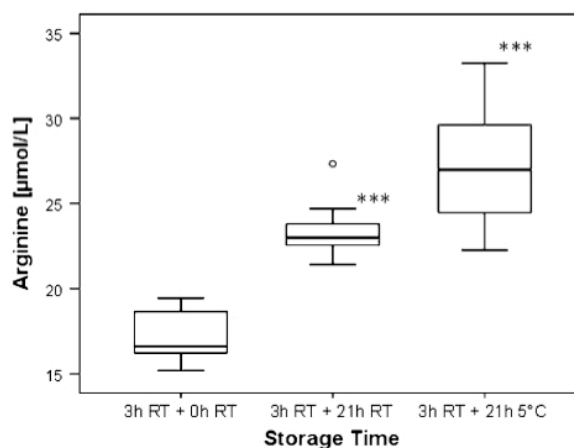
With declining hematocrit we observed a decreased concentration of AAs and ACs as described by Holub et al. (Holub et al. 2006). The hematocrit dependency of the sample volume/spot was previously shown (Leichtle et al.



2010). Furthermore, we observed an increase in the blood spot diameter with declining hematocrit. In samples with low hematocrit, levels of most AA were higher in the peripheral than in the central spot ( $P < 0.05$ ). Therefore, spots should be punched always from the centre (see protocol in Fig. 2). The influence of the hematocrit is a limitation of dried blood compared to plasma or serum processing, especially if a varying hematocrit is prevalent in the study population.

The comparison of dried EDTA-whole blood derived from venous versus capillary blood taking resulted in significant differences for ornithine (42  $\mu\text{mol/L}$  capillary versus 78  $\mu\text{mol/L}$  venous), serine (81  $\mu\text{mol/L}$  capillary versus 109  $\mu\text{mol/L}$  venous) and taurine (0.59  $\mu\text{mol/L}$  capillary versus 1.20  $\mu\text{mol/L}$  venous). These differences may reflect different metabolic conditions in the central venous and arterial capillary blood vessels. In Fig. 3 the influence of venous versus capillary blood taking on the concentration of ornithine with an individual difference between 50 and 65% is presented. As shown for free carnitine, these effects were not observed for acylcarnitines. Most AAs and ACs showed no significant concentration changes up to 24 h storage at room temperature or 5°C, respectively. Only arginine increased as shown in Fig. 4 and the concentration of ornithine, sarcosine and serine decreased significantly for both storage temperatures ( $P < 0.05$ ). Storage at  $-80^\circ\text{C}$  for 3 months revealed no significant changes of AA and AC concentration. Similar long-term storage conditions were recommended for lipids (fatty acids, phospholipids, cholesterol ester), too (Zivkovic et al. 2009b).

Daily variation in sample preparation and analysis conditions may significantly influence the variability of the results in large clinical studies. The differences of quantitative amino acid and acylcarnitine profiling results



**Fig. 4** Influence of the storage temperature and time on the arginine concentrations in dried EDTA-whole blood. RT-room temperature, \*\*\*  $P < 0.001$

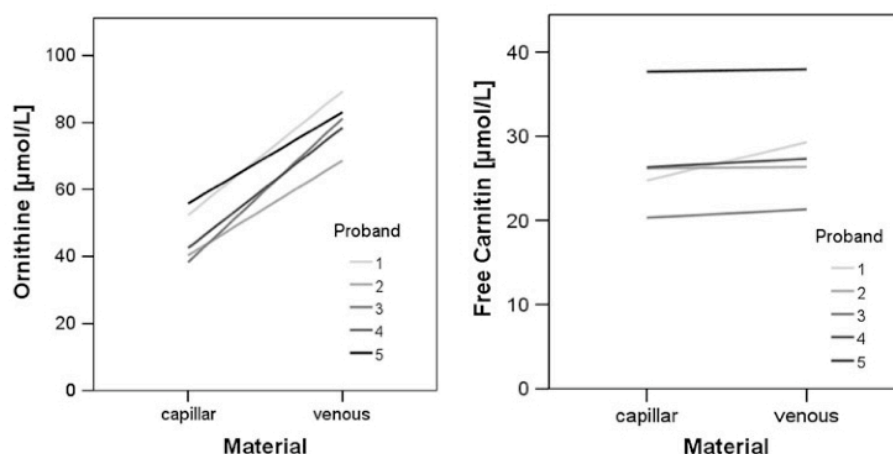
between consecutive analysis of each dried blood sample (at least 24 h after each blood taking) and batch metabolite analysis of all study samples were previously shown (Ceglarek et al. 2009). We could verify this observation in our actual study. Therefore, batch wise sample processing is recommended in our protocol (Fig. 2).

### 3.3 Endogenous influencing factors

#### 3.3.1 Effect of fasting

It is well known that a fatty meal increases lipid concentrations up to 9 h. Ideally, probands should be instructed to fast overnight at least 12 h (Guder et al. 1996). Otherwise,

**Fig. 3** Individual differences in ornithine and carnitine concentrations between venous and capillary blood taking ( $n = 5$ ). \*\*\*  $P < 0.001$



**Table 1** Significantly differing amino acid and acylcarnitine concentrations in whole blood 3 and 5 h postprandial (10 healthy volunteers)

AS/AC [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Fasting (A)		3 h postprandial (B)		$P_{A-B}$	5 h postprandial (C)		$P_{A-C}$
	$\bar{x}$	95% CI	$\bar{x}$	95% CI		$\bar{x}$	95% CI	
Gln	10	7–11	11	9–16	*	12	9–15	*
OH-Prol	271	217–389	346	297–489	**	384	261–492	*
His	89	73–109	115	88–178	n.s.	162	101–255	*
Leu/Ile <sup>a</sup>	78	64–103	109	80–136	**	107	82–142	*
Met <sup>a</sup>	15	11–24	20	14–30	**	21	11–27	*
Orn	53	34–65	65	38–111	**	65	41–168	*
Phe <sup>a</sup>	40	29–61	58	51–67	**	55	53–68	*
Pro	118	67–166	185	118–240	**	194	118–256	**
Sarc	86	66–123	97	75–138	n.s.	103	83–147	*
Ser	66	53–77	70	54–85	n.s.	83	58–127	*
Tyr	37	30–60	57	45–68	**	58	48–84	*
Val <sup>a</sup>	160	136–210	193	162–248	*	188	166–220	n.s.
C2	13.4	9.5–17.0	11.4	4.1–13.0	**	11.4	6.2–14.3	n.s.
C6DC	0.01	0.00–0.01	0.01	0.00–0.05	n.s.	0.01	0.00–0.05	*
C8	0.15	0.09–0.73	0.04	0.00–0.29	**	0.11	0.04–0.20	n.s.
C10	0.25	0.14–0.71	0.12	0.04–0.42	**	0.13	0.06–0.24	*
C14:1	0.1	0.03–0.24	0.04	0.00–0.09	**	0.03	0.00–0.07	**

<sup>a</sup> Essential AA,  $\bar{x}$  median,  $P$  significance level between group A and B ( $P_{A-B}$ ) and group A–C ( $P_{A-C}$ ) (Wilcoxon-test): \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , n.s. not significant

prolonged fasting influences the metabolism of valine, leucine or isoleucine (Bremer et al. 1981). Besides lysine, threonine and tryptophan all essential amino acids and glutamine, hydroxyproline, ornithine, proline, and tyrosine significantly increased 3 and 5 h postprandial. In contrast, the concentrations of acylcarnitines (C2, C6DC, C8, C10, C14:1) significantly decreased in concentration 3 and 5 h postprandial (Table 1). Other amino acids and acylcarnitines were not affected by nutritional influences. This observation indicates that a fasting period longer than 5 h has to be considered. As a compromise we decided to define an 8 h fasting period in our standard protocol.

### 3.3.2 Effect of strenuous exercise

Strenuous exercise affects laboratory results as known for creatinkinase, steroids, and catecholamines (Narayanan 2000). Muscular effort and the resulting changes in the energy balance should affect the amino acid and carnitine metabolism, too. We investigated metabolic changes of the amino acid and acylcarnitine levels in 15 healthy male athletes during a fitness test based on 5 increasing running levels and a following recovery phase under standardized preanalytical conditions. As shown in Table 2, lactate as marker for anaerobic metabolism increased with increasing physical strain and decreased till the end of the recovery

phase in all subjects. This observation is confirmed by an increase of alanine and acetylcarnitine, too. Concentration of sarcosine, propionylcarnitine, and octanoylcarnitine changed in the same way. Elevations of sarcosine concentrations are known from patients with mitochondrial disorders due to the damage of muscle tissue (Blau et al. 2003). Other amino acids and acylcarnitines were not significantly influenced during the exercise experiment.

We divided study probands into three groups according to the maximum lactate level. As shown in Fig. 5, in the group of athletes with the lowest maximum lactate level the concentration of alanine, arginine and acetylcarnitine decline to the range of the starting conditions, whereas in the group with the highest lactate concentrations the metabolite concentrations still increased. These results indicate an individual varying adaption mechanism.

## 4 Conclusions

Our investigations underline the importance of various in vitro and in vivo preanalytical variables on the results of metabolite analysis in human blood. Therefore, all metabolic parameters need to be carefully evaluated before clinical studies regarding their preanalytical interferences. The application of our pretreatment protocol for

Preanalytical standardization of metabolite profiling

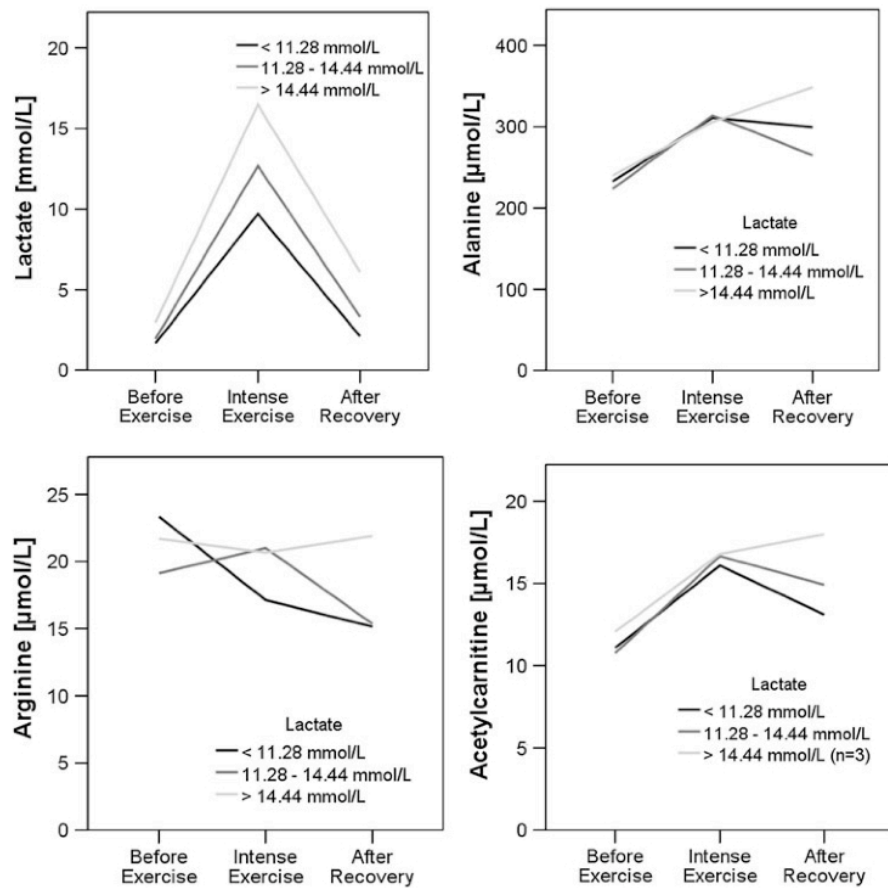
**Table 2** Significant changes of amino acid and acylcarnitines concentrations after physical activity

Analyte	Before exercise (A)		Maximum exercise (B)		$P_{A-B}$	After recovery (C)		$P_{A-C}$	$P_{B-C}$
	$\bar{x}$	95% CI	$\bar{x}$	95% CI		$\bar{x}$	95% CI		
Lactate [mmol/L]	2.0	0.9–3.9	12.5	6.3–18.2	***	3.24	1.3–7.0	***	***
Amino acids and acylcarnitines [ $\mu\text{mol/L}$ ]									
Aba	19	13–27	15	10–18	**	15	10–27	*	n.s.
Ala	236	150–306	318	213–404	***	263	162–409	**	n.s.
Arg	21	13–36	19	13–30	n.s.	15	11–29	n.s.	*
Orn	52	45–88	39	25–56	**	46	33–65	*	n.s.
Sarc	145	114–199	207	155–251	***	182	134–253	**	n.s.
C2-Carn	11	8–16	17	13–21	***	16	9–23	**	n.s.
C3-Carn	1.2	0.9–2.6	2	0.9–2.6	*	1.4	0.8–2.5	n.s.	n.s.
C8-Carn	0.05	0.0–0.21	0.08	0.0–0.32	*	0.07	0.0–0.35	n.s.	n.s.

Before exercise (A), at maximum exercise (B) and after the recovery phase (C) ( $n = 15$ ) (other AA and AC did not changed significantly)

<sup>a</sup> Essential AA;  $\bar{x}$ , median;  $P$ -value (Mann–Whitney-U-test): \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

**Fig. 5** Strenuous physical activity (endurance running test) and significant changes of lactate, alanine, arginine and acetylcarnitine concentrations in three groups divided according to the maximum lactate concentration <12.28 mmol/L (<25 percentile), 12.28–14.44 mmol/L (25–75 percentile), and >14.44 mmol/L (>75 percentile)





quantitative amino acids and acylcarnitine profiling in dried blood (Fig. 2) allows standardization of critical procedures in the preanalytical phase and facilitates the reproducible metabolite profiling.

**Acknowledgement** This publication is supported by LIFE (Leipzig Research Center for Civilization Diseases, University of Leipzig). LIFE is funded by the European Union, the European Regional Development Fund (ERFD) and the Free State of Saxony within the framework of the excellence initiative.

## References

- Arn, P. H. (2007). Newborn screening: Current status. *Health Affairs (Millwood)*, *26*, 559.
- Blau, N. D., Duran, M., Blaskovics, M. E., & Gibson, K. M. (2003). *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Heidelberg: Springer.
- Bremer, H. J., Duran, M., Kamerling, J. P., Przyrembel, H., & Wadman, S. K. (1981). *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. München: Urban & Schwarzenberg.
- Bruce, S. J., Jonsson, P., Antti, H., Cloarec, O., Trygg, J., Marklund, S. L., et al. (2008). Evaluation of a protocol for metabolic profiling studies on human blood plasma by combined ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry: From extraction to data analysis. *Analytical Biochemistry*, *372*, 237.
- Ceglarek, U., Leichtle, A., Brugel, M., Kortz, L., Brauer, R., Bresler, K., et al. (2009). Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *301*, 266.
- Ceglarek, U., Muller, P., Stach, B., Buhrdel, P., Thiery, J., & Kiess, W. (2002). Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: Sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *40*, 693.
- Chace, D. H., Hillman, S. L., Van Hove, J. L., & Naylor, E. W. (1997). Rapid diagnosis of MCAD deficiency: Quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, *43*, 2106.
- Chace, D. H., & Kalas, T. A. (2005). A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clinical Biochemistry*, *38*, 296.
- De Jesus, V. R., Chace, D. H., Lim, T. H., Mei, J. V., & Hannon, W. H. (2010). Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, *411*, 684.
- Dunn, W. B. (2008). Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical Biology*, *5*, 11001.
- Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., & Subramaniam, S. (2007). LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Research*, *35*, W606.
- Fiedler, G. M., & Thiery, J. (2004). The incorrect laboratory result. Part 1: Pre- and postanalytical phase. *Internist (Berl)*, *45*, 315.
- Foster, D. W. (2004). The role of the carnitine system in human metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1033*, 1.
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., & Wilson, I. D. (2008). Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine: Sample stability under different handling and storage conditions for metabolomics studies. *Journal of Chromatography. A*, *1189*, 314.
- Guder, W., Narayanan, S., & Wisser, H. (1996). *Samples: From the patient to the laboratory: The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results*. Darmstadt: GIT Verlag.
- Hall, R. D. (2006). Plant metabolomics: From holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, *169*, 453.
- Holub, M., Tuschl, K., Ratschmann, R., Strnadova, K. A., Muhl, A., Heinze, G., et al. (2006). Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, *373*, 27.
- Illig, T., Gieger, C., Zhai, G., Romisch-Margl, W., Wang-Sattler, R., Prehn, C., et al. (2010). A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism. *Nature Genetics*, *42*, 137.
- Jogl, G., Hsiao, Y. S., & Tong, L. (2004). Structure and function of carnitine acyltransferases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1033*, 17.
- Johnson, C. A., & Bergeim, O. (1951). The distribution of free amino acids between erythrocytes and plasma in man. *Journal of Biological Chemistry*, *188*, 833.
- Leichtle, A. B., Ceglarek, U., Witzigmann, H., Gabel, G., Thiery, J., & Fiedler, G. M. (2010). Potential of dried blood self-sampling for cyclosporine c(2) monitoring in transplant outpatients. *Journal of Transplantation*, *2010*, 201918.
- Lv, Y., Liu, X., Yan, S., Liang, X., Yang, Y., Dai, W., et al. (2010). Metabolomic study of myocardial ischemia and intervention effects of Compound Danshen Tablets in rats using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *52*, 129.
- Mashego, M. R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., & Heijnen, J. J. (2007). Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies. *Biotechnological Letters*, *29*, 1.
- Michopoulos, F., Theodoridis, G. A., Smith, C., & Wilson, I. D. (2010). Metabolite profiles from dried biofluid spots for metabolomic studies using UPLC Combined with oaToF-MS. *Journal of Proteomic Research*.
- Morris, C. R. (2009). Asthma management: Reinventing the wheel in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, *84*, 234.
- Mueller, P., Schulze, A., Schindler, I., Ethofer, T., Buehrdel, P., & Ceglarek, U. (2003). Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clinica Chimica Acta*, *327*, 47.
- Narayanan, S. (2000). The preanalytic phase—an important component of laboratory medicine. *American Journal of Clinical Pathology*, *113*, 429.
- Omodeo-Sale, F., Cortelezzi, L., Vommaro, Z., Scaccabarozzi, D., & Dondorp, A. M. (2010). Dysregulation of L-arginine metabolism and bioavailability associated to free plasma heme. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *299*, C148.
- Rashed, M. S., Ozand, P. T., Bucknall, M. P., & Little, D. (1995). Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatric Research*, *38*, 324.
- Ronnett, G. V., Kim, E. K., Landree, L. E., & Tu, Y. (2005). Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. *Physiology & Behavior*, *85*, 25.
- Seeger, K. (2009). Metabolic changes in autoimmune diseases. *Current Drug Discovery Technologies*, *6*, 256.
- Wilcken, B. (2007). Recent advances in newborn screening. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *30*, 129.

## Preanalytical standardization of metabolite profiling

- Wilcken, B., & Wiley, V. (2008). Newborn screening. *Pathology*, *40*, 104.
- Zhao, X., Fritsche, J., Wang, J., Chen, J., Rittig, K., Schmitt-Kopplin, P., et al. (2010). Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits. *Metabolomics*, *6*, 362.
- Zivkovic, A. M., Wiest, M. M., Nguyen, U. T., Davis, R., Watkins, S. M., & German, J. B. (2009a). Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics*, *5*, 507.
- Zivkovic, A. M., Wiest, M. M., Nguyen, U., Nording, M. L., Watkins, S. M., & German, J. B. (2009b). Assessing individual metabolic responsiveness to a lipid challenge using a targeted metabolomic approach. *Metabolomics*, *5*, 209.



### 3. Zusammenfassung

Kumulative Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor Medicinae (Dr. med.)

#### **Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Untersuchung des Aminosäure- und Acylcarnitinstoffwechsels**

eingereicht von Romy Brauer

angefertigt an der Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

betreut von Priv. Doz. Dr. rer. nat. habil. Uta Ceglarek, Prof. Dr. med. Joachim Thiery

September 2011

In der vorliegenden Arbeit wurden präanalytische Faktoren der Metabolomanalytik mit Tandem-Massenspektrometrie bearbeitet. Darauf aufbauend wurden Untersuchungen zur Dynamik bei Einflüssen von Ernährung und körperlicher Aktivität durchgeführt. Das langfristige Ziel von „*Clinical Metabolomics*“-Untersuchungen, in welche die Analytik von AS und AC einzuordnen ist, ist die Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten in humanen Körperflüssigkeiten, die als Biomarker für neue diagnostische oder therapeutische Konzepte geeignet sind.

Um die äußerst komplizierten und umfangreichen präanalytischen Einflüsse auf Metabolom-Untersuchungen zu minimieren, wurden zahlreiche Versuche durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 26 AS und 35 AC nach Butylierung von 3 µl TB simultan mittels ESI-MS/MS in 1,5 Minuten analysiert. Die vollständige Auflistung der Ergebnisse kann im Supplement der Arbeit eingesehen werden.

Der Vergleich von sechs verschiedenen Materialien für die Probengewinnung (Nativ- und EDTA-Trockenblut, Serum, sowie EDTA-, Citrat- und Heparin-Plasma) zeigte, dass die niedrig konzentrierten langkettigen AC (z. B. Stearoylcarnitin) im TB mit bis zu 5-fach höheren Konzentrationen als im Serum und im antikoagulierten Plasma detektiert werden können. Zudem hat TB für klinische Studien den Vorteil, dass die Lagerung und Aufarbeitung von TB-Karten einfacher ist als von Serum oder Plasma-Materialien. Der Vergleich von Nativ- und EDTA-TB zeigte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede bei AS und AC. Serum und Plasma werden aus venösem Vollblut gewonnen. Der Unterschied besteht darin,

dass das Serumröhrchen keine gerinnungshemmenden Substanzen enthält und somit nach kurzer Zeit die Blutgerinnung einsetzt. In Plasmaröhrchen ist hingegen ein gerinnungshemmender Zusatz (Antikoagulant) enthalten. Um Blutserum und -plasma verarbeiten zu können, muss vorab eine 15-minütige Zentrifugation erfolgen. Deshalb sind im Gegensatz zum TB keine Zellen im Serum sowie im Plasma enthalten. Der Unterschied von Blutserum zu Blutplasma ist, dass Blutplasma noch Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen enthält. Beides ist im Serum durch den Ablauf der Gerinnung bereits verbraucht. Die Konzentration der meisten klinisch-chemischen Messgrößen ist im Blutplasma etwa 10 % niedriger als im Blutserum, da das zugesetzte Antikoagulant einen Verdünnungseffekt sowie osmotische Verschiebungen bewirkt. Die Konzentrationen von 24 AS sowie 16 AC, insbesondere die der kurz- und mittelkettigen AC, sind im Serum 1,5- bis 2-fach höher als in den TB-Materialien. Als Grund hierfür ist die geringere intrazelluläre Konzentration, vor allem in den Erythrozyten, zu sehen. Im Plasma konnten, wie auch in der Literatur beschrieben<sup>52</sup>, etwa 10 % geringere Konzentrationen als im Serum gefunden werden, was auf den oben erwähnten Verdünnungs- und Osmoseffekt zurückzuführen ist. Auffälligerweise weist das Arginin im Serum 8-fach höhere Konzentrationen und im Plasma 6-fach höhere Konzentrationen als im TB auf (Abbildung 11). Aus der Literatur ist bekannt, dass das Enzym Arginase, das auch in Erythrozyten und Monozyten vorkommt, durch Hämolyse freigesetzt wird<sup>69, 70</sup>. Durch die Arginase wird Arginin zu Ornithin gespalten. Allerdings ist, entgegen der Erwartung, kein korrespondierender Konzentrationsanstieg von Ornithin erkennbar gewesen.

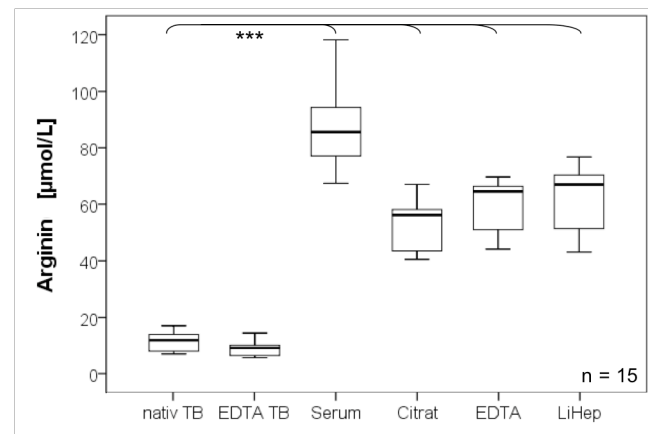


Abbildung 11: Unterschiede der Arginininkonzentrationen in verschiedenen Materialien<sup>71</sup>

Die Untersuchungen bezüglich der Trockenzeit des Filterpapiers haben gezeigt, dass die Lagerung der TB-Karten aus EDTA-Vollblut bis 24 Stunden bei Raumtemperatur für einen Großteil der Analyten ohne signifikante Konzentrationsveränderungen möglich ist. Ein signifikanter Konzentrationsabfall konnte für Ornithin, Sarcosin und Serin festgestellt werden. Die Konzentration der Aminosäure Arginin stieg hingegen mit der Länge der Trockenzeit signifikant an.

