

---

Strukturelle und quantitative Identifizierung  
der Einzelkomponenten in Lipidgemischen

---

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich 02 Biologie/Chemie

der Universität Bremen vorgelegt

von

**Serap Açıkgöz**

Bremen 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis Oktober 2014 im Fachbereich Chemie der Universität Bremen am Lehrstuhl für instrumentelle Analytik unter Leitung von Prof. Dr. Dieter Leibfritz angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Leibfritz
2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Thiele

Tag des Promotionskolloquiums: 15.10.2014

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Leibfritz für die Überlassung des Themas meiner Promotionsarbeit und die Betreuung, die guten Arbeitsbedingungen und seine stete Unterstützung sowie die gewährten Freiheiten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Herbert Thiele danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dipl. Ing. Dorit Kemken und Herrn Dr. Thomas Dülcks für ihre Unterstützung bei massenspektrometrischen und chromatographischen Analysen, für ihre Anregungen sowie für ihre intensive Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dipl. Ing. Johannes Stelten und Herrn Dr. Wieland Willker danke ich für die Hilfestellung vor allem bei gerätetechnischen Fragen und der Einführung in die NMR-Spektroskopie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frauke Nehen, Dr. Miriam Schwalbe-Herrmann, Jane Mißler, Jessica Heins, Dr. Markus Plaumann und Jonas Warneke für ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und ihre konstruktive Kritik, die schöne Zeit und vor allem für ihre Freundschaft.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Spiteller möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Zusammenarbeit bedanken.

Großer Dank gilt auch meiner Familie, die mich begleitet und mir durch ihre liebevolle Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Motivation stets Rückhalt gegeben hat.



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 Lipide .....  | 2         |
| 1.1.1 Fettsäuren.....   | 2         |
| 1.1.2 Neutrale Lipide.....  | 3         |
| 1.1.3 Phospholipide .....   | 4         |
| 1.1.4 Sphingolipide .....   | 7         |
| 1.2 Anomalien im Lipidstoffwechsel .....                            | 9         |
| 1.3 Lipidextraktion .....   | 11        |
| 1.4 Chromatographische Trennmethode.....                            | 12        |
| 1.4.1 Festphasenextraktion (SPE) .....                              | 12        |
| 1.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....         | 16        |
| 1.5 Massenspektrometrie.....  | 17        |
| 1.5.1 ESI-Massenspektrometrie von Phospholipiden .....              | 18        |
| 1.6 Aufgabenstellung .....  | 20        |
| <br>  |           |
| <b>2 Ergebnisse und Diskussion</b> .....                            | <b>22</b> |
| 2.1 Wahl der Extraktionsmethode .....                               | 22        |
| 2.1.1 CMB - Gewebeextraktion.....                                   | 22        |
| 2.1.2 Extraktion mit Isopropanol .....                              | 23        |
| 2.1.3 Extraktion mit MTBE .....                                     | 23        |
| 2.1.4 Vergleich der Extraktionsmethoden .....                       | 23        |
| 2.2 SPE Methodenentwicklung .....                                   | 27        |
| 2.2.1 Modifizierte Methode nach Kaluzny <i>et al.</i> (1985) .....  | 28        |
| 2.2.2 Trennversuche von PE, PC und SPH .....                        | 29        |
| 2.2.3 Optimierung der PC-Trennung.....                              | 30        |
| 2.2.4 Auftrennung der Phospholipide aus Schweinehirn.....           | 32        |
| 2.2.5 Methode nach Schweisguth <i>et al.</i> (1989).....            | 33        |
| 2.2.6 GalCer-Standard Analyse .....                                 | 39        |
| 2.2.7 Strukturaufklärung der Cerebrosid-Struktur in der 3. Fraktion | 43        |
| 2.2.8 Erweiterung der Methode nach Schweisguth .....                | 47        |
| 2.2.9 Methodenoptimierung .....                                     | 49        |
| 2.2.10 Methodenüberprüfung .....                                    | 53        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.3 Anwendung der optimierten SPE-Methode auf Lipidextrakte anderer Gewebearten .....    | 56         |
| 2.4 Anwendung der optimierten SPE-Methode auf Lipidextrakte aus Körperflüssigkeiten..... | 60         |
| 2.5 Trennung von Phospholipideinzelkomponenten mittels RP-HPLC ...                       | 62         |
| 2.5.1 HPLC-Trennung der PE-Einzelkomponenten .....                                       | 63         |
| 2.5.2 HPLC-Trennung der GalCer-Einzelkomponenten aus Schweinehirn .....                  | 69         |
| <b>3 Zusammenfassung.....</b>  | <b>73</b>  |
| <b>4 Ausblick .....</b>  | <b>76</b>  |
| <b>5 Material und Methoden .....</b>   | <b>77</b>  |
| 5.1 CMB-Gewebeextraktion .....   | 77         |
| 5.2 Isopropanol-Gewebeextraktion .....   | 78         |
| 5.3 MTBE-Gewebeextraktion .....  | 79         |
| 5.4 SPE-Methode nach Kaluzny .....   | 80         |
| 5.5 SPE-Methode nach Schweisguth.....  | 81         |
| 5.6 Entwickelte und optimierte SPE-Methode (Optimierung III) .....                       | 82         |
| 5.7 Probenmaterial.....  | 83         |
| 5.8 NMR-Analyse .....  | 84         |
| 5.8.1 Spektrenprozessierung .....  | 85         |
| 5.8.2 Signalzuordnungen .....  | 85         |
| 5.8.3 Quantifizierung.....   | 85         |
| 5.9 ESI-MS Analyse.....  | 86         |
| 5.10 HPLC-Analyse .....  | 87         |
| RP-HPLC-Methode nach Zhou <i>et al.</i> 2012.....  | 87         |
| <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>Anhang .....</b>  | <b>102</b> |
| A-1 Fettsäurenomenklatur.....  | 102        |
| A-2 Chemische Verschiebungen.....  | 103        |