Signifikante Konzentrationsunterschiede wurden für die AS zwischen kapillärer und venöser Blutentnahme (BE) beobachtet. Die Konzentrationen von Hydroxyprolin, Ornithin, Sarcosin,

Serin und Taurin waren im kapillären Blut signifikant niedriger als im venösen Blut, was möglicherweise darauf hindeutet, dass diese Aminosäuren in der Peripherie bei Stoffwechselfvorgängen gebildet werden. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration von Tryptophan im kapillären Blut signifikant höher als im venösen Blut, was wiederum auf einen peripheren Verbrauch hindeuten könnte. Letztendlich sind die Ergebnisse von Metabolom-Untersuchungen nur vergleichbar, wenn der Ort der BE identisch ist. Auf der einen Seite hat die venöse BE den Vorteil der besseren Handhabung und der Möglichkeit auch große Probenvolumina zu gewinnen. Auf der anderen Seite ist die sichere Probengewinnung auch in Feld-Studien, wie beispielsweise Laktat-Testen, der Vorteil der kapillären BE.

Auch der Hämatokrit (Hk) beeinflusst die Ergebnisse von Metabolom-Untersuchungen. Für alle untersuchten AS und AC wurden, wie schon von Holub et al.<sup>72</sup> 2006 beschrieben, mit fallendem Hk auch fallende AS- und AC-Konzentrationen beobachtet. Der Durchmesser des Blutspots vergrößerte sich erwartungsgemäß mit fallendem Hk. Das Gewicht der zentral ausgestanzten TB-Spots war bei einem Hk von 20 % signifikant niedriger als bei einem Hk von 40 % ( $p < 0.001$ ). Signifikant höhere Konzentrationen der peripher ausgestanzten TB-Spots wurden beispielsweise für Lysin, Arginin und Isovalerylcarnitin (C5) detektiert. Dies ist möglicherweise dem chromatographischen Effekt nach dem Auftropfen zuzuschreiben. Die Konzentration von Serin war als Einzige im zentral ausgestanzten Spot signifikant höher als im peripher ausgestanzten Spot. Idealerweise sollten alle TB-Spots einer Studie an der gleichen Stelle ausgestanzt werden. Die reproduzierbarste Lokalisation ist der zentrale Spot. Des Weiteren ist die Normierung der Ergebnisse auf den Hämatokrit anzustreben.

Anhand aller Experimente wurde ein standardisiertes Präanalytik-Protokoll entwickelt. Begonnen wird mit der BE von venösem EDTA-Vollblut. Es folgt das Auftropfen von 40  $\mu$ l EDTA-Vollblut auf Filterpapier. Die Lagerung der TB-Karten ist bis 24 Stunden bei Raumtemperatur möglich. Studienproben sollten in einer Serie aufgearbeitet und gemessen werden um die Variabilität zu minimieren. Deshalb werden die TB-Karten bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Danach wird ein zentraler Spot pro Probe ausgestanzt und alle Proben möglichst zeitnah unter Benutzung der gleichen Reagenzien und internen Standards aufgearbeitet und gemessen.

Bei den Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit von Metabolom-Messungen erreichten 17 AS (z. B. Alanin) und 7 AC (z. B. Acetylcarnitin) mit Anwendung des Präanalytik-Protokolls Variabilitäten zwischen den Messtagen (Inter-assay-Variabilitäten) von  $< 20$  %. Weitere 5 AS und 11 AC lagen bei Inter-assay-Variabilitäten zwischen 20 und 50 %. 4 AS und 18 AC, also vor allem die niedrig konzentrierten Intermediate, wiesen Inter-assay-Variabilitäten von

> 50 % auf und sind somit auf der Suche nach Biomarkern eher ungeeignet. Lediglich sehr große Konzentrationsunterschiede können bei diesen Parametern sicher detektiert werden.

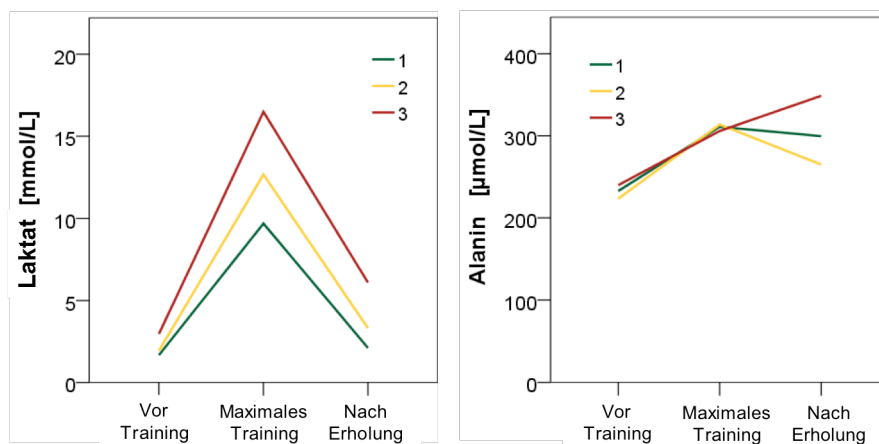
Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Ernährung und körperlicher Aktivität auf die Dynamik des AS- und AC-Stoffwechsels bearbeitet.

Die Untersuchung zu Ernährungseinflüssen wurde an 10 gesunden Probanden (5/5 m/f, Alter 22–29 Jahre, BMI 18–25) durchgeführt. Ihnen wurde nüchtern (mindestens 5 Stunden nach letzter Nahrungsaufnahme) sowie 3 und 5 Stunden postprandial (fetteiche Mahlzeit) Blut abgenommen. Die TB-Gewinnung erfolgte aus venösem EDTA-Vollblut. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen der essentiellen AS (außer Lysin, Threonin und Tryptophan) und Glutamin, Hydroxyprolin, Ornithin, Prolin und Tyrosin bei der BE 3 und 5 Stunden postprandial signifikant anstiegen. Die Konzentrationen von fünf Acylcarnitinen, wie beispielsweise Acetylcarnitin und Octanoylcarnitin, fielen hingegen postprandial signifikant ab. Weitergehende Untersuchungen zu Ernährungseinflüssen zeigten, dass beispielsweise die Konzentration der essentiellen Aminosäure Phenylalanin nach Aufnahme einer Standard-Mahlzeit mit Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten postprandial signifikant anstieg und nach Aufnahme einer reinen Fett-Mahlzeit ohne Proteine und Kohlenhydrate postprandial signifikant abfiel. Dieser Konzentrationsabfall ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Phenylalanin vom Körper verwertet wurde.

Körperliche Aktivität unter anaeroben Bedingungen ist eine enorme Herausforderung für den Energiestoffwechsel des Skelettmuskels. Mit dem Ziel die Metabolitengruppen der AS und AC zu untersuchen, die Teil dieses Netzwerks sind, wurde der Einfluss von körperlicher Aktivität an 14 gesunden männlichen Probanden (14/0 m/f, Alter 17–29 Jahre, BMI 22–29) untersucht. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein umfangreicher 5-stufiger Leistungs-Test (Laktat-Test) organisiert. Das Laktat ist der Marker des anaeroben Stoffwechsels, also des Stoffwechsels, auf den der Körper zurückgreift, wenn der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot übersteigt. Erwartungsgemäß stieg das Laktat bei intensiver körperlicher Belastung bei allen Athleten an und fiel bei allen bis zum Ende der Erholungsphase wieder ab. Da auch das Alanin durch den Alanin-Glukose-Zyklus in die Energiegewinnung des Muskels involviert ist, kam es zu einem Konzentrationsanstieg des Alanins. Auch die Konzentration des Acetylcarnitins stieg an, da es durch den Sauerstoff-Mangel via Citratzyklus und Atmungskette nicht schnell genug abgebaut werden konnte. Ein Konzentrationsanstieg der AC nach körperlicher Belastung wurde in den 1980er Jahren das erste Mal beschrieben<sup>50</sup>. Es wurde gezeigt, dass intensive Belastung im anaeroben Bereich die Konzentrationen der AC nicht beeinflussen, jedoch eine Erhöhung des Acetylcarnitin-

Spiegels gefunden werden konnte<sup>51</sup>. Unter moderater Belastung kehrt sich diese Beobachtung um<sup>73</sup>. In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten wurden signifikante Konzentrationsanstiege bei Acetyl-, Propionyl-, Octanoyl-, Octenoyl- und Octadecenoylcarnitin gesehen. Bei allen anderen AC (C0 - C18) wurde tendenziell ein nicht signifikanter Konzentrationsanstieg beobachtet.

Des Weiteren wurden die Sportler, abhängig von ihrem maximalen Laktat-Wert, in drei Gruppen eingeteilt. Bei Betrachtung des Alanins fällt auf, dass die Alanin-Konzentrationen der Sportler mit den geringeren maximalen Laktat-Werten nach der Erholungsphase tendenziell wieder abfielen. Die Alanin-Konzentrationen in der Gruppe mit den höheren maximalen Laktat-Werten verzeichneten auch nach der Erholungsphase noch Konzentrationsanstiege (Abbildung 12). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Gruppe mit den höheren maximalen Laktat-Werten noch immer die Metabolite abbaute und die Gruppe mit den niedrigeren maximalen Laktat-Werten schon wieder genug Sauerstoff zur Verfügung hatte und sich deren Stoffwechsel fast wieder im Ausgangsniveau befand. Möglicherweise könnte Alanin einen sensitiven sportmedizinischen Parameter darstellen.



Maximale Laktat-Konzentration [mmol/L]:  
 Gruppe 1 (< 11.3) – 1. Quartile; Gruppe 2 (11.3 – 14.4) – 2./3. Quartile; Gruppe 3 (> 14.4) – 4. Quartile

**Abbildung 12: Verlauf der Laktat- und Alanin-Konzentrationen während physischer Aktivität (Laktat-Stufentest) in 3 Gruppen (n = 15)<sup>71</sup>**

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Analytik von Aminosäuren und Acylcarnitinen aus humanem EDTA-Trockenblut abhängig von *in vitro* Störfaktoren und *in vivo* Einflussgrößen ist. Um eine valide Interpretation von Metabolom-Daten auf der Suche nach Biomarkern für Prävention und Diagnostik in großen klinischen Studien zu gewährleisten, muss der Einfluss dieser Faktoren berücksichtigt werden. In der Zukunft könnten Untersuchungen zum Metabolom dazu beitragen neue Erkenntnisse über den menschlichen Stoffwechsel zu gewinnen und eine individualisierte Medizin zu ermöglichen.

## 4. Anlagen

### 4.1 Literaturverzeichnis

- 1 Dunn, W. B. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical biology* 5, 011001, doi:10.1088/1478-3975/5/1/011001 (2008).
- 2 Tweeddale, H., Notley-McRobb, L. & Ferenci, T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *Journal of bacteriology* 180, 5109-5116 (1998).
- 3 Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. & Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology* 16, 373-378 (1998).
- 4 Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews* 26, 51-78, doi:10.1002/mas.20108 (2007).
- 5 Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G. & Kell, D. B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in biotechnology* 22, 245-252, doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.007 (2004).
- 6 Scaros, O. & Fisler, R. Biomarker technology roundup: from discovery to clinical applications, a broad set of tools is required to translate from the lab to the clinic. *BioTechniques Suppl.*, 30-32 (2005).
- 7 Fliser, D. et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 1057-1071, doi:10.1681/ASN.2006090956 (2007).
- 8 de Hoog, C. L. & Mann, M. Proteomics. *Annual review of genomics and human genetics* 5, 267-293, doi:10.1146/annurev.genom.4.070802.110305 (2004).
- 9 Mashego, M. R. et al. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology letters* 29, 1-16, doi:10.1007/s10529-006-9218-0 (2007).
- 10 Hall, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *The New phytologist* 169, 453-468, doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x (2006).
- 11 Löffler/Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie* 7. Auflage, Kap. 2: G. Löffler, P. E. Petrides: Kohlenhydrate, Lipide und Aminosäuren (2003).
- 12 Löffler/Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie* 7. Auflage, Kap.15: P. E. Petrides: Stoffwechsel der Aminosäuren (2003).
- 13 Commans, S. & Bock, A. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS microbiology reviews* 23, 335-351 (1999).
- 14 Srinivasan, G., James, C. M. & Krzycki, J. A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-1462, doi:10.1126/science.1069588 (2002).

- 15 Szymanski, M. & Barciszewski, J. The genetic code--40 years on. *Acta biochimica Polonica* 54, 51-54 (2007).
- 16 Konradi, C. & Heckers, S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacology & therapeutics* 97, 153-179 (2003).
- 17 Tabatabaie, L., Klomp, L. W., Berger, R. & de Koning, T. J. L-serine synthesis in the central nervous system: a review on serine deficiency disorders. *Molecular genetics and metabolism* 99, 256-262, doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.012 (2010).
- 18 Fernstrom, J. D. & Fernstrom, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of nutrition* 137, 1539S-1547S; discussion 1548S (2007).
- 19 Sandyk, R. L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. *The International journal of neuroscience* 67, 127-144 (1992).
- 20 Rajapakse, N. W. & Mattson, D. L. Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36, 249-255, doi:10.1111/j.1440-1681.2008.05123.x (2009).
- 21 Melikian, N., Seddon, M. D., Casadei, B., Chowienczyk, P. J. & Shah, A. M. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends in cardiovascular medicine* 19, 256-262, doi:10.1016/j.tcm.2010.02.007 (2009).
- 22 Dioguardi, F. S. To Give or Not to Give? Lessons from the Arginine Paradox. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* 4, 90-98, doi:10.1159/000327777 (2011).
- 23 Sourij, H. et al. Arginine bioavailability ratios are associated with cardiovascular mortality in patients referred to coronary angiography. *Atherosclerosis*, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.041 (2011).
- 24 Masumoto, K. et al. Successful treatment of an infected wound in infants by a combination of negative pressure wound therapy and arginine supplementation. *Nutrition*, doi:10.1016/j.nut.2011.01.006 (2011).
- 25 Ogata, H. et al. Effects of oral supplementation of L-arginine in the treatment of pulmonary hypertension secondary to pulmonary embolism: a case report. *Fukushima journal of medical science* 56, 135-138 (2010).
- 26 Workman, J. L., Weber, M. D. & Nelson, R. J. Dietary arginine depletion reduces depressive-like responses in male, but not female, mice. *Behavioural brain research* 223, 81-87, doi:10.1016/j.bbr.2011.04.011 (2011).
- 27 Rebouche, C. J. Carnitine function and requirements during the life cycle. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 3379-3386 (1992).
- 28 Kerner, J. & Hoppel, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1486, 1-17 (2000).
- 29 Löffler/Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie* 7. Auflage, Kap. 14: G. Löffler: Stoffwechsel von Triacylglycerinen und Fettsäuren (2003).

- 30 Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. Evidenzbasierte Leitlinie: Fettkonsum und Prävention ausgewählter ernährungsmitbedingter Krankheiten. Bonn, November 2006. <http://www.dge.de/leitlinie>
- 31 Karlson, K. E., Massimino, R. M., Cooper, G. N., Jr. & Singh, A. K. Initial clinical experience with a low pressure drop membrane oxygenator for cardiopulmonary bypass in adult patients. *American journal of surgery* 147, 447-450 (1984).
- 32 Wilcken, B. Disorders of the carnitine cycle and detection by newborn screening. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 37, 71-73 (2008).
- 33 McGarry, J. D. & Brown, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry / FEBS* 244, 1-14 (1997).
- 34 Rebouche, C. J. & Seim, H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annual review of nutrition* 18, 39-61, doi:10.1146/annurev.nutr.18.1.39 (1998).
- 35 Brass, E. P. Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man. *Pharmacological reviews* 54, 589-598 (2002).
- 36 Steiber, A., Kerner, J. & Hoppel, C. L. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular aspects of medicine* 25, 455-473, doi:10.1016/j.mam.2004.06.006 (2004).
- 37 Löffler/Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie* 7. Auflage, Kap.14.2: G. Löffler: Stoffwechsel der Fettsäuren (2003).
- 38 Bieber, L. L. Carnitine. *Annual review of biochemistry* 57, 261-283, doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.001401 (1988).
- 39 Bremer, J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiological reviews* 63, 1420-1480 (1983).
- 40 Aires, C. C. *et al.* Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochemical pharmacology* 79, 792-799, doi:10.1016/j.bcp.2009.10.011 (2010).
- 41 Bertoli, M. *et al.* Carnitine deficiency induced during hemodialysis and hyperlipidemia: effect of replacement therapy. *The American journal of clinical nutrition* 34, 1496-1500 (1981).
- 42 Moorthy, A. V., Rosenblum, M., Rajaram, R. & Shug, A. L. A comparison of plasma and muscle carnitine levels in patients on peritoneal or hemodialysis for chronic renal failure. *American journal of nephrology* 3, 205-208 (1983).
- 43 Angelini, C., Vergani, L. & Martinuzzi, A. Clinical and biochemical aspects of carnitine deficiency and insufficiency: transport defects and inborn errors of beta-oxidation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 29, 217-242, doi:10.3109/10408369209114601 (1992).
- 44 Koepsell, H., Lips, K. & Volk, C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical research* 24, 1227-1251, doi:10.1007/s11095-007-9254-z (2007).



- 45 Nezu, J. et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nature genetics* 21, 91-94, doi:10.1038/5030 (1999).
- 46 Knoop, F. Zur Oxydation der Fettsäuren. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.* 11, 411–414 (1908).
- 47 Felig, P., Baxter, J.D., Broadus, A.E., Frohman, L.A. *Endocrinology and metabolism.* New York: McGraw-Hill Book Company (1987).
- 48 Kuhajda, F. P. & Ronnett, G. V. Modulation of carnitine palmitoyltransferase-1 for the treatment of obesity. *Current opinion in investigational drugs* 8, 312-317 (2007).
- 49 Jogl, G., Hsiao, Y. S. & Tong, L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1033, 17-29, doi:10.1196/annals.1320.002 (2004).
- 50 Hoppel, C. L. & Davis, A. T. Inter-tissue relationships in the synthesis and distribution of carnitine. *Biochemical Society transactions* 14, 673-674 (1986).
- 51 Henderson, G. C. et al. Pyruvate shuttling during rest and exercise before and after endurance training in men. *Journal of applied physiology* 97, 317-325, doi:10.1152/jappphysiol.01367.2003 (2004).
- 52 Brooks, G. A. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *The Journal of physiology* 587, 5591-5600, doi:10.1113/jphysiol.2009.178350 (2009).
- 53 Felig, P. Amino acid metabolism in man. *Annual review of biochemistry* 44, 933-955, doi:10.1146/annurev.bi.44.070175.004441 (1975).
- 54 Jahoor, F., Herndon, D. N. & Wolfe, R. R. Role of insulin and glucagon in the response of glucose and alanine kinetics in burn-injured patients. *The Journal of clinical investigation* 78, 807-814, doi:10.1172/JCI112644 (1986).
- 55 Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C. & Gerich, J. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney international* 55, 778-792, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.055003778.x (1999).
- 56 Friolet, R., Hoppeler, H. & Krahenbuhl, S. Relationship between the coenzyme A and the carnitine pools in human skeletal muscle at rest and after exhaustive exercise under normoxic and acutely hypoxic conditions. *The Journal of clinical investigation* 94, 1490-1495, doi:10.1172/JCI117488 (1994).
- 57 Hiatt, W. R., Regensteiner, J. G., Wolfel, E. E., Ruff, L. & Brass, E. P. Carnitine and acylcarnitine metabolism during exercise in humans. Dependence on skeletal muscle metabolic state. *The Journal of clinical investigation* 84, 1167-1173, doi:10.1172/JCI114281 (1989).
- 58 Fiedler, G. M. & Thiery, J. [The incorrect laboratory result. Part 1: Pre- and postanalytical phase]. *Der Internist* 45, 315-329; quiz 330 (2004).
- 59 Wilcken, B. & Wiley, V. Newborn screening. *Pathology* 40, 104-115, doi:10.1080/00313020701813743 (2008).
- 60 Narayanan, S. Technology and laboratory instrumentation in the next decade. *MLO: medical laboratory observer* 32, 24-27, 30-21 (2000).

- 61 Ceglarek, U. et al. Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Molecular and cellular endocrinology* 301, 266-271, doi:10.1016/j.mce.2008.10.013 (2009).
- 62 Kebarle, P. & Verkerk, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass spectrometry reviews* 28, 898-917, doi:10.1002/mas.20247 (2009).
- 63 Mueller, P. et al. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 327, 47-57 (2003).
- 64 Rashed, M. S., Ozand, P. T., Bucknall, M. P. & Little, D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatric research* 38, 324-331 (1995).
- 65 Ceglarek, U. et al. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC* 40, 693-697, doi:10.1515/CCLM.2002.119 (2002).
- 66 De Jesus, V. R., Chace, D. H., Lim, T. H., Mei, J. V. & Hannon, W. H. Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 411, 684-689, doi:10.1016/j.cca.2010.01.034 (2010).
- 67 Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69:89-95
- 68 Leitzmann, M. F. et al. Waist circumference as compared with body-mass index in predicting mortality from specific causes. *PloS one* 6, e18582, doi:10.1371/journal.pone.0018582 (2011).
- 69 Morris, C. R. Asthma management: reinventing the wheel in sickle cell disease. *American journal of hematology* 84, 234-241, doi:10.1002/ajh.21359 (2009).
- 70 Omodeo-Sale, F., Cortelezzi, L., Vommaro, Z., Scaccabarozzi, D. & Dondorp, A. M. Dysregulation of L-arginine metabolism and bioavailability associated to free plasma heme. *American journal of physiology. Cell physiology* 299, C148-154, doi:10.1152/ajpcell.00405.2009 (2010).
- 71 Brauer, R. et al. Preanalytical standardization of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling in human blood using tandem mass spectrometry. *Metabolomics* 7(3), 344-352, doi:10.1007/s11306-010-0256-1 (2010).
- 72 Holub, M. et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 373, 27-31, doi:10.1016/j.cca.2006.04.013 (2006).
- 73 Lehmann, R. et al. Medium chain acylcarnitines dominate the metabolite pattern in humans under moderate intensity exercise and support lipid oxidation. *PloS one* 5, e11519, doi:10.1371/journal.pone.0011519 (2010).

## 4.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

AC	Acylcarnitine
AS	Aminosäuren
BE	Blutentnahme
BMI	Body-Mass-Index
BCAA	branched-chain amino acids
CPT I	Carnitin-Palmitoyltransferase I
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Einflussgrößen
ESI	Elektrospray-Ionisation
FIA	Flow-Injection-Analysis
FS	Fettsäuren
Hk	Hämatokrit
LCT	Triglyceride mit langkettigen FS (long chain triglycerides)
m/f	Männer / Frauen
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MCT	Triglyceride mit mittelkettigen FS (medium chain triglycerides)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NL	Neutral Loss
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PS	Precursor Ion
Q	Quadrupol
TB	Trockenblut

### 4.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungen

Abbildung 1: Genomics, Proteomics und Metabolomics	4
Abbildung 2: Struktur von $\alpha$ -Aminosäuren	5
Abbildung 3: Struktur von Acylcarnitinen	9
Abbildung 4: Strukturformel einer (a) gesättigten und (b) ungesättigten Fettsäuren	10
Abbildung 5: Mitochondrialer Transport der Fettsäuren	11
Abbildung 6: Stoffwechselwege des Acetyl-CoA	13
Abbildung 7: Alanin-Glukose-Zyklus	14
Abbildung 8: Systematik der Präanalytik	15
Abbildung 9: Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers	16
Abbildung 10: Prozessgrafik - Bestimmung von AS und AC mit MS/MS	17
Abbildung 11: Unterschiede der Argininkonzentrationen in verschiedenen Materialien	30
Abbildung 12: Verlauf der Laktat- und Alanin-Konzentrationen während physischer Aktivität in 3 Gruppen	33

#### Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der proteinogenen und nicht-proteinogenen MS/MS-gemessenen Aminosäuren	5
Tabelle 2: Übersicht von Acylcarnitinen, die im Rahmen der Arbeit mit MS/MS quantifiziert wurden	9

#### **4.4 Erklärung über die eigenständige Anfertigung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## 4.5 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

**Name** Romy Brauer  
**Geburtsdatum** 03.09.1984  
**Geburtsort** Leipzig

### Schulbildung

1995 - 2004 F.A.-Brockhaus-Gymnasium Leipzig, Abitur  
2001 - 2002 Austauschjahr Las Cruces High School, NM, USA

### Akademische Ausbildung

2004 - 2011 Medizinstudium in Leipzig  
2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2010 - 2011 Forschungssemester im Rahmen der Promotion am Institut für Labor-  
medizin Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik am Univer-  
sitätsklinikum Leipzig  
2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufserfahrung

2004 - 2006 3 Monate Pflegepraktikum  
Transplantationschirurgie (Universitätsklinikum Leipzig)  
Kreissaal (Universitätsklinikum Leipzig)  
Orthopädie (Oberammergau)  
2007 - 2008 5 Monate Famulatur  
Psychiatrie (Oetwil am See, Schweiz)  
Visceralchirurgie (Martin-Luther-Klinikum Schleswig)  
NEF - Famulatur, 24h-Dienste (Klinikum St. Georg gGmbH Leipzig)  
Labormedizin (Universitätsklinikum Leipzig)  
2007-2009 Tutorin Gesprächsführungskurs (Universitätsklinikum Leipzig)  
2009-2010 Praktisches Jahr (Universitätsklinikum Leipzig)  
Innere Medizin: Gastroenterologie, Kardiologie  
Anästhesie: Chirurgische Intensivstation, OP  
Chirurgie: Labormedizin, Visceral- und Thoraxchirurgie

**Publikationen**

- 2008** Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Molecular and cellular endocrinology* 301, 266-271, doi:10.1016/j.mce.2008.10.013 (2009).  
Ceglarek U, Leichtle A, Brügel M, Kortz L, Brauer R, Bresler K, Thiery J, Fiedler GM.
- 2010** Preanalytical standardization of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling in human blood using tandem mass spectrometry. *Metabolomics* 7(3), 344-352, doi: 10.1007/s11306-010-0256-1.  
Romy Brauer, Alexander Leichtle, Georg Martin Fiedler, Joachim Thiery, Uta Ceglarek

**Vorträge und Posterpräsentationen mit publizierten Abstracts**

- 2008** 7<sup>th</sup> Leipzig Research Festival of Life Sciences 2008  
*Standardization of Preanalytical Protocols for Clinical Metabolomic Studies by Tandem Mass Spectrometry*  
R. Brauer, A. Leichtle, S. Baumann, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- 2009** DGKL Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Leipzig  
*Standardization of Preanalytical Protocols for Clinical Metabolomic Studies by Tandem Mass Spectrometry*  
R. Brauer, A. Leichtle, S. Baumann, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- XVI. Lipid Meeting, Leipzig  
*Standardization of Preanalytical Protocols for Clinical Metabolomic Studies by Tandem Mass Spectrometry*  
R. Brauer, A. Leichtle, S. Baumann, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- 8<sup>th</sup> Leipzig Research Festival of Life Sciences 2009  
*Standardization of Preanalytical Protocols for Clinical Metabolomic Studies by Tandem Mass Spectrometry*  
R. Brauer, A. Leichtle, S. Baumann, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- 2010** 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neugeborenen-Screening  
*Standardisierung von Präanalytik-Protokollen für Clinical Metabolomic Studien unter Verwendung von Tandem-Massenspektrometrie*  
R. Brauer, A. Leichtle, S. Baumann, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- DGMS 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie  
*Standardization of Preanalytical Protocols for Clinical Metabolomic Studies by Tandem Mass Spectrometry*  
R. Brauer, A. Leichtle, S. Baumann, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- DGKL Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mannheim  
*Dietary influences on metabolism of amino acid and acylcarnitine*  
R. Brauer, A. Leichtle, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek
- 9<sup>th</sup> Leipzig Research Festival of Life Sciences 2010  
*Dietary influences on metabolism of amino acid and acylcarnitine*  
R. Brauer, A. Leichtle, G. M. Fiedler, J. Thiery, U. Ceglarek

## 4.6 Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics

Molecular and Cellular Endocrinology 301 (2009) 266–271



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mce](http://www.elsevier.com/locate/mce)



### Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics

Uta Ceglarek\*, Alexander Leichtle, Mathias Brügel, Linda Kortz, Romy Brauer, Kristin Bresler, Joachim Thiery, Georg Martin Fiedler

*Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Liebigstraße 27, D-04103 Leipzig, Germany*

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 19 August 2008

Received in revised form 13 October 2008

Accepted 14 October 2008

##### Keywords:

Clinical metabolomics

Linear ion trap

Metabolite profiling

Tandem mass spectrometry

Targeted metabolomics

#### ABSTRACT

'Clinical metabolomics' aims at evaluating and predicting health and disease risk in an individual by investigating metabolic signatures in body fluids or tissues, which are influenced by genetics, epigenetics, environmental exposures, diet, and behaviour.

Powerful analytical techniques like liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) offers a rapid, effective and economical way to analyze metabolic alterations of pre-defined target metabolites in biological samples. Novel hyphenated technical approaches like the combination of tandem mass spectrometry combined with linear ion trap (QTrap mass spectrometry) combines both identification and quantification of known and unknown metabolic targets.

We describe new concepts and developments of mass spectrometry based multi-target metabolome profiling in the field of clinical diagnostics and research. Particularly, the experiences from newborn screening provided important insights about the diagnostic potential of metabolite profiling arrays and directs to the clinical aim of predictive, preventive and personalized medicine by metabolomics.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

The term "metabolome" describes the total quantity of small molecular weight components (metabolites) presented in biological systems. "Metabolomics" is commonly defined as the study of all metabolites (<1500 Da) expressed in a cell, tissue or organism. The concept of metabolomics is complementary to the other 'omics' sciences (genomics and proteomics) (Goodacre et al., 2004). In the field of clinical drug safety assessment, environmental, plant and microbial science the metabolome approach is already established to gain a more global picture of the molecular networks (Hall, 2006; Mashego et al., 2007; Dunn, 2008).

'Clinical metabolomics' aims at evaluating and predicting health and disease risk in an individual by investigating metabolic signatures in body fluids or tissues. These signatures are influenced by the individual genome, possible epigenetic effects by environmental exposures, diet behaviour and life style. To this end, metabolome concepts add significant new information to the individual phenotype beyond genome and proteome analysis. From the analytical point, the sample complexity is less interfering for analytical identification and quantification of metabolites. Metabolome analyses

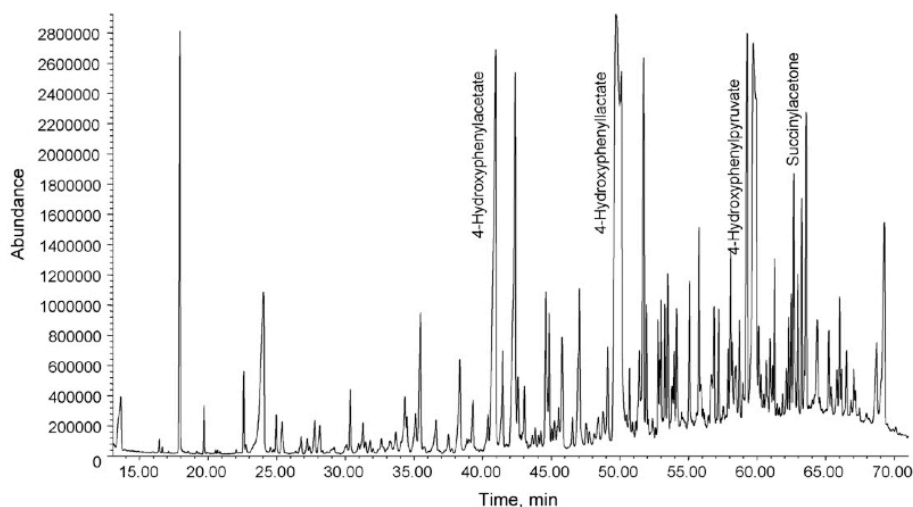
with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) are rapid, reproducible and much economically and therefore applicable in clinical routine and large-scale clinical studies. Technical advances particularly in mass spectrometry increased tremendously the use of the metabolome approach (Dunn et al., 2005). Powerful analytical techniques like LC–MS/MS offer a rapid, effective and economical multi-targeted metabolite profiling. Novel hyphenated techniques, like tandem mass spectrometry coupled with a linear ion trap (QTrap mass spectrometry) combine both identification and quantification of known and unknown targets. In the following we summarize established and new concepts of multi-target metabolome profiling in the field of clinical metabolomics by LC–MS/MS.

#### 2. Mass spectrometric concepts in clinical metabolomics

Metabolites are a class of heterogeneous low molecular-weight components, which are characterized by a wide variation in physical and chemical properties (e.g. polarity, volatility, and solubility). Therefore, different analytical approaches are required according to the different metabolite properties (Dunn et al., 2005; Dettmer et al., 2007). Investigations of metabolites can be performed in two ways: (a) 'non-targeted' analyses, in which a large number of metabolites after minimal sample pre-treatment is analyzed non-biasedly under high throughput conditions or (b) 'targeted'

\* Corresponding author. Tel.: +49 341 9722460; fax: +49 341 9722359.  
E-mail address: [uta.ceglarek@medizin.uni-leipzig.de](mailto:uta.ceglarek@medizin.uni-leipzig.de) (U. Ceglarek).





**Fig. 1.** GC-MS chromatogram of an organic acid analysis in urine from a patient affected with hepatorenal tyrosinosis, an inborn error of metabolism in the tyrosine-metabolism. Only the excretion of the hepatotoxic succinylacetone is evidentiary for the diagnosis of this disease.

analyses including identification and quantification of pre-known metabolites or metabolite classes. The aim of the first approach is the detection of new biomarkers related to the 'healthy vs. diseased' study concept as known from clinical proteomics and genome wide studies (Williams et al., 2005; Wilson et al., 2005; Pattin and Moore, 2008). Time-of-flight mass spectrometry (TOF),  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and direct injection ion trap mass spectrometry are widely used in this field (Dunn, 2008).

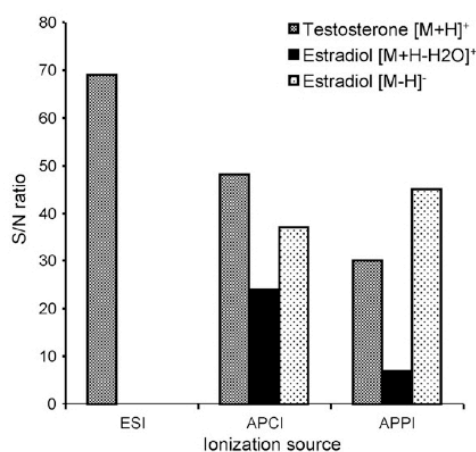
For 'targeted' metabolomics, mass spectrometry with and without chromatography is mainly applied. Gas chromatography combined with electron impact mass spectrometry is the gold standard for the identification and quantification of volatile and thermally stable components. The quantitative analysis of organic acids in biological samples by mass spectrometry was already described in the 1970s (Jellum, 1977; Hoffmann et al., 1989). This approach is still used for diagnostics of a variety of metabolic disorders in urine in the clinical laboratory. The majority of metabolites analyzed by GC-MS requires laborious sample pre-treatment (hydrolyzation, derivatization) and is therefore limited for clinical diagnostic use and large-scale studies. Fig. 1 shows as an example an organic acid urine profile of a patient with hepatorenal tyrosinosis (Weigel et al., 2007). The chromatograms are complex, containing more than 100 metabolite peaks in a run time greater 60 min. Only the detection of the metabolite succinylacetone is indicative for the diagnosis of hepatorenal tyrosinosis, whereas 4-hydroxyphenylacetate, 4-hydroxyphenyllactate and 4-hydroxyphenylpyruvate may be elevated non-specifically in bacterial contaminations and liver immaturity, too.

The quadrupole tandem mass spectrometry platforms, established in the 1990s, are today increasingly used in the field of targeted metabolomics. The application of LC-MS/MS enables the simultaneous quantification of chemically different classes of metabolites without time-consuming and laborious sample pre-treatment (Chace and Kalas, 2005; Dunn et al., 2005). Electrospray (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photo ionization (APPI) are available for ionization of polar to non-polar components (Marquet, 2002; Baumann et al., 2005). In Fig. 2 the different ionization behaviour of the similar molecular structured steroids testosterone and estradiol by ESI, APCI and APPI is shown. The source-dependent generation of

differing charged molecular ion species indicates that ionization conditions dramatically influence the sensitivity of the mass spectrometric detection.

Performing specific MS/MS experiments (precursor scan PS, neutral loss scan NL, and multiple reaction monitoring MRM) selective and sensitive target analysis can be achieved. The remaining limitation of restricted number of MRM transitions per run might be overcome by new software solutions, which enable the use of up to 1000 MRMs by 'scheduled MRM' in one method (Martin et al., 2008).

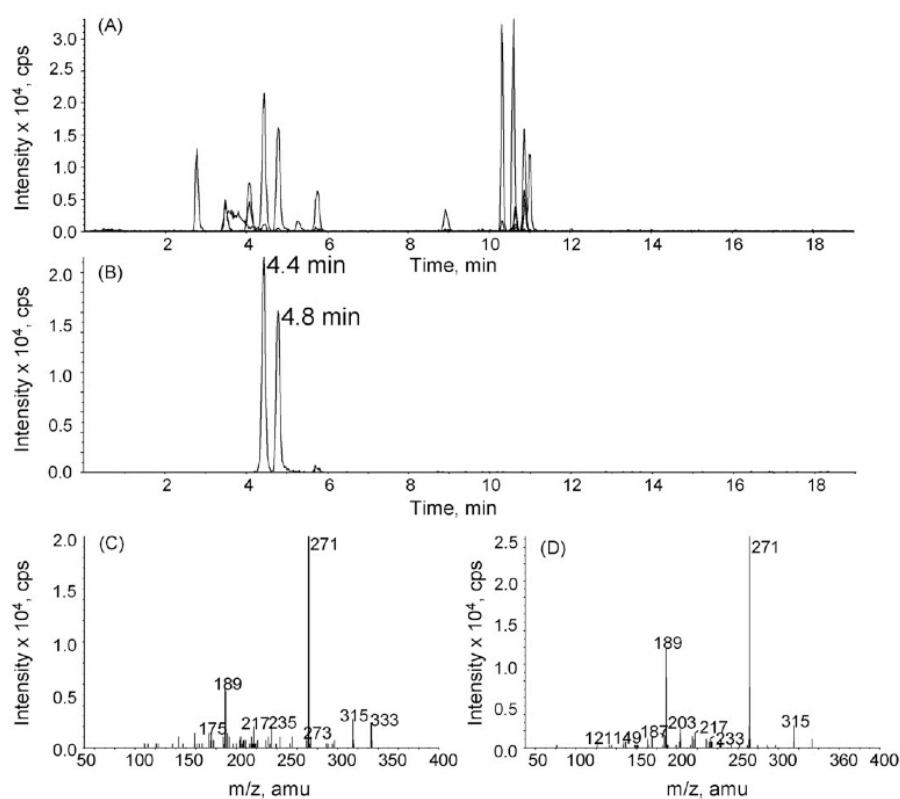
Novel hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometers (QTrap) combine the selective scans of the triple quadrupole with the high speed and high sensitivity of the ion trap allowing metabolite quantification and characterization in one single scan (King and Fernandez-Metzler, 2006). Additionally, the system enables  $\text{MS}^3$  experiments and time delayed fragmentation



**Fig. 2.** Signal/noise ratios of the different ion species for testosterone and estradiol ( $c = 10 \text{ ng/mL}$ ) dependent from the ionization source and charge; ESI: electrospray ionization, APCI: atmospheric pressure chemical ionization, APPI: atmospheric pressure photo ionization.

268

U. Ceglarek et al. / Molecular and Cellular Endocrinology 301 (2009) 266–271



**Fig. 3.** (A) Total ion current of an eicosanoid standard mixture containing prostaglandin E2 (PGE) and prostaglandin D2 (PGD) ( $c = 1 \text{ ng/mL}$ ); (B) MRM transition 351/271 for the isobaric prostaglandins E2 and D2 (C) corresponding fragment spectra for PGE at the retention time 4.4 min and (D) corresponding fragment spectra for PGD at the retention time 4.8 min.

scans for structural elucidation of molecules. In principle the third quadrupole of a tandem mass spectrometer can be used for quantification (quadrupole function) or structural identification (ion trap function). In Fig. 3 the principle of QTrap mass spectrometry is exemplified by an eicosanoid profile analysis. Fig. 3A presents a total ion current (TIC) of a standard mixture of 15 eicosanoids. The analytical method is described by Deems et al. (2007) in detail. Specific MRM transitions were used for quantification of each analyte (Fig. 3B, MRM 351/271). The ion trap function allows a simultaneous structural elucidation via enhanced product ion experiment (EPI). The EPI experiment generates for all mass transitions, exceeding a pre-defined intensity threshold, a simultaneous fragment spectrum without significant loss in signal intensity compared to normal MS/MS analysis. The isobaric prostaglandins PGE 2 and PGD 2 at 4.4 and 4.8 min can be identified by their characteristic fragment pattern using the linear ion trap function (Fig. 3C and D). This can be simply performed by comparison with a spectra library.

In the future, the LC-MS/MS approach may replace GC-MS in the field of high-throughput targeted metabolomics due to the easier sample pre-treatment and the shorter analysis times. On the other hand, the combination of GC with electron impact (EI) mass spectrometry offers advantages like high chromatographic resolution and the availability of spectral libraries, which facilitate the identification of diagnostic markers. Additionally, novel analytical approaches like two-dimensional GC coupled two time-of-flight mass spectrometry enable the simultaneous detection and identification of about 1200 components (Pasikanti et al., 2008). Therefore,

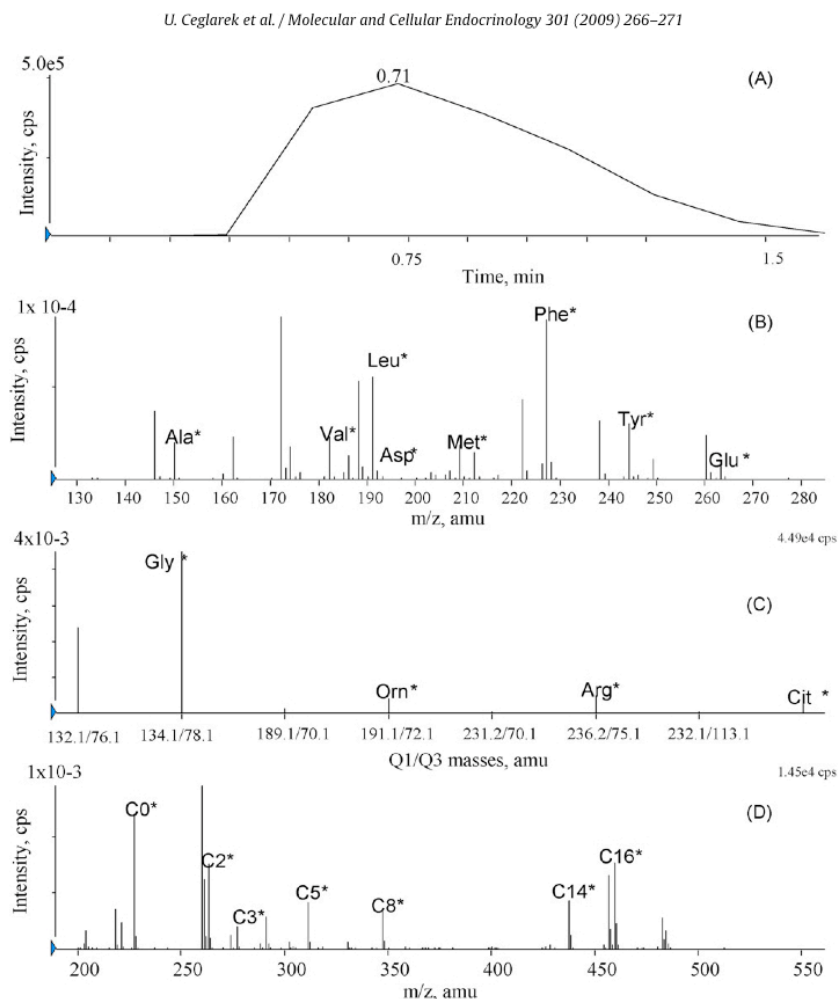
both LC-MS/MS and GC-MS should be used complementary to get the best coverage of metabolites inside the biological sample.

### 3. Metabolite analysis in laboratory diagnostics

Single metabolite tests (e.g. glucose, creatinine, bilirubin, lactate and ammonia) are performed in the daily clinical routine. However, this single test approach limits the diagnostics of certain metabolic and major organ-related diseases.

In contrast, the multiplex metabolomics approach is aimed at the simultaneous analysis of a large number of biological relevant small molecules of various pathways to unveil disease-related metabolic changes. In this context, low molecular weight species like amino acids, fatty acids, carbohydrates, vitamins and lipids in body fluids and tissue are from clinical interest.

The first routine application of tandem mass spectrometry driven targeted metabolite profiling was introduced by Millington and Chace in the 1990s (Rashed et al., 1995; Chace and Kalas, 2005). This innovative technology boosted the worldwide newborn screening programs and enhanced the panel of screening diseases (Tarini, 2007). In the screening panel about 30 metabolic parameters of amino acid and fatty acid metabolism were applied for the detection of inherited metabolic diseases. This was the first multi-parametric metabolic approach which proved as valuable and effective preventive diagnostic strategy (Schulze et al., 2003; Arn, 2007). Today, metabolome approaches for the newborn screening, including pre-analytics, instrumental analysis, data processing



**Fig. 4.** (A) Total ion current of a tandem-MS analysis for the determination of amino acids and acylcarnitines following the direct injection of a derivatized extract of a dried blood newborn sample; (B) neutral loss experiment ( $m/z = 102$ ); (C) selective MRM-transitions for the determination of amino acids and (D) precursor ion experiment ( $m/z = 85^+$ ) for the determination of acylcarnitines.

**Table 1**

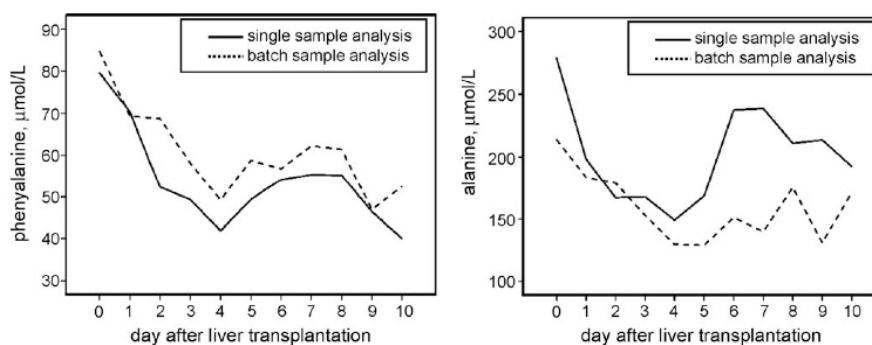
Newborn screening result sheet for selected acylcarnitines: C0 – free carnitine, C5 – isovaleryl carnitine, C5/C3 Ratio – isovaleryl carnitine/propionylcarnitine, C6 – hexanoylcarnitine, C8 – octanoylcarnitine, C8/C10 – octanoylcarnitine/decanoylcarnitine ratio, C8/C12 – octanoylcarnitine/dodecanoylcarnitine ratio, C8/C16 – octanoylcarnitine/hexadecanoylcarnitine ratio.

Sample	Diagnosis	Parameter with upper cut offs in $\mu\text{mol/L}$							
		C0	C5	C5/C3	C6	C8	C8/C10	C8/C12	C8/C16
		50	0.6	0.22	0.24	0.3	4.6	2.9	0.16
S 1	NAD <sup>a</sup>	35.3	0.18	0.07	0.04	0.05	0.25	0.14	0.01
S 2	NAD	15.7	0.19	0.08	0.06	0.11	0.86	1.36	0.05
S 3	IVA <sup>b</sup>	20.7	5.30	2.29	0.05	0.08	0.31	0.30	0.02
S 4	NAD	14.8	0.05	0.05	0.07	0.13	0.53	0.45	0.04
S 5	NAD	29.5	0.14	0.09	0.08	0.14	0.65	1.05	0.04
S 6	NAD	19.8	0.08	0.01	0.04	0.04	0.34	0.16	0.01
S 7	MCADD <sup>c</sup>	10.1	0.10	0.04	1.35	7.42	11.24	41.36	5.14
S 8	NAD	24.9	0.10	0.04	0.03	0.05	0.36	0.27	0.01
S 9	NAD	20.1	0.03	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
S 10	NAD	33.1	0.08	0.04	0.05	0.08	0.83	0.31	0.02

<sup>a</sup> NAD – no abnormality detected.