|  |     |
|--|-----|
| 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (PE(36:2)) .....                | 103 |
| 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC(34:1)).....              | 104 |
| Sphingomyelin (Rinderhirn Extrakt) (SPH).....                                | 105 |
| 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-rac(1-glycerol) (PG(32:0)).....                 | 106 |
| 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidsäure (PA(32:0)) .....                             | 107 |
| Phosphatidylserin (Rückenmark Extrakt) (PS) .....                            | 108 |
| Phosphatidylinositol (Soja Extrakt) (PI).....                                | 109 |
| Galactosylcerebroside (Typ1 und 2) (GalCer).....                             | 110 |
| Sulfatid (S-GalCer).....   | 111 |
| Cardiolipin (CL) .....   | 112 |
| A-3 <sup>31</sup> P-NMR-Spektren einiger Phospholipidgemische .....          | 113 |
| A-4 <sup>1</sup> H-NMR Spektren der Fraktionen aus verschiedenen Gewebearten | 114 |

# 1 Einleitung

Die Lipidanalytik von Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten hat in den vergangenen Jahren in der klinischen Diagnostik und in der biochemischen Grundlagenforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Anlehnend an die Genom-, Proteom- und Glykomuntersuchungen hat sich das Forschungsfeld der Lipidom-Analytik (*lipidomics*) etabliert [Quehenberger *et al.* 2010].

Die Relevanz für Untersuchungen des Lipidstoffwechsels in Naturwissenschaft und Medizin belegen zahlreiche Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen anomalen Lipidkonzentrationen und bestimmten Krankheiten beobachtet wurde. Für deren Früherkennung sind validierte Biomarker, die als Indikator für normale oder pathogene biologische Prozesse dienen, sehr bedeutsam [Bracht 2008]. Zudem können durch die Analyse biochemischer Stoffwechselfvorgänge Arzneimittel gezielter entwickelt werden. Deshalb besteht großes klinisches Interesse an der Lipidanalytik von Körperflüssigkeiten und lipidreichen Organen. Die Idealvorstellung wäre eine universell anwendbare analytische Methode, die die Auftrennung der Lipide und vor allem der Phospholipide in die einzelnen Unterklassen sowie deren Identifizierung und Quantifizierung ermöglicht.

Für die Auftrennung eines komplexen Lipidextraktes in verschiedene Lipidklassen stellt die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) eine schnelle, effiziente und zuverlässige Methode dar. Außerdem sind der geringe Lösungsmittelverbrauch und die mögliche Automatisierung sehr attraktiv [Bodennec *et al.* 2000]. In der vorliegenden Arbeit wird sie für die effiziente Auftrennung von Lipiden und insbesondere von Phospholipiden genutzt. Die separierten Lipidklassen werden im Anschluss NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch analysiert, um so die Vorteile beider Verfahren zu nutzen. Während die NMR-Spektroskopie zur Quantifizierung dient, liefert die Massenspektrometrie genauere Informationen zu der Fettsäurezusammensetzung der Lipidkomponenten.

Zur Einführung in die Thematik wird im Folgenden zunächst ein Überblick der Strukturvielfalt der Lipide sowie deren Aufgaben dargestellt. Anschließend wird näher auf die Lipidanalytik eingegangen.