<sup>b</sup> IVA – isovaleric aciduria.

<sup>c</sup> MCADD – medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency.



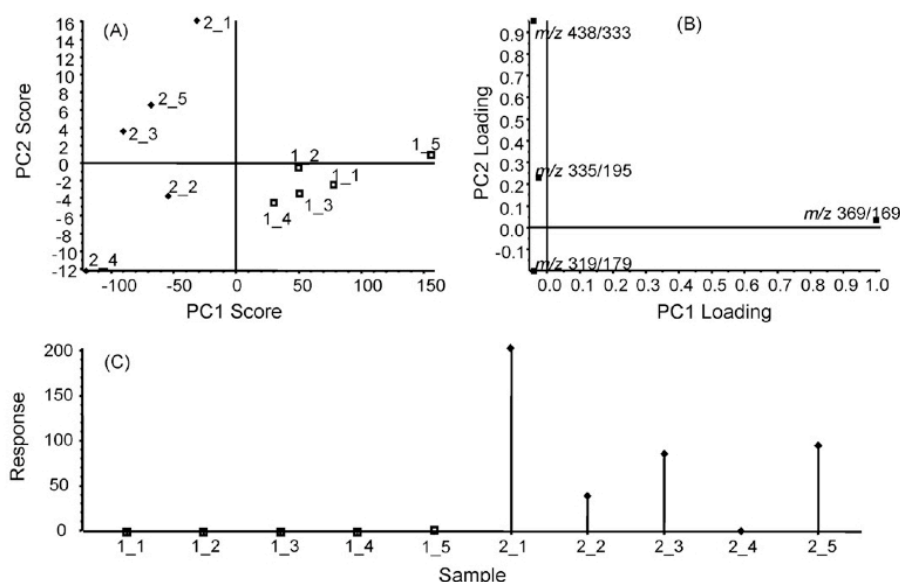
**Fig. 5.** Variability of the tandem mass spectrometric amino acid concentrations over a period of 2 month. Dried blood samples of 8 patients before and 10 days after liver transplantation were collected over a period of 2 month. Aliquots of set A were separately prepared and separately measured directly after each blood taking over a period of 2 month, aliquots of set B were stored till the end of the study at  $-80^{\circ}\text{C}$  and prepared and measured in one single batch; (A) comparison of the time dependent phenylalanine concentration (B) comparison of the time dependent alanine concentration.

and data interpretation are world-wide established (Kayton, 2007; McCabe and McCabe, 2008; Wilcken and Wiley, 2008). Fig. 4A shows the characteristic MS/MS analysis following the direct injection of a derivatized extract of a dried blood spot from a newborn. Within a run time of 1.5 min more than 30 amino acids and acylcarnitines are analyzed using a neutral loss experiment ( $m/z = 102$ ) for amino acids (Fig. 4B), selective MRM-transitions (Fig. 4C), and a precursor ion experiment ( $m/z = 85^{+}$ ) for acylcarnitines (Fig. 4D). The corresponding Table 1 demonstrates an extract of the computational generated excel result sheet, which is generated automatically using a commercially available database. Analyte concentrations are calculated automatically using spiked isotope labeled internal standards. Acylcarnitines results of unaffected newborns, one newborn screening result with isovaleric aciduria (IVA) and medium chain dehydrogenase deficiency (MCADD) are presented. Diagnostic sensitivity and specificity of >99.9% were reported, which underlies the diagnostic potential of the new-

born screening approach (Ceglarek et al., 2002; Fingerhut, 2008). The technology can be applied to a much wider range of compounds and is therefore extendible to others diseases (Wilcken, 2007).

#### 4. Pre-analytical and analytical aspects of clinical metabolomics

Based on the experiences from newborn screening it is well known that pre-analytical and analytical aspects significantly influence the consistency of metabolome data sets. Several questions have to be answered, particularly regarding reproducibility and accuracy of metabolome data generation. The following example presents the time-dependent variability of the tandem mass spectrometric amino acid results (Fig. 5). Dried blood samples of 8 patients before and 10 days after liver transplantation were collected over a period of 2 month. Aliquots of set A were separately



**Fig. 6.** Data interpretation of an eicosanoid stimulation experiments: human macrophages were stimulated with two different inflammatory activators (lipopolysaccharide, LPS and zymosan). The eicosanoid profile was measured by LC-MS/MS using 54 MRM transitions. Computational assisted data interpretations were performed using the commercial software tool MarkerView (SCIEX, Toronto). (A) loading plot for data comparison of the two subsets (B) results of the principle component analysis (C) plotting of the discriminating signal MRM 438/333 (Leukotrien E2) in each of the four replicates.



prepared and separately measured directly after each blood taking over a period of 2 month, aliquots of set B were stored till the end of the study at  $-80^{\circ}\text{C}$  and prepared and measured in one single batch. For phenylalanine no time-dependent differences could be observed between both data sets, but for alanine significant different distributions were obtained. The presented data variance of normal-range alanine concentrations is without relevance for the newborn screening evaluation. However, for metabolome analysis this may have an important impact for the data consistency and should therefore be minimized. As previously shown in the field of clinical proteomics well-defined protocols for precise metabolome analysis and the pre-analytical procedure of blood sampling, sample storage and sample processing are necessary to minimize the data variability (Baumann et al., 2005; Fiedler et al., 2007).

### 5. Data analysis and biostatistics

Data analysis is a predominant bottleneck of all 'omics' sciences. In the field of metabolomics a large number of quantitative data can be generated per single run. For example measuring 200 newborn screening samples/day yield 14800 quantitative data (74 parameters/sample), which have to be immediately processed and clinically validated. Hence, computational tools to handle and interpret the large amounts of data are demanded for data interpretation (Goodacre et al., 2004). Simple statistical approaches frequently provide an appropriate starting point for further bioinformatic analysis, since more sophisticated bioinformatic tools require special expertise and therefore are limited to direct diagnostic use.

In Fig. 6 an example for the analysis of eicosanoids is presented. Human macrophages were incubated with two inflammatory agents. The concomitant modification of the eicosanoid synthesis and oxidation was measured by LC-MS/MS according to the method described by Deems et al. (2007). 54 time-resolved MRM transitions were monitored for each experiment. As result about 1000 mass signals had to be assessed. Computational assisted data interpretations were performed using the commercial software tool MarkerView (SCIEX, Toronto). In Fig. 6A the loading plot and the results of the principle component analysis (PCA) (Fig. 6B) is presented. PCA is a multivariate analysis calculating the factors, which explains the variance of complex data sets. The results of PCA are usually visualized by loading plots or component scores (Steinfath et al., 2007). Visual evaluation was performed by automatic plotting the discriminating signals in the different subsets (Fig. 6C). As shown for the example the best discriminating component between the two subsets of the experiment was the lipoxigenase pathway product leukotriene E4. This example demonstrates that already commercial software tools are sufficient for rapid analysis of the large number of metabolome data.

### 6. Conclusion

The concept of clinical metabolomics aims at investigating disease-related metabolic signatures with the focus on a direct diagnostic application. The experiences from newborn screening provide important insights about the diagnostic potential of metabolome analyses. Novel hyphenated mass spectrometry based analytical techniques enable a rapid, effective and economical identification and quantification of metabolites in different biological specimens. Before starting metabolome experiments standardized protocols for sample pre-treatment and analytical performance are required to minimize data variability. Moreover, the huge amount of metabolome data demands novel bioinformatic strategies. The promising concepts of clinical metabolomics direct to the future of predictive, preventive and personalized medicine.

### References

- Arn, P.H., 2007. Newborn screening: current status. *Health Aff. (Millwood)* 26 (2), 559–566.
- Baumann, S., Ceglarek, U., et al., 2005. Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Chem.* 51 (6), 973–980.
- Ceglarek, U., Muller, P., et al., 2002. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (7), 693–697.
- Chace, D.H., Kalas, T.A., 2005. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin. Biochem.* 38 (4), 296–309 (PMID 15766731).
- Deems, R.A., Buczynski, M.W., et al., 2007. Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Meth. Enzymol.*, vol. 432. Academic Press.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., et al., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26 (1), 51–78.
- Dunn, W.B., 2008. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* 5 (1), 11001.
- Dunn, W.B., Bailey, N.J., et al., 2005. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 130 (5), 606–625.
- Fiedler, G.M., Baumann, S., et al., 2007. Standardized peptide profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Chem.* 53 (3), 421–428.
- Fingerhut, R., 2008. Recall rate and positive predictive value of MSUD screening is not influenced by hydroxyproline. *Eur. J. Pediatr.*
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., et al., 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 22 (5), 245–252.
- Hall, R.D., 2006. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* 169 (3), 453–468.
- Hoffmann, G., Aramaki, S., et al., 1989. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Clin. Chem.* 35 (4), 587–595.
- Jellum, E., 1977. Profiling of human body fluids in healthy and diseased states using gas chromatography and mass spectrometry, with special reference to organic acids. *J. Chromatogr.* 143 (5), 427–462.
- Kayton, A., 2007. Newborn screening: a literature review. *Neonatal Netw.* 26 (2), 85–95.
- King, R., Fernandez-Metzler, C., 2006. The use of Qtrap technology in drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 7 (5), 541–545.
- Marquet, P., 2002. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther. Drug Monit.* 24 (2), 255–276.
- Martin, D.B., Holzman, T., et al., 2008. MRMer: an interactive open-source and cross-platform system for data extraction and visualization of multiple reaction monitoring experiments. *Mol. Cell Proteomics.*
- Mashego, M.R., Rumbold, K., et al., 2007. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol. Lett.* 29 (1), 1–16.
- McCabe, L.L., McCabe, E.R., 2008. Expanded newborn screening: implications for genomic medicine. *Annu. Rev. Med.* 59, 163–175.
- Pasikanti, K.K., Ho, P.C., et al., 2008. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabolomic platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (19), 2984–2992.
- Pattin, K.A., Moore, J.H., 2008. Exploiting the proteome to improve the genome-wide genetic analysis of epistasis in common human diseases. *Hum. Genet.* 124 (1), 19–29.
- Rashed, M.S., Ozand, P.T., et al., 1995. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr. Res.* 38 (3), 324–331.
- Schulze, A., Lindner, M., et al., 2003. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111 (6), 1399–1406.
- Steinfath, M., Reipsilber, D., et al., 2007. Integrated data analysis for genome-wide research. *Exs* 97, 309–329.
- Tarini, B.A., 2007. The current revolution in newborn screening: new technology, old controversies. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161 (8), 767–772.
- Weigel, J.F., Janzen, N., et al., 2007. Tandem mass spectrometric determination of succinylacetone in dried blood spots enables presymptomatic detection in a case of hepatorenal tyrosinaemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (4), 610.
- Wilcken, B., 2007. Recent advances in newborn screening. *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (2), 129–133.
- Wilcken, B., Wiley, V., 2008. Newborn screening. *Pathology* 40 (2), 104–115.
- Williams, R.E., Lenz, E.M., et al., 2005. The metabolomics of aging and development in the rat: an investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using  $^1\text{H}$  NMR and HPLC-TOF MS. *Mol. Biosyst.* 1 (2), 166–175.
- Wilson, I.D., Plumb, R., et al., 2005. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 817 (1), 67–76.

### **4.7 Danksagung**

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Thiery für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und der Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Kongressen.

Mein tiefer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. habil. Uta Ceglarek für die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation.

Meinen Co-Autoren Herr PD Dr. med. Martin Fiedler und Herr Dr. med. Alexander Leichtle danke ich für die Zusammenarbeit. Martin Fiedler gebührt mein besonderer Dank für die kontinuierliche und verlässliche Unterstützung und die intensiven und fruchtbaren Diskussionen, die mich in entscheidender Weise geprägt haben.

Babette Niescher, Linda Kortz, Christin Helmschrodt und Mathis Planert danke ich herzlich für die vielfältige analytische und freundschaftliche Unterstützung.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die uneingeschränkte Unterstützung und Geduld bedanken.

## 5. Supplement

<b>A - Abkürzungen, Molekulargewicht und Massenübergänge (MRM).....</b>	<b>52</b>
<b>B - Materialvergleich .....</b>	<b>55</b>
<b>C - Intravenöse und kapillare Blutentnahme .....</b>	<b>59</b>
<b>D - Trockenzeit bis 24 Stunden .....</b>	<b>61</b>
<b>E - Einfluss des Hämatokrit .....</b>	<b>63</b>
<b>F - Einfluss der Ernährung .....</b>	<b>65</b>
1 Standard-Mahlzeit.....	65
2 Fett-Mahlzeit (Fettemulsion).....	67
3 Fett-Mahlzeit (Sahne) .....	69
4 Oraler Glukose-Toleranz-Test.....	71
5 Unterschiede zwischen Männern und Frauen.....	73
Männer - oraler Glukose-Toleranz-Test.....	77
Frauen - oraler Glukose-Toleranz-Test.....	79
<b>G - Einfluss der körperlichen Aktivität .....</b>	<b>81</b>
<b>H - Wiederfindungsraten, Variationskoeffizienten und Regressionskoeffizienten .....</b>	<b>83</b>
<b>J - Reproduzierbarkeiten .....</b>	<b>84</b>

## A - Abkürzungen, Molekulargewicht und Massenübergänge (MRM)

Auflistung der Abkürzungen, der vollständigen Namen, des Molekulargewichts in Dalton (MW [Da]), der Massenübergänge im Quadrupol 1 (Q1) und 3 (Q3), des massenspektrometrischen Experiments sowie des verwendeten internen Standards (IS) der im Rahmen der Arbeit bestimmten Aminosäuren und Acylcarnitine sowie der verwendeten internen Standards.

### Aminosäuren

Abkürzung	Name	MW [Da]	Q1 m/z	Q3 m/z	Experiment	IS
Gln	Glutamin	146.1	203.1	84	MRM	1
Lys	Lysin	146.2	203.2	84.1	MRM	12
OH-Prol	Hydroxyprolin	131.1	188.1	86.1	NL	2
PiPA	Pipecolinsäure	129.2	186.2	84.1	NL	2
Aba	Abscisinsäure	263.3	320.3	218.2	NL	2
Ala	Alanin	89.1	146.1	44	NL	2
Arg	Arginin	174.2	231.2	70.1	MRM	12
Asp	Asparaginsäure	133.0	246.2	144.1	NL	8
Carn	Carnosin	226.2	283.2	110	MRM	1
Cit	Citrullin	175.2	232.2	113.1	MRM	11
Glu	Glutaminsäure	147.1	260.2	158.1	NL	9
Gly	Glycin	75.1	132.1	76	MRM	1
His	Histidin	155.1	212.1	110.1	NL	5
Leu/Ile	Leucin/Isoleucin	131.2	188.2	86.1	NL	4
MeHis	Methyl-Histidin	169.2	226.2	124.1	NL	6
Met	Methionin	149.1	206.1	104.1	NL	5
Orn	Ornithin	132.2	189.2	70.1	MRM	10
Phe	Phenylalanin	165.2	222.2	120.1	NL	6
Pro	Prolin	115.1	172.1	70.1	NL	4
Sarc	Sarcosin	89.1	146.1	90	MRM	1
Ser	Serin	105.1	162.1	60	NL	2
Tau	Taurin	126.0	126.0	108	MRM	1
Thr	Threonin	119.1	176.1	74.1	NL	3
Trp	Tryptophan	204.2	261.2	159.1	NL	7
Tyr	Tyrosin	181.1	238.1	136.1	NL	7
Val	Valin	117.2	174.2	72.1	NL	3



## Acylcarnitine

Abkürzung	Name	MW [Da]	Q1 m/z	Q3 m/z	Experiment	IS
C0	Carnitin	161.2	218.2	85	PS	13
C2 (263)	Acetylcarnitin	203.2	260.2	85	PS	14
C3	Propionylcarnitin	217.2	274.2	85	PS	15
C3DC	Malonylcarnitin	248.1	360.2	85	PS	15
C4	Butyrylcarnitin	231.2	288.2	85	PS	16
C4-OH	3-Hydroxy-Butyrylcarnitin	247.2	304.2	85	PS	16
C5	Isovalerylcarnitin	245.2	302.2	85	PS	17
C5:1	Tiglylcarnitin	243.2	300.2	85	PS	17
C5 OH	2-Hydroxy-Isovalerylcarnitin	261.4	318.4	85	PS	17
C6	Hexanoylcarnitin	259.3	316.3	85	PS	17
C6DC	Adipylcarnitin	290.2	402.3	85	PS	20
C8	Octanoylcarnitin	287.3	344.3	85	PS	18
C8:1	Octenoylcarnitin	285.3	342.3	85	PS	18
C10	Decanoylcarnitin	315.3	372.3	85	PS	18
C10:1	Decenoylcarnitin	313.3	370.3	85	PS	18
MMA	Methylmalonylcarnitin	262.1	374.3	85	PS	18
Glut	Glutarylcarntin	276.1	388.3	85	PS	18
C12	Dodecanoylcarnitin	343.3	400.3	85	PS	19
MeGlut	3-Methylglutarylarnitin	345.6	402.6	85	PS	19
C14	Myristoylcarnitin	371.4	428.4	85	PS	19
C14:1	Tetradecenoylcarnitin	369.4	426.4	85	PS	19
C14OH	3-Hydroxy-Tetradecanoylcarnitin	387.4	444.4	85	PS	19
C16	Palmitoylcarnitin	399.4	456.4	85	PS	20
C16:1	Hexadecenoylcarnitin	397.4	454.4	85	PS	20
C16:1OH	3-Hydroxy-Hexadecenoylcarnitin	413.4	470.4	85	PS	19
C16OH	3-Hydroxy-Hexadecanoylcarnitin	415.4	472.4	85	PS	19
C18	Stearoylcarnitin	427.4	484.4	85	PS	20
C18:1	Octadecenoylcarnitin	425.4	482.4	85	PS	20
C18:1OH	Hydroxy-Octadec-1-enoylcarnitin	441.4	498.4	85	PS	20
C18:2OH	Hydroxy-Octadec-2-enoylcarnitin	441.4	498.4	85	PS	20
C18OH	3-Hydroxy-Octadecanoylcarnitin	443.4	500.4	85	PS	20
C18:2	Octadecadiencarnitin	423.4	480.4	85	PS	20
C20:1	Eicosaencarnitin	453.5	510.5	85	PS	20
C20:2	Eicosadiencarnitin	451.4	508.4	85	PS	20
C20:3	Eicosatriencarnitin	449.4	506.4	85	PS	20

## Interne Standards

Abkürzung	Interner Standard	MW [Da]	Q1 m/z	Q3 m/z	Experiment
1	15N; 2-13C-Glycin	78.0	135.0	79	MRM
2	2H4-Alanin	93.2	150.2	48.1	NL
3	2H8-Valin	125.3	182.3	80.2	NL
4	2H3-Leucin	134.3	191.3	89.2	NL
5	2H3-Methionin	152.3	209.3	107.2	NL
6	13C6-Phenylalanin	171.0	228.0	126	NL
7	13C6-Tyrosin	187.3	244.3	142.2	NL
8	2H3-Aspartat	136.3	193.3	91.2	NL
9	2H3-Glutamat	206.3	263.3	161.2	NL
10	2H2-Ornithin	134.1	191.1	72	MRM
11	2H2-Citrullin	177.0	234.0	115	MRM
12	2H4; 5-13C-Arginin	179.2	236.2	75.1	MRM
13	2H9-Carnitin (C0)	170.2	227.2	85	PS
14	2H3-Acetylcarnitin (C2)	206.2	263.2	85	PS
15	2H3-Propionylcarnitin (C3)	220.2	277.2	85	PS
16	2H3-Butyrylcarnitin (C4)	234.2	291.2	85	PS
17	2H9-Isovalerylcarnitin (C5)	254.3	311.3	85	PS
18	2H3-Octanoylcarnitin (C8)	290.3	347.3	85	PS
19	2H9-Myristoylcarnitin (C14)	380.4	437.4	85	PS
20	2H3-Palmitoylcarnitin (C16)	402.4	459.4	85	PS

## B - Materialvergleich

Vergleich von EDTA-Trockenblut, Serum, Citrat-, EDTA- und Heparin-Plasma gegen Nativ-Trockenblut (n=15). Angabe des Medians, des 95% Konfidenzintervalls (CI 95), sowie der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag.

### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	Nativ-Trockenblut			EDTA Trockenblut			Serum				
	Median	CI 95		Median	CI 95		p	Median	CI 95		p
Gln	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	0,964	0.04	0.02	0.06	<b>0.000</b>
Lys	172	123	215	159	117	205	0.967	226	164	277	<b>0.000</b>
OH-Prol	324	255	418	302	231	373	0.683	465	376	592	<b>0.000</b>
PiPA	73	53	87	70	60	88	0.539	123	95	184	<b>0.000</b>
Aba	22	18	26	23	17	32	0.902	33	26	46	<b>0.000</b>
Ala	218	184	275	198	192	257	0.050	321	274	399	<b>0.000</b>
Arg	9	7	17	12	6	14	0.074	86	67	118	<b>0.000</b>
Asp	0.06	0.03	0.10	0.06	0.04	0.07	0.424	0.12	0.04	0.19	<b>0.000</b>
Carn	158	103	239	162	118	240	0.506	111	80	133	<b>0.001</b>
Cit	0.05	0.01	0.09	0.05	0.02	0.09	0.765	0.07	0.00	0.55	<b>0.050</b>
Glu	17	13	24	17	13	21	0.512	29	20	42	<b>0.000</b>
Gly	151	124	212	169	122	172	0.074	149	121	182	0.161
His	244	186	320	228	184	328	0.838	313	212	502	<b>0.001</b>
Leu/Ile	6110	931	6145	4149	1329	8642	<b>0.003</b>	9081	1025	22393	0.285
MeHis	120	87	140	106	80	138	0.461	173	140	216	<b>0.000</b>
Met	1.9	1.4	2.8	1.9	1.5	2.9	0.546	3.6	2.2	5.5	<b>0.000</b>
Orn	81	29	104	50	12	104	<b>0.016</b>	101	31	344	<b>0.037</b>
Phe	36	31	66	41	29	47	0.050	69	59	94	<b>0.000</b>
Pro	49	40	54	48	42	56	0.595	75	61	85	<b>0.000</b>
Sarc	201	143	251	168	155	274	0.174	311	228	465	<b>0.000</b>
Ser	0.97	0.81	1.32	0.92	0.81	1.20	0.406	1.04	0.86	1.30	<b>0.023</b>
Tau	107	75	141	105	94	138	0.838	129	82	232	<b>0.026</b>
Thr	0.10	0.07	0.14	0.11	0.07	0.18	1.000	0.25	0.14	0.31	<b>0.000</b>
Trp	61	42	71	56	51	73	0.436	107	77	159	<b>0.000</b>
Tyr	8	6	10	9	7	9	0.126	10	8	12	<b>0.003</b>
Val	60	45	75	64	52	75	0.683	84	69	113	<b>0.000</b>