## 1.1 Lipide

Unter dem Begriff Lipide wird eine Vielzahl von Naturstoffen zusammen gefasst, die in ihrer Struktur stark variieren, in wichtigen Eigenschaften jedoch übereinstimmen. Eine einfache Definition beschreibt Lipide als hydrophobe Substanzen, die in organischen Lösungsmitteln gut löslich sind. Des Weiteren können Lipide als Fettsäuren und deren Derivate sowie Substanzen, die eine biosynthetische oder funktionelle Verwandtschaft zu diesen aufweisen, bezeichnet werden [Christie und Han 2010].

Die biologischen Funktionen der Lipide sind genauso umfangreich wie ihre strukturelle Divergenz. Daher werden verschiedene Lipidklassen unterschieden, die teilweise wiederum Unterklassen aufweisen und aus vielen Einzelkomponenten bestehen. Eine international akzeptierte Klassifizierung von Lipiden wurde von Fahy *et al.* (2009) in Zusammenarbeit mit einem Komitee und unter der Förderung des LIPID-MAPS-Konsortiums, veröffentlicht. Die mit vielen verschiedenen Datenbanken kompatible Klassifizierung besteht aus acht Kategorien: Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Polyketide, Prenole, Saccharolipide, Sphingolipide und Sterole.

In dieser Arbeit werden die Klassen Fettsäuren (FS), Glycerolipide bzw. neutrale Lipide (NL), Phospholipide (PL) und Sphingolipide (SL) thematisiert. Im Folgenden wird näher auf die Einteilung der Lipide in die verschiedenen Klassen und deren Eigenschaften eingegangen.

### 1.1.1 Fettsäuren

Fettsäuren spielen im Energiestoffwechsel eine wichtige Rolle. Sie sind im menschlichen Körper in freier Form nur in geringen Konzentrationen zu finden, kommen aber als Fettsäureester in vielen Lipiden vor, z.B. in Acylglyceriden, Sphingolipiden, Phospholipiden und Cholesterolestern. Die Biosynthese der Fettsäuren erfolgt im Cytosol aus Acetat-Einheiten, weshalb sie fast ausschließlich aus unverzweigten, geradzahligen Kohlenwasserstoffketten bestehen. Die Länge der Kette variiert in natürlich vorkommenden Fettsäuren zwischen 14 bis 24 Kohlenstoffatomen, wobei Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) dominieren [Schiller *et al.* 2004].

Die Kohlenwasserstoffketten können eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten, welche durch Methylengruppen voneinander getrennt werden und somit nicht konjugiert vorliegen. Diese ungesättigten Fettsäuren, *monounsaturated fatty acids* (einfach-ungesättigte Fettsäuren, MUFA) bzw. *polyunsaturated fatty acids* (mehrfach-ungesättigte Fettsäuren, PUFA) weisen Doppelbindungen mit cis-Konfiguration auf, wodurch ein 30°-Winkel in der Kette entsteht. Ungesättigte Fettsäuren mit trans-Konfiguration der Doppelbindung werden als Transfettsäuren bezeichnet und treten meist nur in anaeroben bakteriellen Stoffwechselprozessen auf [Keweloh *et al.* 1996].

Neben der IUPAC-Nomenklatur haben sich Kurzformen zur Bezeichnung von Fettsäuren entwickelt. Durch die Angabe der Anzahl an Kohlenstoffatomen und Doppelbindungen wird die Nomenklatur verkürzt. So steht z.B. 18:1 für eine Fettsäure, die aus 18 Kohlenstoffatomen aufgebaut ist und eine Doppelbindung aufweist. Eine detailliertere Beschreibung der Fettsäurenomenklatur ist im Anhang (A-1) aufgeführt.

### 1.1.2 Neutrale Lipide

Zu den neutralen Lipiden (NL) gehören die Glycerol-Derivate Triacylglycerole (TAG) sowie deren Hydrolyseprodukte, die Mono- (MAG) und Diacylglycerole (DAG). Auch die Sterole Cholesterol (Chol) und Cholesterolester (CE) werden zu den NL gezählt. Die genannten Lipide weisen unterschiedliche Funktionen auf.

TAG ist das häufigste Speicherlipid und dient als eine Quelle für Fettsäuren, die durch die  $\beta$ -Oxidation auch für die Energiegewinnung verantwortlich sind [Murphy *et al.* 2011]. DAG fungiert als *second messenger*. Ganong *et al.* (1986) erkannten, dass DAG das Enzym Protein Kinase C aktiviert, welches eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion und im Zellwachstum spielt. Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass MAG eine Rolle bei der Regulation der Proliferation und Invasion von bestimmten Krebszellen, sowie bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Außerdem wurde 2-Arachidonylglycerol als ein endogener Ligand für Cannabinoid-Rezeptoren identifiziert [Mulvihill und Nomura 2013].