Acylcarnitine [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Nativ-Trockenblut			EDTA Trockenblut				Serum			
	Median	CI 95		Median	CI 95		p	Median	CI 95		p
C0	18	14	22	17	13	21	0.775	28	22	34	<b>0.000</b>
C2	10	7	13	10	7	12	0.935	9	8	11	0.267
C3	1.3	0.7	2.2	1.2	0.7	2.4	0.631	0.7	0.5	1.3	<b>0.000</b>
C3DC	0.09	0.06	0.12	0.08	0.04	0.12	0.687	0.20	0.10	0.41	<b>0.000</b>
C4	0.20	0.15	0.29	0.19	0.14	0.23	0.570	0.35	0.28	0.60	<b>0.000</b>
C4OH	0.08	0.06	0.11	0.08	0.06	0.12	0.814	0.13	0.05	0.24	<b>0.003</b>
C5	0.11	0.09	0.14	0.10	0.08	0.15	0.646	0.15	0.11	0.29	<b>0.000</b>
C5OHHMG	0.18	0.16	0.23	0.18	0.12	0.22	0.860	0.11	0.07	0.18	<b>0.000</b>
C5:1	0.03	0.02	0.05	0.04	0.03	0.06	0.963	0.11	0.05	0.14	<b>0.000</b>
C6	0.07	0.02	0.09	0.06	0.04	0.08	0.081	0.13	0.07	0.24	<b>0.000</b>
C6DC	0.03	0.02	0.05	0.03	0.01	0.04	0.187	0.07	0.00	0.12	<b>0.000</b>
C8	0.11	0.06	0.20	0.12	0.07	0.15	0.658	0.22	0.12	0.32	<b>0.000</b>
C8:1	0.09	0.04	0.19	0.10	0.04	0.19	0.735	0.23	0.06	0.45	<b>0.000</b>
C10	0.13	0.08	0.26	0.17	0.09	0.22	0.959	0.29	0.10	0.49	<b>0.003</b>
C10:1	0.05	0.04	0.12	0.06	0.03	0.10	0.099	0.15	0.05	0.28	<b>0.000</b>
C12	0.09	0.08	0.14	0.10	0.07	0.13	0.177	0.15	0.08	0.26	<b>0.000</b>
C14	0.12	0.06	0.16	0.11	0.06	0.16	0.878	0.09	0.02	0.12	<b>0.023</b>
C14:1	0.05	0.04	0.07	0.06	0.04	0.07	0.995	0.08	0.04	0.12	<b>0.000</b>
C14OH	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.747	0.01	0.00	0.06	0.832
C16	0.92	0.49	1.06	0.86	0.45	1.05	0.976	0.24	0.10	0.45	<b>0.000</b>
C16:1	0.05	0.03	0.08	0.05	0.03	0.07	0.656	0.04	0.00	0.06	<b>0.004</b>
C16:1OH	0.02	0.00	0.03	0.01	0.01	0.03	0.742	0.01	0.00	0.02	<b>0.018</b>
C16OH	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	1.000	0.01	0.00	0.03	0.446
Glut	0.03	0.01	0.05	0.03	0.02	0.05	0.793	0.08	0.05	0.14	<b>0.000</b>
MeGlut	0.03	0.02	0.05	0.03	0.01	0.04	0.234	0.07	0.00	0.13	<b>0.000</b>
MMA	0.25	0.18	0.29	0.24	0.17	0.31	0.975	0.10	0.00	0.15	<b>0.000</b>
C18	0.60	0.24	0.69	0.57	0.25	0.70	0.383	0.12	0.03	0.19	<b>0.000</b>
C18:1	0.62	0.38	0.81	0.53	0.43	0.73	0.546	0.10	0.04	0.13	<b>0.000</b>
C18:1OH	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	0.747	0.00	0.00	0.02	0.462
C18:2	0.12	0.07	0.21	0.13	0.07	0.16	0.380	0.03	0.01	0.07	<b>0.000</b>
C18:2OH	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.080	0.01	0.00	0.03	0.057
C18OH	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	0.608	0.01	0.00	0.02	0.242
C20:1	0.03	0.02	0.05	0.03	0.01	0.03	0.133	0.02	0.00	0.04	<b>0.005</b>
C20:2	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	1.000	0.01	0.00	0.02	0.327
C20:3	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.03	0.773	0.01	0.00	0.04	0.487

*Fortsetzung Materialvergleich*

## Aminosäuren

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Nativ-Trockenblut	Citrat-Plasma		EDTA-Plasma		LiHep-Plasma	
	Median	Median	p	Median	p	Median	p
Gln	0.02	0.04	<b>0.000</b>	0.04	<b>0.000</b>	0.05	<b>0.000</b>
Lys	172	215	<b>0.000</b>	235	<b>0.000</b>	197	<b>0.008</b>
OH-Prol	324	351	<b>0.029</b>	411	<b>0.000</b>	477	<b>0.000</b>
PiPA	73	105	<b>0.000</b>	128	<b>0.000</b>	131	<b>0.000</b>
Aba	22	29	<b>0.000</b>	34	<b>0.000</b>	32	<b>0.000</b>
Ala	218	260	<b>0.000</b>	302	<b>0.000</b>	317	<b>0.000</b>
Arg	9	56	<b>0.000</b>	64	<b>0.000</b>	67	<b>0.000</b>
Asp	0.06	0.07	0.478	0.10	<b>0.000</b>	0.12	<b>0.000</b>
Carn	158	46	<b>0.000</b>	225	<b>0.000</b>	69	<b>0.000</b>
Cit	0.05	0.06	0.082	0.05	0.605	0.07	<b>0.009</b>
Glu	17	25	<b>0.001</b>	30	<b>0.000</b>	31	<b>0.000</b>
Gly	151	114	<b>0.000</b>	129	<b>0.000</b>	146	<b>0.026</b>
His	244	269	0.425	321	<b>0.008</b>	299	0.061
Leu/Ile	6110	8418	<b>0.000</b>	8276	<b>0.000</b>	3623	0.486
MeHis	120	151	<b>0.000</b>	178	<b>0.000</b>	177	<b>0.000</b>
Met	1.9	3.4	<b>0.000</b>	3.7	<b>0.000</b>	3.9	<b>0.000</b>
Orn	81	171	<b>0.000</b>	119	<b>0.000</b>	76	<b>0.010</b>
Phe	36	63	<b>0.000</b>	79	<b>0.000</b>	74	<b>0.000</b>
Pro	49	61	<b>0.000</b>	68	<b>0.000</b>	68	<b>0.000</b>
Sarc	201	268	<b>0.000</b>	341	<b>0.000</b>	301	<b>0.000</b>
Ser	0.97	0.95	0.583	1.04	0.074	1.00	0.430
Tau	107	85	<b>0.046</b>	117	0.555	151	<b>0.010</b>
Thr	0.10	0.22	<b>0.000</b>	0.23	<b>0.000</b>	0.28	<b>0.000</b>
Trp	61	78	<b>0.000</b>	99	<b>0.000</b>	112	<b>0.000</b>
Tyr	8	8	<b>0.012</b>	9	0.066	8	0.104
Val	60	81	<b>0.000</b>	92	<b>0.000</b>	87	<b>0.000</b>

Acylcarnitine [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Nativ- Trockenblut	Citrat-Plasma		EDTA-Plasma		LiHep-Plasma	
	Median	Median	p	Median	p	Median	p
C0	18	23	<b>0.000</b>	27	<b>0.000</b>	28	<b>0.000</b>
C2	10	7	<b>0.000</b>	8	<b>0.015</b>	9	<b>0.033</b>
C3	1.3	0.9	<b>0.000</b>	1.2	0.393	0.8	<b>0.001</b>
C3DC	0.09	0.19	<b>0.000</b>	0.23	<b>0.000</b>	0.18	<b>0.000</b>
C4	0.20	0.38	<b>0.000</b>	0.39	<b>0.000</b>	0.35	<b>0.000</b>
C4OH	0.08	0.21	<b>0.000</b>	0.19	<b>0.000</b>	0.12	<b>0.000</b>
C5	0.11	0.16	<b>0.000</b>	0.21	<b>0.000</b>	0.16	<b>0.000</b>
C5OHHMG	0.18	0.11	<b>0.000</b>	0.11	<b>0.000</b>	0.10	<b>0.000</b>
C5:1	0.03	0.11	<b>0.000</b>	0.13	<b>0.000</b>	0.12	<b>0.000</b>
C6	0.07	0.13	<b>0.000</b>	0.13	<b>0.000</b>	0.11	<b>0.000</b>
C6DC	0.03	0.05	<b>0.000</b>	0.11	<b>0.000</b>	0.05	<b>0.000</b>
C8	0.11	0.25	<b>0.000</b>	0.21	<b>0.000</b>	0.22	<b>0.000</b>
C8:1	0.09	0.19	<b>0.003</b>	0.25	<b>0.000</b>	0.18	<b>0.000</b>
C10	0.13	0.29	<b>0.000</b>	0.29	<b>0.016</b>	0.28	<b>0.001</b>
C10:1	0.05	0.14	<b>0.000</b>	0.15	<b>0.000</b>	0.15	<b>0.000</b>
C12	0.09	0.17	<b>0.000</b>	0.18	<b>0.001</b>	0.15	<b>0.000</b>
C14	0.12	0.09	<b>0.049</b>	0.09	0.065	0.09	<b>0.027</b>
C14:1	0.05	0.06	0.653	0.06	0.409	0.08	<b>0.000</b>
C14OH	0.02	0.02	0.071	0.01	0.950	0.02	0.151
C16	0.92	0.29	<b>0.000</b>	0.35	<b>0.000</b>	0.27	<b>0.000</b>
C16:1	0.05	0.04	<b>0.017</b>	0.03	<b>0.001</b>	0.02	<b>0.000</b>
C16:1OH	0.02	0.01	<b>0.032</b>	0.01	0.120	0.01	<b>0.033</b>
C16OH	0.01	0.01	0.179	0.01	0.485	0.01	<b>0.023</b>
Glut	0.03	0.08	<b>0.000</b>	0.09	<b>0.000</b>	0.06	<b>0.000</b>
MeGlut	0.03	0.05	<b>0.000</b>	0.12	<b>0.000</b>	0.06	<b>0.000</b>
MMA	0.25	0.09	<b>0.000</b>	0.09	<b>0.000</b>	0.08	<b>0.000</b>
C18	0.60	0.11	<b>0.000</b>	0.13	<b>0.000</b>	0.11	<b>0.000</b>
C18:1	0.62	0.07	<b>0.000</b>	0.10	<b>0.000</b>	0.11	<b>0.000</b>
C18:1OH	0.01	0.01	0.653	0.01	0.158	0.01	0.367
C18:2	0.12	0.02	<b>0.000</b>	0.03	<b>0.000</b>	0.04	<b>0.000</b>
C18:2OH	0.01	0.01	0.495	0.02	<b>0.021</b>	0.01	<b>0.002</b>
C18OH	0.00	0.01	0.115	0.00	0.705	0.01	<b>0.030</b>
C20:1	0.03	0.01	<b>0.000</b>	0.01	<b>0.000</b>	0.01	<b>0.000</b>
C20:2	0.01	0.04	<b>0.001</b>	0.01	0.188	0.01	0.164
C20:3	0.01	0.01	0.737	0.00	0.146	0.02	<b>0.050</b>

## C - Intravenöse und kapillare Blutentnahme

Vergleich intravenöser und kapillarer Blutentnahme (n=5). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls.

### Aminosäuren

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	kapillär	venös	p
	Median	Median	
Gln	7,74	5,52	0,548
Lys	322	295	0,095
OH-Prol	251	285	0,222
PiPA	75	90	0,841
Aba	15	16	1,000
Ala	225	218	1,000
Arg	10	9	0,421
Asp	222	356	0,222
Carn	0,06	0,05	1,000
Cit	27	28	0,548
Glu	113	111	0,841
Gly	234	224	1,000
His	184	207	0,222
Leu/Ile	108	103	1,000
MeHis	3,0	3,1	0,841
Met	18	21	0,310
Orn	42	78	<b>0,008</b>
Phe	53	56	0,222
Pro	301	237	0,690
Sarc	85,44	95,75	0,310
Ser	81	109	<b>0,032</b>
Tau	0,59	1,20	<b>0,008</b>
Thr	77	84	0,690
Trp	10	8	0,095
Tyr	48	47	1,000
Val	197	193	0,841

Acylcarnitine [µmol/l]	kapillär	venös	p
	Median	Median	
C0	26	26	0,841
C2	14	13	0,310
C3	1,5	1,5	1,000
C3DC	0,00	0,04	0,151
C4	0,18	0,18	1,000
C4OH	0,06	0,07	0,690
C5	0,15	0,11	0,056
C5OHHMG	0,16	0,17	1,000
C5:1	0,00	0,00	1,000
C6	0,03	0,04	0,151
C6DC	0,00	0,00	1,000
C8	0,05	0,07	0,095
C8:1	0,07	0,10	0,548
C10	0,08	0,13	0,421
C10:1	0,05	0,08	0,151
C12	0,04	0,06	0,056
C14	0,11	0,14	0,421
C14:1	0,04	0,04	0,841
C14OH	0,00	0,00	0,310
C16	0,96	1,02	0,841
C16:1	0,04	0,07	0,095
C16:1OH	0,05	0,05	0,841
C16OH	0,00	0,00	0,690
Glut	0,00	0,04	0,095
MeGlut	0,00	0,00	1,000
MMA	0,39	0,31	0,310
C18	0,70	0,84	0,421
C18:1	0,96	1,00	0,548
C18:1OH	0,00	0,00	1,000
C18:2	0,23	0,27	0,421
C18:2OH	0,00	0,00	1,000
C18OH	0,00	0,00	1,000
C20:1	0,02	0,04	0,548
C20:2	0,00	0,00	0,841
C20:3	0,00	0,00	0,690



## D - Trockenzeit bis 24 Stunden

Vergleich der Trockenzeit bei 6h Raumtemperatur (RT), 12h RT und 24h RT gegen 3h RT (n=5). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls.

### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	3h RT	6h RT		12h RT		24h RT	
	Median	Median	p	Median	p	Median	p
Gln	5,8	5,8	0,799	5,1	0,143	4,8	0,101
Lys	391	356	<b>0,039</b>	361	0,078	380	0,551
OH-Prol	452	397	<b>0,039</b>	379	<b>0,045</b>	394	0,089
PiPA	89	76	<b>0,045</b>	77	0,219	78	0,078
Aba	31	28	<b>0,033</b>	27	0,143	30	0,443
Ala	291	267	0,089	265	0,143	288	0,671
Arg	17	15	<b>0,000</b>	19	<b>0,014</b>	23	<b>0,000</b>
Asp	465	486	0,799	366	0,114	427	0,319
Carn	0,02	0,05	0,268	0,01	0,922	0,01	0,592
Cit	15	15	0,266	15	0,755	16	0,514
Glu	111	115	0,551	109	1,000	98	0,060
Gly	285	274	0,068	249	<b>0,010</b>	276	0,410
His	239	226	0,590	237	0,977	213	0,713
Leu/Ile	110	103	<b>0,028</b>	95	<b>0,005</b>	103	0,128
MeHis	1,9	1,4	<b>0,010</b>	1,5	0,052	1,7	0,128
Met	27	24	<b>0,028</b>	24	0,114	27	0,630
Orn	75	75	0,551	69	<b>0,028</b>	66	<b>0,000</b>
Phe	55	50	<b>0,024</b>	50	0,178	56	0,590
Pro	258	242	<b>0,198</b>	248	0,478	272	0,630
Sarc	81	70	<b>0,008</b>	62	<b>0,001</b>	69	<b>0,003</b>
Ser	152	141	0,178	137	0,178	132	<b>0,010</b>
Tau	0,7	0,7	0,713	0,7	0,410	0,7	1,000
Thr	83	77	0,114	77	0,078	82	1,000
Trp	9	7	0,068	7	0,089	7	0,319
Tyr	51	48	0,347	48	0,590	54	0,242
Val	191	184	0,242	185	0,590	193	0,843

Acylcarnitine [ $\mu\text{mol/l}$ ]	3h RT	6h RT		12h RT		24h RT	
	Median	Median	p	Median	p	Median	p
C0	26	23	0,089	22	0,198	27	0,378
C2	17	15	<b>0,010</b>	13	<b>0,000</b>	14	0,060
C3	2,8	2,6	0,514	1,9	0,052	2,3	0,370
C3DC	0,00	0,06	0,172	0,00	0,976	0,06	0,070
C4	0,13	0,12	0,724	0,15	0,410	0,08	0,562
C4OH	0,11	0,09	0,298	0,06	0,051	0,05	<b>0,005</b>
C5	0,11	0,13	0,410	0,08	0,198	0,11	0,977
C5OHHMG	0,19	0,18	0,799	0,20	0,671	0,19	1,000
C5:1	0,00	0,02	0,730	0,00	0,379	0,00	0,328
C6	0,01	0,02	0,873	0,03	0,834	0,03	0,469
C6DC	0,00	0,00	0,590	0,00	0,730	0,00	0,863
C8	0,01	0,03	0,830	0,02	0,592	0,07	<b>0,029</b>
C8:1	0,05	0,03	0,647	0,00	0,115	0,00	0,569
C10	0,11	0,10	0,944	0,12	0,843	0,15	0,051
C10:1	0,00	0,02	0,829	0,00	0,928	0,06	<b>0,008</b>
C12	0,04	0,03	0,379	0,06	0,172	0,06	0,553
C14	0,17	0,12	0,143	0,13	0,219	0,13	0,671
C14:1	0,01	0,02	0,642	0,02	0,698	0,02	0,592
C14OH	0,00	0,01	0,932	0,00	0,739	0,00	0,863
C16	1,15	1,09	0,478	0,90	<b>0,000</b>	1,07	0,590
C16:1	0,03	0,03	0,786	0,03	0,752	0,04	0,345
C16:1OH	0,04	0,06	0,269	0,05	0,666	0,05	0,849
C16OH	0,00	0,01	0,466	0,00	0,739	0,00	1,000
Glut	0,00	0,04	0,379	0,00	0,443	0,00	0,617
MeGlut	0,00	0,01	0,590	0,00	0,874	0,00	0,863
MMA	0,33	0,36	0,887	0,27	0,478	0,39	0,755
C18	0,63	0,61	0,887	0,57	0,147	0,68	0,843
C18:1	0,99	0,95	0,630	0,84	0,160	0,85	0,630
C18:1OH	0,00	0,00	0,478	0,00	0,739	0,00	0,727
C18:2	0,24	0,20	0,443	0,24	0,977	0,21	0,630
C18:2OH	0,00	0,01	0,892	0,00	0,590	0,00	0,676
C18OH	0,00	0,00	1,000	0,00	1,000	0,00	1,000
C20:1	0,03	0,03	0,677	0,04	0,760	0,00	0,206
C20:2	0,00	0,00	1,000	0,00	0,342	0,00	0,739
C20:3	0,00	0,00	0,478	0,00	0,478	0,00	0,478

## E - Einfluss des Hämatokrit

Untersuchung zum Einfluss des Hämatokrits (n=5, 12-fach). Angabe des Medians, des 95% Konfidenzintervalls (CI 95), sowie der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag.

### Aminosäuren

Parameter [µmol/l]	100% EDTA-Blut			75% EDTA-Blut			66% EDTA-Blut				
	Median	CI 95		Median	CI 95		p	Median	CI 95		p
Gln	6	2	15	6	1	12	0,250	5	1	20	0,094
Lys	280	205	464	184	144	305	<b>0,000</b>	162	102	284	<b>0,000</b>
OH-Prol	299	189	469	195	132	388	<b>0,000</b>	188	96	360	<b>0,000</b>
PiPA	90	50	181	66	38	120	<b>0,000</b>	56	42	128	<b>0,000</b>
Aba	16	9	33	10	5	19	<b>0,000</b>	10	5	19	<b>0,000</b>
Ala	239	172	366	158	110	255	<b>0,000</b>	145	90	270	<b>0,000</b>
Arg	9	7	16	6	4	11	<b>0,000</b>	6	4	10	<b>0,000</b>
Asp	367	119	2713	261	115	2267	<b>0,007</b>	234	60	2397	<b>0,002</b>
Carn	0	0	0	0	0	0	<b>0,025</b>	0	0	0	<b>0,019</b>
Cit	27	19	42	19	12	27	<b>0,000</b>	18	10	29	<b>0,000</b>
Glu	121	83	176	83	58	145	<b>0,000</b>	77	52	114	<b>0,000</b>
Gly	228	161	303	158	107	255	<b>0,000</b>	141	80	219	<b>0,000</b>
His	207	127	2799	230	103	2657	0,678	187	95	22102	0,532
Leu/Ile	103	61	166	66	44	112	<b>0,000</b>	65	32	131	<b>0,000</b>
MeHis	3	2	4	2	1	3	<b>0,000</b>	2	1	3	<b>0,000</b>
Met	19	11	52	15	8	42	<b>0,000</b>	14	8	580	<b>0,000</b>
Orn	78	59	109	59	43	136	<b>0,000</b>	58	37	117	<b>0,000</b>
Phe	54	39	75	36	25	50	<b>0,000</b>	31	21	51	<b>0,000</b>
Pro	234	87	376	143	63	239	<b>0,000</b>	128	39	308	<b>0,000</b>
Sarc	103	76	153	64	47	102	<b>0,000</b>	57	38	112	<b>0,000</b>
Ser	105	63	137	82	54	172	<b>0,000</b>	71	38	151	<b>0,000</b>
Tau	1	1	3	1	1	2	<b>0,002</b>	1	0	3	<b>0,000</b>
Thr	83	56	147	61	32	97	<b>0,000</b>	52	29	96	<b>0,000</b>
Trp	8	5	11	5	4	8	<b>0,000</b>	5	3	8	<b>0,000</b>
Tyr	48	36	78	34	24	51	<b>0,000</b>	28	18	46	<b>0,000</b>
Val	183	130	271	129	95	193	<b>0,000</b>	118	81	181	<b>0,000</b>

## Acylcarnitine

Parameter [µmol/l]	100% EDTA-Blut			75% EDTA-Blut			66% EDTA-Blut				
	Median	CI 95		Median	CI 95		p	Median	CI 95		p
C0	26	18	46	16	11	27	<b>0,000</b>	15	9	29	<b>0,000</b>
C2	13	8	22	9	6	13	<b>0,000</b>	8	5	13	<b>0,000</b>
C3	1,33	0,74	3,02	0,93	0,40	1,69	<b>0,000</b>	0,78	0,43	1,63	<b>0,000</b>
C3DC	0,04	0,00	0,25	0,03	0,00	0,16	0,102	0,00	0,00	0,15	0,126
C4	0,20	0,05	0,36	0,13	0,01	0,34	<b>0,000</b>	0,10	0,01	0,23	<b>0,000</b>
C4OH	0,06	0,00	0,15	0,03	0,00	0,16	<b>0,000</b>	0,03	0,00	0,13	<b>0,000</b>
C5	0,11	0,02	0,31	0,08	0,00	0,26	<b>0,000</b>	0,08	0,00	0,21	<b>0,000</b>
C5OHHMG	0,17	0,02	0,58	0,10	0,02	0,31	<b>0,000</b>	0,11	0,00	0,25	<b>0,000</b>
C5:1	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,10	0,519	0,00	0,00	0,07	0,500
C6	0,04	0,00	0,12	0,03	0,00	0,09	<b>0,011</b>	0,02	0,00	0,09	<b>0,004</b>
C6DC	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,05	0,566	0,00	0,00	0,05	0,316
C8	0,07	0,00	0,22	0,04	0,00	0,19	<b>0,003</b>	0,04	0,00	0,16	<b>0,000</b>
C8:1	0,09	0,00	0,29	0,04	0,00	0,13	<b>0,000</b>	0,04	0,00	0,16	<b>0,000</b>
C10	0,13	0,00	0,38	0,09	0,00	0,27	<b>0,018</b>	0,08	0,00	0,27	<b>0,000</b>
C10:1	0,07	0,00	0,21	0,01	0,00	0,15	<b>0,000</b>	0,03	0,00	0,19	<b>0,000</b>
C12	0,05	0,00	0,15	0,04	0,00	0,11	<b>0,001</b>	0,03	0,00	0,17	<b>0,000</b>
C14	0,14	0,00	0,34	0,08	0,00	0,19	<b>0,000</b>	0,08	0,01	0,20	<b>0,000</b>
C14:1	0,04	0,00	0,13	0,02	0,00	0,27	0,110	0,01	0,00	0,08	<b>0,018</b>
C14OH	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,200	0,00	0,00	0,04	0,191
C16	1,08	0,51	2,00	0,71	0,45	1,28	<b>0,000</b>	0,65	0,38	1,21	<b>0,000</b>
C16:1	0,07	0,00	0,15	0,03	0,00	0,13	<b>0,000</b>	0,03	0,00	0,11	<b>0,000</b>
C16:1OH	0,04	0,00	0,19	0,04	0,00	0,39	0,138	0,03	0,00	0,10	<b>0,004</b>
C16OH	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,04	<b>0,010</b>	0,00	0,00	0,04	<b>0,001</b>
Glut	0,04	0,00	0,20	0,00	0,00	0,10	<b>0,000</b>	0,00	0,00	0,12	<b>0,001</b>
MeGlut	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,05	0,548	0,00	0,00	0,05	0,318
MMA	0,37	0,16	0,88	0,29	0,10	0,77	<b>0,001</b>	0,28	0,12	0,67	<b>0,002</b>
C18	0,80	0,40	1,75	0,54	0,30	0,94	<b>0,000</b>	0,44	0,22	0,92	<b>0,000</b>
C18:1	0,99	0,57	1,48	0,66	0,39	1,20	<b>0,000</b>	0,59	0,30	1,35	<b>0,000</b>
C18:1OH	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	0,619	0,00	0,00	0,03	0,248
C18:2	0,26	0,12	0,62	0,17	0,05	0,35	<b>0,000</b>	0,13	0,03	0,36	<b>0,000</b>
C18:2OH	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,472	0,00	0,00	0,04	<b>0,023</b>
C18OH	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,04	0,583	0,00	0,00	0,02	0,180
C20:1	0,03	0,00	0,09	0,02	0,00	0,08	<b>0,001</b>	0,00	0,00	0,06	<b>0,000</b>
C20:2	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,09	<b>0,000</b>	0,00	0,00	0,04	<b>0,006</b>
C20:3	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,05	<b>0,026</b>	0,00	0,00	0,04	<b>0,018</b>

## F - Einfluss der Ernährung

### 1 Standard-Mahlzeit

Untersuchung zum Einfluss der Ernährung nach Aufnahme einer Standard-Mahlzeit (n=10). Angabe des Medians, des 95% Konfidenzintervalls (CI 95), sowie der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test und dem Wilcoxon-Test in Klammern (p), da keine Normalverteilung vorlag. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

#### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	Vor Nahrungsaufnahme (A)			3h postprandial (B)				5h postprandial (C)			
	Median	CI 95		Median	CI 95		p <sub>A-B</sub>	Median	CI 95		p <sub>A-C</sub>
Gln	10,21	7,35	11,33	11,25	8,71	16,45	<b>0,030 (0,013)</b>	11,98	9,21	15,43	<b>0,013 (0,028)</b>
Lys*	390,81	302,22	466,44	417,55	288,86	489,27	0,529	412,13	265,06	491,90	0,842
OH-Prol	271,34	216,62	389,25	345,89	296,96	489,18	<b>0,002 (0,005)</b>	384,44	261,12	491,60	<b>0,006 (0,028)</b>
PiPA	70,84	55,59	92,21	79,77	55,65	117,95	0,247	85,03	71,31	102,80	0,095
Aba	16,36	7,81	22,47	17,05	8,75	31,41	0,617	17,81	11,55	24,66	0,842
Ala	222,03	177,90	371,43	238,98	200,32	368,48	0,436	250,54	198,53	416,52	0,211
Arg	14,58	6,77	21,40	14,36	7,39	20,05	0,929	12,86	7,87	19,44	0,780
Asp	90,22	53,01	209,77	115,16	68,78	196,97	0,247	99,57	53,53	218,25	0,661
Carn	0,04	0,00	0,22	0,06	0,00	0,16	0,694	0,08	0,00	0,20	0,383
Cit	18,85	8,68	25,51	17,96	8,95	25,00	0,529	16,25	10,43	26,85	0,447
Glu	105,81	72,81	148,24	122,76	70,70	142,14	0,481	117,51	71,84	143,87	0,447
Gly	164,63	104,08	250,62	176,96	104,88	230,50	0,955	170,21	106,84	232,56	0,905
His	89,14	73,30	109,26	114,93	87,77	177,81	<b>0,029 (0,093)</b>	162,22	101,46	254,67	<b>0,000 (0,011)</b>
Leu/Ile*	77,94	64,12	103,48	108,89	79,52	136,31	<b>0,001 (0,005)</b>	106,79	82,26	142,26	<b>0,003 (0,021)</b>
MeHis	1,50	0,80	2,10	1,43	1,04	2,63	0,699	1,73	0,86	2,33	0,604
Met*	14,66	11,07	23,56	20,39	13,70	30,39	<b>0,007 (0,007)</b>	20,87	11,26	26,55	<b>0,013 (0,028)</b>
Orn	52,91	34,45	65,22	65,20	37,50	110,72	<b>0,029 (0,005)</b>	64,89	41,00	167,66	<b>0,022 (0,021)</b>
Phe*	39,56	28,67	61,05	57,86	51,15	67,01	<b>0,001 (0,007)</b>	55,35	52,68	67,72	<b>0,001 (0,011)</b>
Pro	117,64	67,47	165,86	184,69	118,15	239,65	<b>0,001 (0,005)</b>	194,01	118,21	256,03	<b>0,002 (0,008)</b>
Sarc	85,61	65,70	122,86	96,91	75,37	138,11	0,105	103,49	82,54	147,37	<b>0,008 (0,011)</b>
Ser	65,87	53,03	76,86	70,42	53,65	85,09	0,315	83,33	57,78	126,99	<b>0,017 (0,038)</b>
Tau	1,06	0,66	1,26	1,17	0,77	1,48	0,160	1,15	0,91	1,47	0,113
Thr*	55,69	39,31	89,62	62,39	49,47	90,06	0,436	68,74	45,74	96,48	0,356
Trp*	7,48	5,63	10,78	7,51	5,79	11,05	0,853	7,70	5,91	9,29	0,842
Tyr	36,63	30,45	59,63	56,69	45,48	68,41	<b>0,000 (0,005)</b>	57,79	47,56	84,11	<b>0,000 (0,011)</b>
Val*	160,31	135,76	209,82	192,64	162,03	247,84	<b>0,009 (0,017)</b>	188,46	166,08	220,47	<b>0,013 (0,051)</b>

## Acylcarnitine

Parameter [μmol/l]	Vor Nahrungsaufnahme (A)			3h postprandial (B)				5h postprandial (C)			
	Median	CI 95		Median	CI 95		p <sub>A-B</sub>	Median	CI 95		p <sub>A-C</sub>
C0	17,73	11,13	30,28	21,47	9,44	32,25	0,529	17,50	10,99	25,17	0,661
C2	13,43	9,45	16,95	11,36	4,12	13,04	<b>0,015 (0,005)</b>	11,42	6,16	14,26	0,065
C3	1,52	0,81	2,34	1,76	0,64	2,19	0,565	1,44	0,77	1,83	0,826
C3DC	0,05	0,00	0,12	0,03	0,00	0,14	0,335	0,05	0,00	0,14	0,855
C4	0,22	0,06	0,29	0,20	0,08	0,38	0,986	0,16	0,05	0,35	0,250
C4OH	0,08	0,00	0,11	0,08	0,00	0,10	0,810	0,05	0,02	0,10	0,357
C5	0,13	0,05	0,22	0,12	0,07	0,23	0,986	0,14	0,04	0,22	0,858
C5OHHM G	0,20	0,10	0,23	0,15	0,05	0,25	0,285	0,15	0,10	0,22	0,112
C5:1	0,02	0,00	0,06	0,02	0,00	0,06	0,484	0,02	0,00	0,07	0,699
C6	0,05	0,00	0,20	0,03	0,00	0,11	0,319	0,05	0,03	0,09	0,983
C6DC	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,05	0,450	0,01	0,00	0,05	<b>0,023 (0,047)</b>
C8	0,15	0,09	0,73	0,04	0,00	0,29	<b>0,001 (0,005)</b>	0,11	0,04	0,20	0,135
C8:1	0,07	0,01	0,33	0,07	0,00	0,18	0,899	0,06	0,02	0,16	0,825
C10	0,25	0,14	0,71	0,12	0,04	0,42	<b>0,007 (0,005)</b>	0,13	0,06	0,24	<b>0,012 (0,015)</b>
C10:1	0,07	0,02	0,20	0,05	0,02	0,12	0,179	0,05	0,02	0,15	0,616
C12	0,11	0,04	0,24	0,08	0,00	0,13	0,101	0,08	0,03	0,14	0,388
C14	0,15	0,06	0,24	0,15	0,04	0,26	0,753	0,11	0,05	0,19	0,616
C14:1	0,10	0,03	0,24	0,04	0,00	0,09	<b>0,002 (0,008)</b>	0,03	0,00	0,07	<b>0,001 (0,008)</b>
C14OH	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,04	0,247	0,00	0,00	0,03	0,825
C16	1,04	0,54	1,53	1,04	0,39	1,59	0,957	0,99	0,48	1,70	0,921
C16:1	0,08	0,04	0,14	0,05	0,00	0,09	0,181	0,05	0,02	0,10	0,088
C16:1OH	0,05	0,00	0,17	0,04	0,01	0,13	0,488	0,05	0,02	0,10	0,646
C16OH	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,03	0,312	0,00	0,00	0,04	0,543
Glut	0,05	0,02	0,09	0,02	0,00	0,14	0,245	0,03	0,00	0,07	0,303
MeGlut	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00	0,06	0,811	0,02	0,00	0,07	0,100
MMA	0,46	0,15	0,69	0,38	0,20	0,88	0,446	0,46	0,18	0,62	0,765
C18	0,65	0,47	1,13	0,68	0,19	0,98	0,566	0,61	0,46	0,94	0,388
C18:1	0,86	0,56	1,56	0,88	0,32	1,27	0,698	0,79	0,41	1,13	0,356
C18:1OH	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04	0,458	0,01	0,00	0,02	0,113
C18:2	0,23	0,14	0,37	0,20	0,11	0,37	0,643	0,21	0,08	0,32	0,434
C18:2OH	0,02	0,00	0,03	0,02	0,01	0,03	0,342	0,01	0,00	0,04	0,942
C18OH	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,249	0,00	0,00	0,02	0,271
C20:1	0,04	0,00	0,09	0,02	0,00	0,04	0,482	0,03	0,01	0,05	0,888
C20:2	0,01	0,00	0,04	0,01	0,00	0,04	0,986	0,00	0,00	0,02	0,123
C20:3	0,01	0,00	0,03	0,01	0,00	0,04	0,803	0,00	0,00	0,01	0,147

## 2 Fett-Mahlzeit (Fettemulsion)

Untersuchung zum Einfluss der Ernährung nach Aufnahme einer definierten Fettemulsion nüchtern, 2h, 4h, 6h und 8h nach Nahrungsaufnahme (NA) (n=6 [4/2 m/f, Alter 23-55 Jahre, BMI 19-26]). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

### Aminosäuren

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Nüchtern (0)	2h nach NA (2)		4h nach NA (4)		6h nach NA (6)		8h nach NA (8)	
	Median	Median	p <sub>0-2</sub>	Median	p <sub>0-4</sub>	Median	p <sub>0-6</sub>	Median	p <sub>0-8</sub>
Gln	0,43	0,61	<b>0,041</b>	0,48	0,485	0,51	0,394	0,59	0,240
Lys*	111,54	103,71	1,000	104,43	0,699	94,47	0,310	94,58	0,394
OH-Prol	296,78	271,95	0,394	281,76	0,485	323,57	0,937	286,85	0,937
PiPA	71,45	81,87	0,699	81,00	0,093	75,24	0,937	67,76	0,589
Aba	6,80	6,85	0,937	7,68	1,000	7,81	0,485	7,96	0,240
Ala	241,36	215,21	0,240	193,58	0,180	199,77	<b>0,041</b>	175,44	<b>0,041</b>
Arg	16,97	16,84	0,699	16,38	1,000	18,20	0,699	18,40	0,485
Asp	245,39	256,13	0,937	304,09	0,394	307,18	0,818	253,18	0,699
Carn	0,51	0,78	0,370	0,21	0,470	0,38	0,922	0,39	0,922
Cit	22,14	19,29	0,180	17,44	0,093	20,09	0,240	20,34	1,000
Glu	145,25	141,21	0,937	145,47	0,937	157,59	0,310	139,69	0,937
Gly	197,91	180,64	0,240	179,54	0,093	172,84	0,132	178,14	<b>0,041</b>
His	109,78	109,38	1,000	111,67	0,818	109,75	0,937	114,35	0,699
Leu/Ile*	116,53	105,77	0,485	106,12	0,485	113,85	0,699	115,91	0,937
MeHis	11,27	10,38	1,000	12,87	0,485	10,87	0,699	11,07	0,818
Met*	20,34	16,89	0,394	13,91	0,394	16,70	0,394	16,46	0,589
Orn	43,87	43,57	0,485	40,99	0,240	42,85	0,818	41,86	0,240
Phe*	45,04	40,54	0,394	42,43	0,394	42,05	0,310	41,94	0,394
Pro	223,12	171,69	0,394	139,51	0,180	148,24	0,180	128,95	0,065
Sarc	124,73	120,37	0,485	117,31	0,699	112,83	0,180	104,01	0,065
Ser	139,97	130,07	0,818	138,53	0,818	145,08	0,485	146,88	0,699
Tau	1,02	0,93	0,589	1,10	0,310	1,15	0,240	1,03	0,589
Thr*	28,04	23,98	0,699	21,94	0,589	24,82	0,394	23,22	0,240
Trp*	17,60	18,97	0,937	19,37	0,485	21,18	0,699	22,07	<b>0,041</b>
Tyr	55,91	46,60	0,310	38,35	0,240	40,67	0,180	39,16	0,240
Val*	185,30	164,40	0,589	148,37	0,132	153,62	0,093	155,57	0,180



## Acylcarnitine

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Nüchtern (0)	2h nach NA (2)		4h nach NA (4)		6h nach NA (6)		8h nach NA (8)	
	Median	Median	p <sub>0-2</sub>	Median	p <sub>0-4</sub>	Median	p <sub>0-6</sub>	Median	p <sub>0-8</sub>
C0	29,17	30,08	0,818	29,32	0,818	27,48	0,937	30,35	1,000
C2	13,82	14,94	0,589	15,61	0,394	15,54	0,394	14,73	0,394
C3	1,92	1,68	0,589	1,80	0,818	1,67	0,394	2,05	0,818
C3DC	0,15	0,14	0,974	0,10	0,937	0,11	0,937	0,13	0,937
C4	0,27	0,28	0,818	0,21	0,589	0,21	0,394	0,23	0,485
C4OH	0,14	0,07	0,065	0,09	0,310	0,11	0,937	0,11	0,589
C5	0,16	0,16	0,937	0,15	0,485	0,16	0,699	0,12	0,589
C5OHHMG	0,22	0,25	0,394	0,22	0,818	0,29	0,310	0,22	0,937
C5:1	0,03	0,02	0,699	0,02	0,814	0,04	0,814	0,01	0,372
C6	0,08	0,09	0,589	0,09	0,589	0,13	0,132	0,07	0,937
C6DC	0,01	0,03	0,446	0,02	0,461	0,02	0,582	0,02	0,699
C8	0,20	0,20	0,937	0,18	0,589	0,19	0,699	0,21	0,818
C8:1	0,15	0,09	0,310	0,14	1,000	0,15	0,589	0,20	0,394
C10	0,33	0,29	0,589	0,34	0,937	0,35	1,000	0,27	0,589
C10:1	0,14	0,11	0,937	0,17	0,485	0,14	1,000	0,16	0,394
C12	0,24	0,31	0,485	0,20	0,310	0,19	0,240	0,20	0,310
C14	0,20	0,27	0,394	0,23	0,589	0,18	0,589	0,14	0,310
C14:1	0,10	0,09	0,937	0,13	0,310	0,12	0,394	0,15	0,093
C14OH	0,00	0,01	0,182	0,01	0,182	0,02	<b>0,015</b>	0,01	0,182
C16	1,33	1,49	0,589	1,29	0,485	1,11	0,240	1,11	0,240
C16:1	0,05	0,08	0,589	0,09	0,699	0,06	0,937	0,07	0,937
C16:1OH	0,10	0,11	0,699	0,06	0,310	0,09	0,394	0,07	0,310
C16OH	0,01	0,02	1,000	0,02	1,000	0,01	0,708	0,01	0,870
Glut	0,06	0,06	0,818	0,08	0,589	0,05	0,937	0,03	0,310
MeGlut	0,02	0,04	0,671	0,02	0,225	0,02	0,483	0,02	0,483
MMA	0,53	0,43	0,699	0,52	0,937	0,44	0,485	0,42	0,818
C18	1,16	1,29	0,589	1,03	1,000	1,15	1,000	1,03	0,589
C18:1	1,05	1,41	0,132	1,44	<b>0,041</b>	1,33	<b>0,026</b>	1,45	0,240
C18:1OH	0,03	0,01	0,221	0,01	0,275	0,02	0,446	0,01	0,286
C18:2	0,20	0,27	0,240	0,32	0,065	0,34	0,180	0,28	0,485
C18:2OH	0,01	0,02	0,177	0,03	0,136	0,01	1,000	0,01	0,870
C18OH	0,01	0,00	0,545	0,00	0,545	0,00	0,318	0,01	0,870
C20:1	0,06	0,04	0,329	0,06	1,000	0,06	0,859	0,06	1,000
C20:2	0,02	0,03	0,515	0,05	0,329	0,03	0,981	0,02	0,859
C20:3	0,00	0,01	0,182	0,01	0,182	0,01	0,061	0,01	0,061

### 3 Fett-Mahlzeit (Sahne)

Untersuchung zum Einfluss der Ernährung nach Aufnahme einer definierten Sahne-Mahlzeit nüchtern, 2h, 4h, 6h und 8h nach Nahrungsaufnahme (NA) (n=6 [4/2 m/f, Alter 23-55 Jahre, BMI 19-26]). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

#### Aminosäuren

Parameter [µmol/l]	Vor NA (0)	2h nach NA (2)		4h nach NA (4)		6h nach NA (6)		8h nach NA (8)	
	Median	Median	p <sub>0-2</sub>	Median	p <sub>0-4</sub>	Median	p <sub>0-6</sub>	Median	p <sub>0-8</sub>
Gln	0,50	0,38	0,065	0,46	0,699	0,47	0,937	0,48	0,818
Lys*	85,18	83,55	0,937	78,04	0,394	95,47	0,240	85,46	0,937
OH-Prol	323,04	302,41	0,699	274,56	0,394	294,59	0,589	318,93	0,818
PiPA	78,07	75,78	0,937	65,19	0,485	76,56	0,818	67,53	0,394
Aba	7,64	8,57	0,485	8,60	0,485	9,92	0,093	9,54	0,132
Ala	267,96	244,49	0,180	198,21	<b>0,009</b>	201,03	<b>0,009</b>	178,88	<b>0,004</b>
Arg	17,17	17,25	0,818	13,49	0,065	16,59	0,699	18,46	0,589
Asp	431,02	428,26	1,000	300,73	0,485	285,15	0,485	339,37	0,589
Carn	0,43	0,00	0,113	0,61	0,699	0,43	1,000	0,54	0,939
Cit	22,99	18,91	0,065	17,71	0,065	20,47	0,310	20,22	0,310
Glu	151,79	153,84	0,699	151,99	0,818	153,35	0,699	147,07	0,699
Gly	195,23	185,28	0,240	173,46	0,180	177,21	0,180	184,25	0,240
His	108,28	117,45	0,589	102,73	0,589	120,96	0,180	114,88	0,589
Leu/Ile*	114,26	124,63	0,937	101,88	0,310	116,02	1,000	123,55	0,818
MeHis	9,77	9,55	0,937	7,80	0,240	9,57	0,937	11,16	0,937
Met*	19,22	17,69	0,485	16,11	<b>0,041</b>	14,64	0,065	15,91	0,065
Orn	44,70	46,70	0,699	50,27	0,589	47,02	0,589	44,15	1,000
Phe*	48,68	48,92	1,000	39,78	<b>0,004</b>	40,18	<b>0,002</b>	42,20	<b>0,015</b>
Pro	306,80	277,43	0,485	238,08	0,310	205,56	0,180	168,84	0,132
Sarc	128,59	103,26	0,310	105,97	0,132	116,07	0,180	102,41	0,093
Ser	155,24	160,94	0,394	178,98	0,394	171,52	0,065	164,98	0,240
Tau	0,91	0,84	0,589	1,02	0,818	1,05	0,699	0,93	1,000
Thr*	28,54	26,07	0,394	27,27	0,589	24,41	0,180	22,76	<b>0,026</b>
Trp*	18,67	19,07	0,937	15,83	0,310	19,65	0,589	18,92	0,937
Tyr	46,26	48,40	1,000	38,98	<b>0,009</b>	38,08	<b>0,026</b>	38,48	<b>0,015</b>
Val*	162,97	189,44	0,394	177,22	0,937	170,93	0,818	163,81	0,589

## Acylcarnitine

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Vor NA (0)	2h nach NA (2)		4h nach NA (4)		6h nach NA (6)		8h nach NA (8)	
	Median	Median	p <sub>0-2</sub>	Median	p <sub>0-4</sub>	Median	p <sub>0-6</sub>	Median	p <sub>0-8</sub>
C0	31,55	31,88	0,937	30,47	0,937	28,85	1,000	24,49	0,394
C2	12,95	14,05	0,310	13,28	0,818	14,47	0,310	13,60	0,394
C3	1,79	1,77	0,818	1,90	1,000	1,33	0,240	1,60	0,589
C3DC	0,08	0,07	0,818	0,16	0,180	0,09	0,675	0,14	0,093
C4	0,25	0,25	0,699	0,20	0,310	0,21	0,818	0,23	0,818
C4OH	0,13	0,09	0,240	0,12	0,589	0,13	0,818	0,12	0,937
C5	0,16	0,14	0,699	0,13	0,485	0,14	0,818	0,13	0,818
C5OHHMG	0,19	0,22	0,589	0,21	0,937	0,23	0,485	0,23	0,818
C5:1	0,02	0,02	0,697	0,01	0,286	0,03	0,063	0,03	0,582
C6	0,10	0,09	0,818	0,09	0,699	0,08	0,485	0,10	1,000
C6DC	0,02	0,00	0,113	0,02	0,859	0,00	0,221	0,03	0,255
C8	0,25	0,18	0,818	0,18	0,937	0,22	1,000	0,19	0,937
C8:1	0,11	0,06	0,818	0,08	0,515	0,11	0,589	0,08	0,699
C10	0,36	0,34	0,937	0,30	1,000	0,30	0,818	0,38	0,589
C10:1	0,12	0,09	0,623	0,10	1,000	0,08	0,485	0,12	0,699
C12	0,24	0,21	0,310	0,25	1,000	0,17	0,394	0,27	0,589
C14	0,26	0,27	0,699	0,32	<b>0,026</b>	0,29	0,589	0,28	0,485
C14:1	0,09	0,09	0,699	0,07	0,589	0,09	1,000	0,09	0,818
C14OH	0,00	0,01	0,545	0,01	0,394	0,03	0,145	0,00	1,000
C16	1,38	1,39	0,937	1,45	0,699	1,38	0,937	1,41	0,818
C16:1	0,07	0,04	0,394	0,06	0,818	0,08	0,699	0,09	0,394
C16:1OH	0,09	0,08	0,623	0,09	0,981	0,13	0,240	0,10	0,818
C16OH	0,01	0,03	0,286	0,01	1,000	0,03	0,143	0,03	0,470
Glut	0,06	0,08	0,699	0,06	0,818	0,05	0,589	0,05	0,623
MeGlut	0,03	0,00	0,058	0,03	0,981	0,00	0,286	0,04	0,418
MMA	0,33	0,41	0,818	0,32	0,937	0,39	0,699	0,38	0,937
C18	1,12	1,18	0,937	1,18	0,937	1,07	0,937	1,14	0,937
C18:1	1,04	1,28	0,180	1,13	0,818	1,22	0,310	1,22	0,818
C18:1OH	0,01	0,01	1,000	0,02	0,697	0,01	1,000	0,02	0,470
C18:2	0,25	0,28	0,240	0,19	0,132	0,19	0,180	0,19	0,093
C18:2OH	0,00	0,02	0,167	0,00	0,727	0,01	0,437	0,00	1,000
C18OH	0,00	0,00	0,455	0,00	0,727	0,00	0,455	0,01	0,924
C20:1	0,05	0,06	0,699	0,08	0,240	0,06	0,310	0,06	0,818
C20:2	0,04	0,03	0,777	0,05	0,394	0,04	0,937	0,04	0,394
C20:3	0,00	0,01	0,197	0,00	1,000	0,03	0,106	0,00	0,727

## 4 Oraler Glukose-Toleranz-Test

Untersuchung zum Einfluss der Ernährung nach oralem Glukose Toleranz-Test (oGTT) 8h nüchtern, 2h nach OGTT und weitere 3h nach standardisierten Frühstück, sowie 4 Wochen später (gleicher Wochentag, gleiche Uhrzeit) 8h und 12h nüchtern (n=37 [16/21 m/f, Alter 49-76 Jahre, BMI 19-35]). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whithney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	1. Besuch						2. Besuch				
	Nüchtern (A)	2h nach oGTT (B)		3h nach standardis. Frühstück (C)			Nüchtern (D)		Weitere 4h nüchtern (E)		
	Median	Median	p <sub>A-B</sub>	Median	p <sub>A-C</sub>	p <sub>B-C</sub>	Median	p <sub>A-D</sub>	Median	p <sub>A-E</sub>	p <sub>D-E</sub>
Gln	16	15	,360	18	,526	,076	15	,699	16	,974	,540
Lys*	436	387	<b>,012</b>	398	<b>,005</b>	,906	379	<b>,005</b>	409	,389	,076
OH-Prol	302	167	<b>,000</b>	199	<b>,000</b>	<b>,028</b>	313	,974	334	,344	,240
PiPA	91	89	,338	90	,215	,629	85	,139	89	,296	,739
Aba	20	14	<b>,000</b>	14	<b>,000</b>	,855	19	,432	21	,372	,136
Ala	219	220	,715	254	,296	<b>,047</b>	231	,923	210	,498	,372
Arg	18	13	<b>,000</b>	13	<b>,000</b>	,355	17	,569	19	,606	,355
Asp	101	96	,327	86	,134	,505	83	,389	102	,957	,407
Carn	0	0	,982	0	,224	,237	0	,962	0	,370	,329
Cit	23	18	<b>,000</b>	19	<b>,006</b>	<b>,021</b>	23	,652	24	,327	,583
Glu	112	108	,283	110	,830	,569	106	,554	113	,974	,576
Gly	175	166	,317	167	,145	,683	190	,731	187	,211	,458
His	60	58	,512	60	,723	,591	62	,897	70	,576	,591
Leu/Ile*	89	48	<b>,000</b>	56	<b>,000</b>	<b>,005</b>	89	,855	92	,281	,192
MeHis	2,00	1,83	,383	1,69	,125	,547	1,83	,439	1,84	,914	,498
Met*	17	12	<b>,000</b>	11	<b>,000</b>	,117	16	,263	15	<b>,050</b>	,608
Orn	63	56	<b>,007</b>	50	<b>,000</b>	,142	65	,554	69	<b>,038</b>	,301
Phe*	42	30	<b>,000</b>	36	<b>,000</b>	<b>,001</b>	44	,445	44	,086	,414
Pro	117	91	<b>,000</b>	110	,923	<b>,000</b>	109	,731	120	,731	,966
Sarc	84	86	,629	83	,707	,872	87	,311	82	,755	,533
Ser	47	44	,439	43	,397	,949	46	,598	52	,112	,216
Tau	1,05	1,06	,675	1,10	,906	,976	1,01	,805	1,06	,991	,830
Thr*	46	37	<b>,000</b>	38	<b>,000</b>	,838	47	,569	48	,659	,821
Trp*	9	8	,082	7	<b>,004</b>	,164	9	,991	9	,401	,465
Tyr	48	29	<b>,000</b>	32	<b>,000</b>	,338	48	,478	44	,355	,090
Val*	172	138	<b>,000</b>	150	<b>,001</b>	,258	177	,333	177	,983	,317

## Acylcarnitine

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	1. Besuch						2. Besuch				
	Nüchtern (A)	2h nach oGTT (B)		3h nach standardis. Frühstück (C)			Nüchtern (D)		Weitere 4h nüchtern (E)		
	Median	Median	$p_{A-B}$	Median	$p_{A-C}$	$p_{B-C}$	Median	$p_{A-D}$	Median	$p_{A-E}$	$p_{D-E}$
C0	26	26	,540	27	,855	,322	26	,847	26	,788	,942
C2 (263)	13	11	,094	11	<b>,023</b>	,780	13	,763	15	,296	,055
C3	1,55	1,31	,957	1,39	,863	,780	1,48	,908	1,53	,983	,983
C3DC	0,05	0,00	,365	0,00	<b>,005</b>	,116	0,00	,151	0,00	,379	,771
C4	0,21	0,17	,281	0,18	,447	,707	0,21	,520	0,21	,355	,732
C4-OH	0,07	0,07	,622	0,05	<b>,031</b>	,161	0,07	,903	0,09	,249	,248
C5	0,14	0,12	,149	0,14	,496	,490	0,12	,337	0,14	,989	,412
C5 OH	0,25	0,22	,608	0,21	,414	,593	0,21	,440	0,22	,757	,803
C5:1	0,02	0,03	,508	0,00	,555	,243	0,03	,185	0,00	,880	,226
C6	0,07	0,05	,136	0,04	<b>,014</b>	,178	0,05	,360	0,06	,844	,556
C6DC	0,00	0,00	,689	0,00	,529	,319	0,00	,592	0,00	,598	,971
C8	0,11	0,05	<b>,011</b>	0,04	<b>,000</b>	,201	0,12	,994	0,11	,998	,976
C8:1	0,05	0,06	,840	0,04	,590	,878	0,05	,607	0,05	,648	,334
C10	0,20	0,13	<b>,017</b>	0,07	<b>,000</b>	<b>,003</b>	0,15	,638	0,17	,853	,542
C10:1	0,05	0,00	<b>,003</b>	0,00	<b>,001</b>	,558	0,05	,356	0,06	,607	,107
C12	0,09	0,08	,187	0,06	<b>,004</b>	,122	0,09	,908	0,06	<b>,026</b>	<b>,038</b>
C14	0,15	0,14	,348	0,11	<b>,002</b>	<b>,045</b>	0,14	,331	0,15	,202	,989
C14:1	0,08	0,07	,254	0,05	<b>,003</b>	<b>,024</b>	0,08	,857	0,07	,184	,279
C14OH	0,00	0,00	,240	0,00	,251	<b>,015</b>	0,00	,797	0,00	,903	,698
C16	1,00	1,03	,547	0,97	,203	,478	1,03	,772	1,03	,675	,838
C16:1	0,07	0,05	,216	0,06	,092	,747	0,07	,652	0,06	,715	,266
C16:1OH	0,06	0,05	<b>,046</b>	0,05	,072	,697	0,03	<b>,034</b>	0,06	,757	,166
C16OH	0,00	0,00	,213	0,00	,596	,066	0,00	,542	0,00	,619	,985
Glut	0,04	0,00	,105	0,00	,058	,755	0,00	,562	0,07	,253	,174
MeGlut	0,00	0,00	,716	0,00	,452	,249	0,00	,616	0,00	,618	,966
MMA	0,44	0,43	,717	0,37	,272	,510	0,44	,753	0,44	,976	,753
C18	0,65	0,69	,811	0,64	,245	,388	0,71	,821	0,69	,414	,707
C18:1	0,99	0,93	,562	0,85	,069	,311	1,01	,889	1,12	,078	,203
C18:1OH	0,00	0,00	,174	0,00	,094	,732	0,00	,214	0,00	,619	,475
C18:2	0,24	0,22	,119	0,19	<b>,031</b>	,379	0,27	,365	0,28	,337	,966
C18:2OH	0,00	0,01	,617	0,00	,354	,185	0,00	,267	0,02	,390	,728
C18OH	0,00	0,00	1,000	0,00	,240	,365	0,00	,615	0,00	,674	,358
C20:1	0,02	0,02	,647	0,03	,436	,212	0,03	,184	0,02	,634	,429
C20:2	0,00	0,00	,626	0,00	,229	,463	0,00	<b>,043</b>	0,00	<b>,013</b>	,728
C20:3	0,00	0,00	,080	0,00	,215	,511	0,00	,155	0,00	,961	,216

## 5 Unterschiede zwischen Männern und Frauen

Untersuchung zum Einfluss des Geschlechts (n=37 [16/21 m/f, Alter 49-76 Jahre, BMI 19-35]).

Vergleich zwischen Männern und Frauen 8h nüchtern, 2h nach OGTT und weitere 3h nach standardisierten Frühstück, sowie 4 Wochen später (gleicher Wochentag, gleiche Uhrzeit) 8h und 12h nüchtern. Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	1. Besuch								
	Nüchternstatus			2h nach oGTT			3h nach standard. Frühstück		
	Median Männer	Median Frauen	p	Median Männer	Median Frauen	p	Median Männer	Median Frauen	p
Gln	15	18	,457	12	16	,185	18	19	,868
Lys*	450	429	,280	392	385	,338	390	398	,387
OH-Prol	369	271	<b>,002</b>	187	158	<b>,005</b>	215	184	,476
PiPA	95	90	,073	86	91	,660	91	88	,964
Aba	22	18	<b>,027</b>	15	13	<b>,044</b>	16	13	,089
Ala	251	206	,078	233	207	,185	271	239	<b>,023</b>
Arg	18	17	,476	13	12	,797	13	14	,387
Asp	82	103	,820	75	102	,575	88	86	,534
Carn	0,06	0,06	,770	0,03	0,06	,762	0,08	0,07	,777
Cit	25	22	,940	19	17	,294	20	19	,916
Glu	102	112	,229	110	107	,820	119	106	,370
Gly	177	175	,476	161	178	,534	164	175	,705
His	66	59	,596	63	54	,206	64	56	,639
Leu/Ile*	99	80	<b>,000</b>	54	45	<b>,001</b>	58	50	,073
MeHis	2,06	1,85	,639	1,84	1,80	,774	1,80	1,65	,797
Met*	18	16	,130	12	11	,123	11	10	<b>,040</b>
Orn	65	62	,774	55	57	,639	51	50	,844
Phe*	46	40	<b>,047</b>	33	28	<b>,003</b>	39	33	<b>,032</b>
Pro	135	106	,068	95	79	<b>,021</b>	128	102	<b>,047</b>
Sarc	79	84	,660	96	78	,165	88	78	,138
Ser	48	45	,892	45	40	,797	43	44	,892
Tau	0,98	1,14	,354	1,09	1,03	,495	1,10	1,11	,964
Thr*	48	46	,370	38	35	,101	37	39	,988
Trp*	9	8	,554	8	8	,596	7	7	,705
Tyr	50	46	,165	34	27	<b>,018</b>	32	31	,308
Val*	201	167	,123	145	131	,229	152	143	,421

## Acylcarnitine

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	1. Besuch								
	Nüchternstatus			2h nach oGTT			3h nach standard. Frühstück		
	Median Männer	Median Frauen	P	Median Männer	Median Frauen	P	Median Männer	Median Frauen	P
C0	30	24	<b>,044</b>	31	23	<b>,029</b>	29	22	,115
C2 (263)	17	12	<b>,011</b>	16	10	<b>,006</b>	13	10	<b>,002</b>
C3	2,11	1,16	<b>,000</b>	2,40	1,17	<b>,000</b>	2,31	1,20	<b>,000</b>
C3DC	0,05	0,03	,170	0,05	0,00	<b>,041</b>	0,00	0,00	,137
C4	0,27	0,14	<b>,001</b>	0,23	0,13	<b>,003</b>	0,21	0,17	<b>,000</b>
C4-OH	0,14	0,05	<b>,001</b>	0,11	0,04	<b>,008</b>	0,05	0,05	,168
C5	0,18	0,11	<b>,006</b>	0,19	0,09	<b>,002</b>	0,16	0,12	,100
C5 OH+HMG	0,30	0,18	<b>,003</b>	0,26	0,20	<b>,009</b>	0,28	0,15	<b>,002</b>
C5:1	0,01	0,03	,269	0,03	0,03	,782	0,00	0,00	,335
C6	0,06	0,08	,655	0,05	0,04	,156	0,04	0,03	,368
C6DC	0,00	0,00	,486	0,00	0,00	,212	0,00	0,00	,116
C8	0,10	0,12	,391	0,08	0,04	,341	0,07	0,00	<b>,041</b>
C8:1	0,05	0,06	,485	0,06	0,07	1,000	0,02	0,04	,519
C10	0,21	0,17	,404	0,14	0,10	,056	0,08	0,07	,535
C10:1	0,08	0,04	,235	0,02	0,00	,725	0,00	0,00	,592
C12	0,09	0,09	,705	0,12	0,06	,066	0,04	0,07	,589
C14	0,17	0,14	,128	0,18	0,12	<b>,003</b>	0,11	0,10	,767
C14:1	0,09	0,07	,053	0,08	0,06	,103	0,05	0,03	,400
C14OH	0,00	0,00	,914	0,00	0,00	,211	0,00	0,00	,252
C16	1,19	0,93	,051	1,22	0,80	<b>,003</b>	1,20	0,71	<b>,006</b>
C16:1	0,09	0,07	<b>,040</b>	0,05	0,05	,660	0,08	0,03	<b>,017</b>
C16:1OH	0,07	0,06	,153	0,06	0,04	,326	0,04	0,05	,794
C16OH	0,00	0,00	<b>,049</b>	0,00	0,00	1,000	0,00	0,00	,327
Glut	0,05	0,04	,422	0,02	0,00	,651	0,05	0,00	<b>,005</b>
MeGlut	0,00	0,00	,383	0,00	0,00	,226	0,00	0,00	,116
MMA	0,49	0,43	,280	0,52	0,39	,149	0,41	0,36	,868
C18	0,91	0,58	<b>,011</b>	0,89	0,57	<b>,001</b>	0,78	0,44	<b>,007</b>
C18:1	1,02	0,98	,185	1,10	0,75	<b>,006</b>	1,00	0,69	<b>,002</b>
C18:1OH	0,00	0,00	,216	0,00	0,00	,914	0,00	0,00	,588
C18:2	0,28	0,24	,113	0,25	0,19	<b>,004</b>	0,21	0,17	,195
C18:2OH	0,01	0,00	,941	0,00	0,02	,397	0,00	0,00	,845
C18OH	0,00	0,00	,712	0,00	0,00	,072	0,00	0,00	,432
C20:1	0,04	0,00	<b>,007</b>	0,02	0,02	,675	0,06	0,02	<b>,001</b>
C20:2	0,00	0,00	,448	0,00	0,00	,818	0,00	0,00	,872
C20:3	0,00	0,00	,418	0,00	0,00	,936	0,00	0,00	,165

*Fortsetzung Unterschiede zwischen Männern und Frauen*

## Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	4 Wochen später, gleicher Wochentag, gleiche Uhrzeit					
	Nüchtern			Nüchtern 240 min Minuten nach BA 4		
	Median Männer	Median Frauen	p	Median Männer	Median Frauen	p
Gln	15	15	,728	17	15	,370
Lys*	382	377	,868	431	392	,421
OH-Prol	341	275	<b>,015</b>	380	307	<b>,008</b>
PiPA	88	82	,280	93	87	,123
Aba	23	17	,059	22	17	<b>,037</b>
Ala	251	217	,063	237	194	<b>,013</b>
Arg	19	17	,639	19	19	,554
Asp	82	96	,123	98	105	,495
Carn	0,00	0,06	,397	0,00	0,05	,216
Cit	23	24	,617	24	24	,751
Glu	107	106	,820	111	113	,916
Gly	169	196	,185	176	193	,354
His	58	71	,195	67	70	,660
Leu/Ile*	92	81	<b>,023</b>	100	86	,051
MeHis	1,88	1,81	,596	1,86	1,82	,964
Met*	16	17	,844	18	14	<b>,003</b>
Orn	62	67	,797	67	69	,354
Phe*	47	42	,123	50	43	,063
Pro	116	107	,241	136	104	<b>,023</b>
Sarc	93	84	,457	85	79	,514
Ser	47	45	,554	50	56	,370
Tau	1,03	1,01	,439	0,99	1,13	,534
Thr*	49	44	,175	49	41	,280
Trp*	9	9	,892	9	9	,774
Tyr	53	44	<b>,015</b>	48	42	<b>,005</b>
Val*	183	160	<b>,035</b>	198	172	<b>,025</b>



## Acylcarnitine

Parameter [ $\mu\text{mol/l}$ ]	4 Wochen später, gleicher Wochentag, gleiche Uhrzeit					
	Nüchtern			Nüchtern 240 min Minuten nach BA 4		
	Median Männer	Median Frauen	p	Median Männer	Median Frauen	p
C0	29	24	<b>,023</b>	31	24	<b>,025</b>
C2 (263)	17	12	<b>,000</b>	17	14	<b>,009</b>
C3	2,22	1,20	<b>,000</b>	2,52	1,28	<b>,000</b>
C3DC	0,00	0,00	,448	0,00	0,00	,873
C4	0,27	0,17	<b>,019</b>	0,31	0,17	<b>,000</b>
C4-OH	0,12	0,04	<b>,004</b>	0,12	0,08	,131
C5	0,20	0,09	<b>,017</b>	0,17	0,12	<b>,029</b>
C5 OH+HMG	0,24	0,19	<b>,037</b>	0,32	0,18	<b>,009</b>
C5:1	0,04	0,03	,962	0,00	0,04	,292
C6	0,06	0,05	,526	0,07	0,05	,337
C6DC	0,00	0,00	,280	0,00	0,00	,961
C8	0,08	0,15	,237	0,14	0,07	,090
C8:1	0,09	0,05	,670	0,05	0,05	,784
C10	0,17	0,14	,209	0,18	0,16	,988
C10:1	0,05	0,05	,621	0,13	0,05	,139
C12	0,11	0,08	,217	0,07	0,04	,794
C14	0,16	0,13	,136	0,17	0,13	,063
C14:1	0,12	0,07	<b>,009</b>	0,08	0,07	,616
C14OH	0,00	0,00	,867	0,00	0,00	1,000
C16	1,20	0,98	<b>,032</b>	1,40	0,96	<b>,001</b>
C16:1	0,07	0,07	,933	0,09	0,05	,171
C16:1OH	0,03	0,03	,855	0,07	0,06	,400
C16OH	0,00	0,00	,297	0,00	0,00	,839
Glut	0,02	0,00	,359	0,08	0,05	,369
MeGlut	0,00	0,00	,295	0,00	0,00	,984
MMA	0,53	0,38	,238	0,45	0,37	,421
C18	0,73	0,68	,387	0,84	0,60	<b>,002</b>
C18:1	1,12	0,86	,308	1,26	1,01	,063
C18:1OH	0,00	0,00	,090	0,00	0,00	,345
C18:2	0,29	0,24	,495	0,29	0,27	,323
C18:2OH	0,03	0,00	,248	0,00	0,03	,454
C18OH	0,00	0,00	1,000	0,00	0,00	,118
C20:1	0,02	0,03	,230	0,02	0,02	,666
C20:2	0,00	0,00	,819	0,00	0,00	,710
C20:3	0,00	0,00	,780	0,00	0,00	,268

## Männer - oraler Glukose-Toleranz-Test

Untersuchung zum Einfluss der Ernährung nach oralem Glukose Toleranz-Test (oGTT) 8h nüchtern, 2h nach OGTT und weitere 3h nach standardisierten Frühstück, sowie 4 Wochen später (gleicher Wochentag, gleiche Uhrzeit) 8h und 12h nüchtern bei Männern(n=16 [Alter 54-76 Jahre, BMI 24-29]). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	1. Besuch						2. Besuch				
	Nüchtern (A)	2h nach oGTT (B)		3h nach standardis. Frühstück (C)			Nüchtern (D)		Weitere 4h nüchtern (E)		
	Median	Median	p <sub>A-B</sub>	Median	p <sub>A-C</sub>	p <sub>B-C</sub>	Median	p <sub>A-D</sub>	Median	p <sub>A-E</sub>	p <sub>D-E</sub>
Gln	15	12	,341	18	,287	<b>,017</b>	15	,809	17	,361	,423
Lys*	450	392	,086	390	<b>,006</b>	,287	382	,051	431	,867	,210
OH-Prol	369	187	<b>,000</b>	215	<b>,000</b>	,590	341	,323	380	,616	,184
PiPA	95	86	,110	91	,128	,696	88	,080	93	,323	,468
Aba	22	15	<b>,007</b>	16	<b>,003</b>	,838	23	,724	22	,539	,224
Ala	251	233	,381	271	,515	<b>,047</b>	251	,897	237	,491	,696
Arg	18	13	<b>,001</b>	13	<b>,001</b>	,926	19	,696	19	,590	,642
Asp	82	75	,515	88	,239	,590	82	,305	98	,838	,254
Carn	0,06	0,03	,953	0,08	,296	,324	0,00	,713	0,00	,278	,412
Cit	25	19	<b>,007</b>	20	,056	,239	23	,926	24	,491	,468
Glu	102	110	,642	119	,287	,305	107	,752	111	,381	,515
Gly	177	161	,468	164	,402	,897	169	,867	176	,564	,381
His	66	63	,926	64	,867	,956	58	,171	67	,897	,590
Leu/Ile*	99	54	<b>,000</b>	58	<b>,000</b>	,196	92	,196	100	,956	,270
MeHis	2,06	1,84	,642	1,80	,381	,696	1,88	,564	1,86	,780	,867
Met*	18	12	<b>,002</b>	11	<b>,000</b>	,445	16	,119	18	,867	,239
Orn	65	55	,160	51	<b>,035</b>	,539	62	,752	67	,239	,539
Phe*	46	33	<b>,000</b>	39	,094	,086	47	,780	50	,402	,590
Pro	135	95	<b>,002</b>	128	1,00	<b>,001</b>	116	,254	136	,897	,423
Sarc	79	96	,515	88	,468	,752	93	,696	85	,780	,752
Ser	48	45	,724	43	,515	,696	47	,985	50	,724	,752
Tau	0,98	1,09	,196	1,10	,515	,539	1,03	,361	0,99	,838	,515
Thr*	48	38	<b>,026</b>	37	<b>,010</b>	,468	49	,696	49	,926	,867
Trp*	9	8	,119	7	<b>,029</b>	,305	9	,985	9	,809	,539
Tyr	50	34	<b>,000</b>	32	<b>,001</b>	,985	53	,160	48	,838	,094
Val*	201	145	<b>,007</b>	152	<b>,029</b>	,539	183	,445	198	,897	,341

## Acylcarnitine

Parameter [μmol/l]	1. Besuch						2. Besuch				
	Nüchtern (A)	2h nach oGTT (B)		3h nach standardis. Frühstück (C)			Nüchtern (D)		Weitere 4h nüchtern (E)		
	Median	Median	p <sub>A-B</sub>	Median	p <sub>A-C</sub>	p <sub>B-C</sub>	Median	p <sub>A-D</sub>	Median	p <sub>A-E</sub>	p <sub>D-E</sub>
C0	30	31	,491	29	,752	,239	29	,926	31	,642	,846
C2 (263)	17	16	,468	13	,138	,491	17	,809	17	,780	,445
C3	2,11	2,40	,669	2,31	,867	,341	2,22	,956	2,52	,491	,590
C3DC	0,05	0,05	,977	0,00	,084	,175	0,00	,324	0,00	,153	,797
C4	0,27	0,23	,341	0,21	,323	,926	0,27	,817	0,31	,407	,366
C4-OH	0,14	0,11	,521	0,05	<b>,018</b>	,110	0,12	,948	0,12	,933	,994
C5	0,18	0,19	,780	0,16	,239	,468	0,20	,985	0,17	,696	,752
C5 OH	0,30	0,26	,381	0,28	,341	,838	0,24	,287	0,32	,985	,361
C5:1	0,01	0,03	,300	0,00	,755	,297	0,04	,081	0,00	,497	,161
C6	0,06	0,05	,962	0,04	,383	,170	0,06	,985	0,07	,569	,647
C6DC	0,00	0,00	,332	0,00	1,00	,360	0,00	,627	0,00	,955	,487
C8	0,10	0,08	,427	0,07	,363	,779	0,08	,874	0,14	,121	,162
C8:1	0,05	0,06	,811	0,02	,733	,593	0,09	,313	0,05	,797	,352
C10	0,21	0,14	,128	0,08	<b>,006</b>	<b>,035</b>	0,17	,838	0,18	,724	,897
C10:1	0,08	0,02	<b>,013</b>	0,00	<b>,008</b>	,719	0,05	,107	0,13	,621	<b>,018</b>
C12	0,09	0,12	1,00	0,04	<b>,019</b>	,065	0,11	,521	0,07	,213	,093
C14	0,17	0,18	,745	0,11	<b>,002</b>	<b>,003</b>	0,16	,558	0,17	,376	,934
C14:1	0,09	0,08	,239	0,05	<b>,005</b>	,055	0,12	,926	0,08	,118	,139
C14OH	0,00	0,00	1,00	0,00	,931	,723	0,00	1,00	0,00	,931	1,00
C16	1,19	1,22	,780	1,20	,491	1,00	1,20	,867	1,40	,590	,287
C16:1	0,09	0,05	,128	0,08	,582	,381	0,07	,445	0,09	,582	,947
C16:1OH	0,07	0,06	,180	0,04	<b>,014</b>	,320	0,03	,059	0,07	,802	,123
C16OH	0,00	0,00	,866	0,00	,514	,591	0,00	,908	0,00	,640	,744
Glut	0,05	0,02	,168	0,05	,805	,261	0,02	,985	0,08	,378	,630
MeGlut	0,00	0,00	,390	0,00	,804	,651	0,00	,532	0,00	,993	,550
MMA	0,49	0,52	,689	0,41	,323	,356	0,53	,802	0,45	1,00	,978
C18	0,91	0,89	,897	0,78	,616	,491	0,73	,402	0,84	,838	,138
C18:1	1,02	1,10	,809	1,00	,669	,564	1,12	,809	1,26	,171	,270
C18:1OH	0,00	0,00	,120	0,00	,201	,896	0,00	<b>,020</b>	0,00	,751	<b>,043</b>
C18:2	0,28	0,25	,423	0,21	,171	,381	0,29	,809	0,29	,838	,985
C18:2OH	0,01	0,00	,920	0,00	,604	,788	0,03	,076	0,00	,984	,207
C18OH	0,00	0,00	,350	0,00	1,00	,350	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
C20:1	0,04	0,02	,063	0,06	,609	<b>,003</b>	0,02	,281	0,02	,368	,829
C20:2	0,00	0,00	,973	0,00	,570	,532	0,00	,488	0,00	,179	,659
C20:3	0,00	0,00	,194	0,00	,050	,742	0,00	,220	0,00	,740	,181

## Frauen - oraler Glukose-Toleranz-Test

Untersuchung zum Einfluss der Ernährung nach oralem Glukose Toleranz-Test (oGTT) 8h nüchtern, 2h nach OGTT und weitere 3h nach standardisierten Frühstück, sowie 4 Wochen später (gleicher Wochentag, gleiche Uhrzeit) 8h und 12h nüchtern bei Frauen (n=21 [Alter 49-68 Jahre, BMI 19-35]). Angabe des Medians und der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Aufgrund zu weniger Stichproben keine Angabe des 95% Konfidenzintervalls. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

### Aminosäuren

Parameter [μmol/l]	1. Besuch						2. Besuch				
	Nüchtern (A)	2h nach oGTT (B)		3h nach standardis. Frühstück (C)			Nüchtern (D)		Weitere 4h nüchtern (E)		
	Median	Median	p <sub>A-B</sub>	Median	p <sub>A-C</sub>	p <sub>B-C</sub>	Median	p <sub>A-D</sub>	Median	p <sub>A-E</sub>	p <sub>D-E</sub>
Gln	18	16	,533	19	,980	,567	15	,454	15	,396	,980
Lys*	429	385	,070	398	,220	,485	377	,055	392	,343	,271
OH-Prol	271	158	<b>,000</b>	184	<b>,001</b>	<b>,017</b>	275	,654	307	,306	,501
PiPA	90	91	,980	88	,862	,803	82	,654	87	,550	,921
Aba	18	13	<b>,000</b>	13	<b>,000</b>	,803	17	,501	17	,803	,343
Ala	206	207	,727	239	,485	,382	217	,881	194	,601	,396
Arg	17	12	<b>,002</b>	14	,059	,261	17	,784	19	,803	,601
Asp	103	102	,567	86	,318	,654	96	1,00	105	,746	,901
Carn	0,06	0,06	,964	0,07	,513	,563	0,06	,682	0,05	,780	,519
Cit	22	17	<b>,000</b>	19	<b>,038</b>	<b>,038</b>	24	,501	24	,485	,960
Glu	112	107	,121	106	,230	,862	106	,343	113	,517	,881
Gly	175	178	,454	175	,261	,672	196	,672	193	,318	,803
His	59	54	,454	56	,690	,517	71	,356	70	,396	,960
Leu/Ile*	80	45	<b>,000</b>	50	<b>,000</b>	<b>,006</b>	81	,454	86	,184	,485
MeHis	1,85	1,80	,517	1,65	,202	,690	1,81	,501	1,82	,921	,517
Met*	16	11	<b>,000</b>	10	<b>,000</b>	,250	17	,901	14	<b>,010</b>	,079
Orn	62	57	<b>,036</b>	50	<b>,000</b>	,184	67	,636	69	,074	,454
Phe*	40	28	<b>,000</b>	33	<b>,002</b>	<b>,001</b>	42	,306	43	,078	,618
Pro	106	79	<b>,013</b>	102	,940	<b>,013</b>	107	,862	104	,672	,517
Sarc	84	78	,980	78	,803	1,00	84	,501	79	,842	,550
Ser	45	40	,454	44	,654	,823	45	,382	56	,120	,186
Tau	1,14	1,03	,501	1,11	,784	,517	1,01	,306	1,13	,921	,306
Thr*	46	35	<b>,001</b>	39	<b>,014</b>	,369	44	,550	41	,690	,636
Trp*	8	8	,330	7	,062	,382	9	,765	9	,396	,636
Tyr	46	27	<b>,000</b>	31	<b>,000</b>	,074	44	,940	42	,306	,369
Val*	167	131	<b>,001</b>	143	<b>,022</b>	,306	160	,369	172	,980	,550

## Acylcarnitine

Parameter [μmol/l]	1. Besuch						2. Besuch				
	Nüchtern (A)	2h nach oGTT (B)		3h nach standardis. Frühstück (C)			Nüchtern (D)		Weitere 4h nüchtern (E)		
	Median	Median	p <sub>A-B</sub>	Median	p <sub>A-C</sub>	p <sub>B-C</sub>	Median	p <sub>A-D</sub>	Median	p <sub>A-E</sub>	p <sub>D-E</sub>
C0	24	23	,960	22	,940	,803	24	,980	24	,980	,881
C2 (263)	12	10	<b>,038</b>	10	<b>,018</b>	,960	12	,823	14	,240	<b>,041</b>
C3	1,16	1,17	,618	1,20	,690	,940	1,20	,946	1,28	,533	,584
C3DC	0,03	0,00	,295	0,00	<b>,027</b>	,371	0,00	,382	0,00	,995	,483
C4	0,14	0,13	,481	0,17	,876	,649	0,17	,268	0,17	,592	,574
C4-OH	0,05	0,04	,740	0,05	,414	,582	0,04	,747	0,08	,145	,118
C5	0,11	0,09	,137	0,12	,857	,131	0,09	,366	0,12	,741	,269
C5 OH	0,18	0,20	,784	0,15	,369	,636	0,19	,818	0,18	,733	,760
C5:1	0,03	0,03	,964	0,00	,659	,557	0,03	,702	0,04	1,00	,675
C6	0,08	0,04	,053	0,03	<b>,010</b>	,616	0,05	,158	0,05	,377	,825
C6DC	0,00	0,00	,238	0,00	,369	<b>,040</b>	0,00	,251	0,00	,493	,597
C8	0,12	0,04	<b>,011</b>	0,00	<b>,000</b>	,180	0,15	,847	0,07	,252	,273
C8:1	0,06	0,07	,763	0,04	,634	,883	0,05	,864	0,05	,437	,525
C10	0,17	0,10	,058	0,07	<b>,002</b>	,061	0,14	,751	0,16	,690	,274
C10:1	0,04	0,00	,092	0,00	<b>,033</b>	,578	0,05	,832	0,05	,853	,975
C12	0,09	0,06	,107	0,07	,115	,896	0,08	,784	0,04	,068	,280
C14	0,14	0,12	,144	0,10	,162	,876	0,13	,567	0,13	,481	,921
C14:1	0,07	0,06	,618	0,03	,116	,196	0,07	,769	0,07	,722	,945
C14OH	0,00	0,00	,132	0,00	,166	<b>,005</b>	0,00	,753	0,00	,922	,605
C16	0,93	0,80	,330	0,71	,168	,425	0,98	,654	0,96	,921	,550
C16:1	0,07	0,05	,842	0,03	,063	,217	0,07	,220	0,05	,901	,144
C16:1OH	0,06	0,04	,201	0,05	,648	,711	0,03	,274	0,06	,822	,570
C16OH	0,00	0,00	<b>,039</b>	0,00	1,00	<b>,039</b>	0,00	,311	0,00	,153	,753
Glut	0,04	0,00	,371	0,00	<b>,025</b>	,203	0,00	,550	0,05	,451	,201
MeGlut	0,00	0,00	,238	0,00	,369	<b>,036</b>	0,00	,237	0,00	,493	,597
MMA	0,43	0,39	,588	0,36	,550	,940	0,38	,686	0,37	,714	,779
C18	0,58	0,57	,436	0,44	,120	,513	0,68	,318	0,60	,618	,410
C18:1	0,98	0,75	,283	0,69	<b>,028</b>	,410	0,86	1,00	1,01	,261	,410
C18:1OH	0,00	0,00	,724	0,00	,392	,565	0,00	,701	0,00	,725	,550
C18:2	0,24	0,19	,137	0,17	,137	,828	0,24	,280	0,27	,280	,921
C18:2OH	0,00	0,02	,455	0,00	,483	,138	0,00	,990	0,03	,310	,478
C18OH	0,00	0,00	,488	0,00	,488	1,00	0,00	1,00	0,00	,535	,343
C20:1	0,00	0,02	,257	0,02	,714	,470	0,03	<b>,007</b>	0,02	,138	,299
C20:2	0,00	0,00	,479	0,00	,247	,671	0,00	<b>,043</b>	0,00	<b>,035</b>	,994
C20:3	0,00	0,00	,395	0,00	,937	,238	0,00	,606	0,00	,983	,882

## G - Einfluss der körperlichen Aktivität

Untersuchung zum Einfluss der körperlichen Aktivität bei 14 Männern (n=14 [14/0 m/f, Alter 17-29 Jahre, BMI 22-29]). Abnahme des Nativ-Trockenblutes erfolgte vor Training (A), bei maximalem Training nach 5 Steigerungsstufen mit 1600 m bei 2,5 bis 4,5 m/s (B) und nach Training mit 1600 m bei 2,5 m/s (C). Angabe des Medians, des 95% Konfidenzintervalls (CI 95), sowie der exakten 2-seitigen Signifikanz nach dem Mann-Whitney-U-Test (p), da keine Normalverteilung vorlag. Die essentiellen AS sind mit \* markiert.

### Aminosäuren

	Vor Training (A)			Maximum Training (B)				Nach Training (C)				
	Median	CI 95		Median	CI 95		P <sub>A-B</sub>	Median	CI 95		P <sub>A-C</sub>	P <sub>B-C</sub>
Lactate [mmol/L]	2,01	0,90	3,85	12,48	6,29	18,20	<b>0,000</b>	3,24	1,31	6,95	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>
Parameter [µmol/l]												
Gln	2,3	1,0	5,5	2,5	1,6	4,1	0,624	2,6	1,4	3,6	0,461	0,595
Lys*	200	141	268	211	143	288	0,325	204	111	297	0,775	0,486
OH-Prol	383	280	669	346	191	607	0,250	390	225	565	0,967	0,285
PiPA	30	24	45	29	19	42	0,653	30	16	51	0,683	0,935
Aba	19	13	27	15	10	18	<b>0,002</b>	15	10	27	0,050	0,902
Ala	236	150	306	318	213	404	<b>0,000</b>	263	162	409	<b>0,002</b>	0,217
Arg	21	13	36	19	13	30	0,967	15	11	29	0,050	<b>0,019</b>
Asp	241	187	411	248	169	433	0,744	255	154	512	0,806	0,838
Carn	0,00	0,00	0,49	0,00	0,00	0,31	0,369	0,00	0,00	0,16	0,745	0,641
Cit	22	18	36	25	17	35	0,250	25	14	42	0,539	0,595
Glu	141	108	162	143	110	185	0,567	146	116	181	0,267	0,683
Gly	189	137	321	183	143	278	0,935	171	150	255	0,713	0,624
His	321	120	502	226	127	552	0,174	282	163	882	0,436	0,217
Leu/Ile*	99	65	216	118	65	201	0,345	115	63	156	0,486	0,713
MeHis	2,7	1,7	5,4	3,1	1,8	4,6	0,389	3,0	1,1	5,0	0,870	0,602
Met*	23	13	35	21	13	40	0,870	21	10	32	0,683	0,567
Orn	52	45	88	39	25	56	<b>0,001</b>	46	33	65	<b>0,033</b>	0,148
Phe*	45	33	93	51	40	91	0,126	52	44	76	0,056	0,902
Pro	130	92	266	180	106	266	0,116	134	85	231	0,744	0,067
Sarc	145	114	199	207	155	251	<b>0,000</b>	182	134	253	<b>0,001</b>	0,098
Ser	107	77	337	95	56	220	0,116	113	72	205	0,870	0,267
Tau	0,7	0,3	1,1	0,6	0,0	0,9	0,126	0,6	0,3	0,8	0,161	0,653
Thr*	55	43	82	56	33	77	0,486	65	39	88	0,838	0,345
Trp*	7	4	10	8	5	11	0,345	8	4	11	0,250	0,967
Tyr	46	33	99	54	39	79	0,098	54	36	79	0,217	0,806
Val*	163	129	330	167	123	261	0,967	176	119	256	0,775	0,624

## Acylcarnitine

	Vor Training (A)			Maximum Training (B)				Nach Training (C)				
	Median	CI 95		Median	CI 95		p <sub>A-B</sub>	Median	CI 95		p <sub>A-C</sub>	p <sub>B-C</sub>
Lactate [mmol/L]	2,01	0,90	3,85	12,48	6,29	18,20	<b>0,000</b>	3,24	1,31	6,95	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>
Parameter [μmol/l]												
C0	21	13	42	22	10	28	0,967	22	11	30	0,935	0,806
C2	11	8	16	17	13	21	<b>0,000</b>	16	9	23	<b>0,001</b>	0,285
C3	1,2	0,9	2,6	2,0	0,9	2,5	<b>0,019</b>	1,4	0,8	2,5	0,661	0,069
C3DC	0,00	0,00	0,10	0,04	0,00	0,17	0,069	0,00	0,00	0,08	0,620	0,170
C4	0,21	0,05	0,42	0,29	0,04	0,55	0,067	0,23	0,05	0,56	0,325	0,389
C4OH	0,04	0,00	0,15	0,04	0,00	0,21	0,590	0,09	0,00	0,25	0,189	0,367
C5	0,20	0,04	0,26	0,25	0,08	0,40	0,137	0,22	0,11	0,31	0,174	0,567
C5OHHMG	0,21	0,09	0,67	0,24	0,07	0,57	0,595	0,20	0,06	0,90	0,935	0,486
C5:1	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,07	0,302	0,03	0,00	0,05	0,143	0,898
C6	0,03	0,00	0,08	0,04	0,00	0,12	0,221	0,04	0,00	0,09	0,107	0,934
C6DC	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,09	0,745	0,00	0,00	0,04	0,739	0,512
C8	0,05	0,00	0,21	0,08	0,00	0,32	<b>0,032</b>	0,07	0,00	0,35	0,197	0,418
C8:1	0,04	0,00	0,32	0,08	0,00	0,42	<b>0,006</b>	0,07	0,00	0,24	0,176	0,393
C10	0,05	0,00	0,17	0,09	0,00	0,21	0,312	0,11	0,00	0,22	0,102	0,458
C10:1	0,00	0,00	0,19	0,04	0,00	0,12	0,654	0,06	0,00	0,17	0,077	0,150
C12	0,08	0,00	0,12	0,09	0,04	0,20	0,170	0,06	0,00	0,15	0,531	0,104
C14	0,12	0,00	0,22	0,17	0,05	0,30	0,098	0,09	0,00	0,23	0,992	0,161
C14:1	0,03	0,00	0,13	0,05	0,00	0,12	0,075	0,06	0,00	0,17	<b>0,032</b>	0,504
C14OH	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,06	0,791	0,00	0,00	0,11	0,631	0,678
C16	0,87	0,59	1,36	0,97	0,57	1,44	0,389	1,06	0,48	1,54	0,217	0,595
C16:1	0,00	0,00	0,16	0,04	0,00	0,09	0,376	0,03	0,00	0,10	0,689	0,129
C16:1OH	0,03	0,00	0,18	0,04	0,00	0,12	0,716	0,04	0,00	0,15	0,859	0,582
C16OH	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,05	0,098	0,00	0,00	0,05	<b>0,031</b>	0,741
Glut	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,09	0,559	0,00	0,00	0,12	0,350	0,791
MeGlut	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,10	0,964	0,00	0,00	0,05	0,512	0,512
MMA	0,29	0,12	0,65	0,34	0,15	0,55	0,305	0,30	0,11	0,60	0,744	0,902
C18	0,59	0,34	0,98	0,71	0,41	1,16	0,217	0,72	0,25	1,18	0,567	0,806
C18:1	0,75	0,42	0,95	0,91	0,55	1,25	<b>0,010</b>	0,86	0,22	1,41	0,161	0,539
C18:1OH	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04	0,366	0,00	0,00	0,09	0,208	1,000
C18:2	0,14	0,05	0,30	0,21	0,08	0,39	0,051	0,20	0,06	0,50	0,116	0,935
C18:2OH	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	1,000	0,00	0,00	0,09	0,215	0,157
C18OH	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,483	0,00	0,00	0,00	0,483	1,000
C20:1	0,02	0,00	0,08	0,03	0,00	0,11	0,521	0,00	0,00	0,09	0,827	0,407
C20:2	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,05	0,213	0,00	0,00	0,07	0,907	0,331
C20:3	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,224	0,00	0,00	0,03	1,000	0,224

**H - Wiederfindungsraten, Variationskoeffizienten, Regressionskoeffizienten**

Aminosäuren in 3 Konzentrationsstufen (Level 1 = 2,5 µmol/L, Level 2 = 25 µmol/L, Level 3 = 250 µmol/L), n=5, Mittelwerte (MW, µmol/L), Wiederfindungsraten (R, %), Variationskoeffizient (VK, %) und Regressionskoeffizient (R<sup>2</sup>)

Parameter	Level 1 c=2,5 µmol/L			Level 2 c=25 µmol/L			Level 3 c=250 µmol/L			R <sup>2</sup>
	MW [µmol/L]	VK [%]	R [%]	MW [µmol/L]	VK [%]	R [%]	MW [µmol/L]	VK [%]	R [%]	
OH-Prol	18.6	10.6	744	179	27.0	718	1015	8.7	406	0.9953
Aba	0.6	19.9	26	4	12.2	18	61	11.1	24	0.9993
Ala	3.2	9.6	129	22	11.8	86	242	10.9	97	0.9998
Asp	3.0	10.7	120	25	15.9	100	661	8.8	265	0.9972
Cit	2.3	11.6	93	19	5.1	76	214	5.4	86	0.9999
Glu	3.6	19.1	144	26	6.5	103	280	6.4	112	0.9999
Gly	3.2	8.1	128	20	3.9	81	208	6.8	83	1.0000
Leu/Ile	9.1	12.6	182	79	24.5	158	400	7.1	80	0.9925
Met	2.9	12.8	115	19	8.7	75	194	8.7	78	0.9999
Phe	2.6	10.9	105	21	11.3	83	196	8.5	79	1.0000
Pro	3.1	9.3	123	23	8.3	90	168	7.9	67	0.9993
Sarc	7.5	4.0	298	55	12.9	218	483	4.8	193	0.9999
Ser	3.6	22.5	145	30	30.1	120	101	7.2	40	0.9672
Tau	0.09	7.6	3.74	0.28	21.0	1.13	1.17	8.6	0.47	0.9932
Thr	0.5	8.2	18	3	12.3	12	20	6.2	8	0.9987
Tyr	2.3	5.9	93	20	9.2	82	218	9.4	87	1.0000
Val	24.9	14.8	995	43	15.5	172	219	10.5	88	1.0000
Lys	2.5	6.4	100	23	4.7	91	231	3.2	92	1.0000
Arg	2.0	4.6	80	20	3.9	80	217	5.4	87	0.9999
Carnosin	1.2	7.4	47	8	11.9	34	152	22.1	61	0.9984
His	8.5	8.1	338	90	4.3	360	821	3.0	338	1.0000
MeHis	6.8	10.4	273	67	7.1	267	693	4.1	282	1.0000
Orn	2.2	5.0	88	20	3.1	81	213	3.7	85	1.0000
Trp	0.4	16.3	16	6.0	13.0	24	91	11.1	37	0.9992



## J - Reproduzierbarkeiten

Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (VK) von Aminosäuren und Acylcarnitinen bei physiologischer Konzentration (Level 1) und erhöhter Konzentration (Level 2), da Normalverteilung vorlag (n=17). Grau unterlegt sind die Parameter mit spezifischen Internen Standard. Fett gedruckt sind jene VK-Werte, die Werte kleiner 20% erreichen. Der INTRA-ASSAY bestimmt die Variabilität innerhalb eines Tages, der INTER-ASSAY die Variabilität zwischen den Tagen.

### Aminosäuren

Parameter	INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
	Level 1		Level 2		Level 1		Level 2	
	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]
Gln	0,40	34	0,41	20	3,36	51	4,35	48
Lys	119	<b>19</b>	133	<b>11</b>	120	<b>20</b>	154	<b>17</b>
OH-Prol	567	<b>9</b>	1434	<b>12</b>	743	<b>11</b>	1434	20
PiPA	57	<b>13</b>	88	<b>10</b>	73	33	103	49
Aba	9	<b>14</b>	7	<b>15</b>	22	<b>15</b>	21	20
Ala	431	<b>7</b>	845	<b>8</b>	475	<b>9</b>	806	<b>12</b>
Arg	7,20	<b>13</b>	43,21	<b>7</b>	8,14	<b>18</b>	40,66	<b>12</b>
Asp	584	23	1173	28	606	176	1015	130
Carn	0,56	77	0,42	69	0,04	94	0,04	85
Cit	58	<b>11</b>	256	<b>7</b>	48	<b>12</b>	210	<b>8</b>
Glu	322	<b>10</b>	618	<b>12</b>	357	<b>11</b>	624	<b>15</b>
Gly	297	<b>6</b>	924	<b>7</b>	326	<b>6</b>	813	<b>7</b>
His	103	22	120	<b>15</b>	152	190	81	80
Leu/Ile	206	<b>11</b>	479	<b>7</b>	250	<b>7</b>	471	<b>16</b>
MeHis	8,60	31	9,29	25	1,56	31	1,75	23
Met	172	130	293	103	65	<b>9</b>	242	<b>14</b>
Orn	98	<b>13</b>	277	<b>10</b>	123	<b>20</b>	297	<b>20</b>
Phe	116	<b>9</b>	488	<b>8</b>	137	<b>10</b>	493	23
Pro	157	<b>14</b>	141	<b>15</b>	258	<b>18</b>	245	27
Sarc	188	<b>14</b>	311	<b>8</b>	132	<b>14</b>	200	<b>18</b>
Ser	106	<b>8</b>	114	<b>11</b>	64	21	68	27
Tau	0,73	33	0,87	26	0,79	20	0,87	<b>15</b>
Thr	17	<b>12</b>	14	<b>12</b>	64	<b>16</b>	61	<b>19</b>
Trp	28	23	52	<b>17</b>	24	<b>16</b>	41	<b>18</b>
Tyr	155	<b>8</b>	485	<b>8</b>	170	22	411	<b>17</b>
Val	224	<b>8</b>	458	<b>10</b>	326	<b>10</b>	565	<b>15</b>

## Acylcarnitine

Parameter	INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
	Level 1		Level 2		Level 1		Level 2	
	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]	MW [ $\mu\text{mol/L}$ ]	VK [%]
C0	55	<b>12</b>	123	<b>11</b>	38	<b>14</b>	92	<b>18</b>
C2	38	<b>11</b>	77	<b>10</b>	30	<b>13</b>	72	<b>12</b>
C3	6,26	<b>12</b>	13,72	<b>20</b>	4,84	<b>19</b>	13,30	22
C3DC	0,27	35	0,25	50	0,02	126	0,05	90
C4	1,18	22	4,33	<b>15</b>	0,81	22	3,69	<b>19</b>
C4OH	0,16	37	0,21	36	0,04	103	0,11	53
C5	0,57	21	2,12	<b>15</b>	0,52	20	2,23	<b>11</b>
C5OHHMG	0,28	27	0,33	<b>17</b>	0,16	36	0,23	23
C5:1	0,03	73	0,04	72	0,02	142	0,04	99
C6	0,49	24	2,04	<b>14</b>	0,42	21	1,87	<b>18</b>
C6DC	0,06	73	0,16	28	0,03	103	0,09	57
C8	0,74	<b>19</b>	2,91	<b>14</b>	0,52	28	2,40	<b>18</b>
C8:1	0,13	55	0,12	45	0,10	45	0,14	60
C10	0,82	21	2,80	<b>12</b>	0,55	23	2,40	<b>18</b>
C10:1	0,10	69	0,11	75	0,03	114	0,03	127
C12	0,77	36	2,54	<b>12</b>	0,66	53	1,94	<b>12</b>
C14	0,61	22	2,20	<b>14</b>	0,67	29	2,31	<b>16</b>
C14:1	0,06	59	0,08	65	0,04	81	0,03	80
C14OH	0,02	85	0,03	102	0,01	186	0,01	199
C16	4,81	<b>14</b>	11,50	<b>11</b>	4,03	<b>18</b>	10,28	<b>14</b>
C16:1	0,05	83	0,06	57	0,03	93	0,03	71
C16:1OH	0,05	75	0,08	65	0,03	82	0,05	75
C16OH	0,01	164	0,03	136	0,01	132	0,03	92
Glut	0,33	34	1,24	<b>15</b>	0,20	40	0,87	22
MeGlut	0,06	69	0,17	25	0,03	100	0,11	62
MMA	0,53	23	0,61	<b>19</b>	0,31	24	0,37	37
C18	2,86	<b>13</b>	8,31	<b>9</b>	2,07	<b>14</b>	7,25	<b>18</b>
C18:1	0,99	20	0,87	<b>15</b>	0,52	<b>14</b>	0,56	25
C18:1OH	0,04	60	0,05	91	0,01	147	0,01	104
C18:2	0,25	30	0,18	35	0,12	38	0,13	37
C18:2OH	0,02	88	0,02	82	0,01	174	0,01	133
C18OH	0,02	95	0,01	133	0,00	287	0,01	154
C20:1	0,02	139	0,03	86	0,02	118	0,01	131
C20:2	0,03	99	0,02	78	0,01	272	0,02	255
C20:3	0,01	148	0,01	189	0,00	276	0,01	331