Cholesterol ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran. Es erhöht die Stabilität und reguliert die Membranfluidität, indem es durch seine Einlagerung die

Bewegung der Fettsäureketten hemmt und damit die Fluidität der Membran vermindert. Wegen seines stark hydrophoben Charakters ist es zu 95% in der Membran zu finden. Der Transport des Cholesterols in der Blutbahn erfolgt durch Lipoproteine. Hauptorte der Biosynthese sind die Leber und die Darmschleimhaut. Organe mit hohem Cholesterolbedarf sind das Gehirn sowie Steroidhormonproduzierende Organe (Nebenniere, Eierstöcke, Hoden). Da Cholesterol die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, wird es auch im Gehirn synthetisiert. Etwa ein Viertel des gesamten Cholesterols ist im Gehirn enthalten, wo es vor allem in den lipidreichen Myelinscheiden der Axone vorkommt. Als Vorläufermolekül dient es der Synthese von Steroidhormonen, Gallensäuren und Vitamin D.

Cholesterolester sind Derivate des Cholesterols, die an der 3-Hydroxygruppe mit langkettigen Fettsäuren verestert sind. Sie lassen sich in größeren Mengen nur in Lipoproteinen nachweisen [Lottspeich 2006].

### 1.1.3 Phospholipide

Phospholipide (PL) werden aufgrund ihres unterschiedlichen strukturellen Aufbaus in verschiedene Unterklassen eingeteilt. Glycerophospholipide sind Derivate der Phosphatidsäure (PA). Ihr Grundgerüst besteht aus einem Glycerolmolekül, welches in den C1- und C2- Positionen mit Fettsäuren verestert ist. Dabei ist die Fettsäure an C1-Position (*sn*-1 Position) meist gesättigt, die Fettsäure an C2 (*sn*-2 Position) liegt vorwiegend ungesättigt vor [Christie und Han 2010, Farooqui *et al.* 2000]. An C3 ist ein Phosphorsäuremonoester gebunden, der unterschiedliche polare Komponenten aufweisen kann. Diese werden als Kopfgruppen bezeichnet und bestimmen die Phospholipidklassen wie in Abbildung 1-1 gezeigt.

Während PA als wichtiger Ausgangsstoff in der Biosynthese von Lipiden und als *second messenger* nur in geringen Konzentrationen zu finden ist, sind Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) als Hauptkomponenten der Zellmembranen die am häufigsten auftretenden Phospholipide in tierischen und pflanzlichen Organismen. Die Biosynthese der Glycerophospholipide PE und PC erfolgt über die Aktivierung durch Phosphorylierung der jeweiligen Kopfgruppe (Cholin oder Ethanolamin) und der anschließenden Bildung von Cytidindiphosphat (CDP)-Ethanolamin bzw. CDP-Cholin. Durch den Angriff der C3-Hydroxygruppe von 1,2-Diacylglycerol an der Phosphatgruppe der aktivierten Kopfgruppe wird CMP (Cytidinmonophosphat)

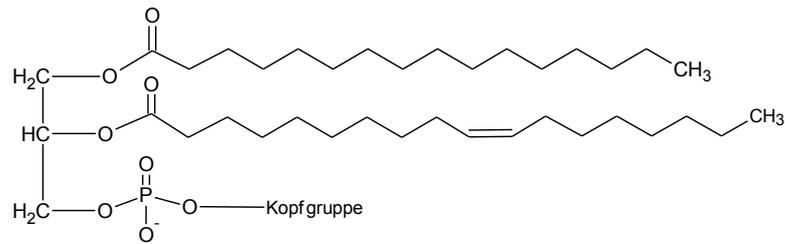
verdrängt und das entsprechende Glycerolipid gebildet [Voet 2002]. In der Leber kann PE auch durch Methylierung in PC überführt werden. Für beide Phospholipide ist PA der Ausgangsstoff [Wolff *et al.* 2008].

Phosphatidylinositol (PI) ist ebenfalls ein wichtiger Membranbestandteil, es tritt jedoch in geringeren Konzentrationen als PC und PE auf. Daneben spielt es auch eine Rolle in metabolischen Prozessen. Als so genannter GPI-Anker (Glycosylphosphatidyl-Inositol-Anker) ist es in der Lage, Glykoproteine an die Plasmamembran zu binden, erhöht damit die Beweglichkeit der Proteine und begünstigt den zellulären Transport. Außerdem ist es Ausgangsstoff für zelluläre Botenstoffe wie Inositol-1,4,5-triphosphat und DAG [Farooqui *et al.* 2000].

Phosphatidylglycerol (PG) befindet sich in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben, wobei es in ersterem nur niedrig konzentriert ist. Lediglich in der Lunge tritt es in höheren Konzentrationen auf, denn es ist neben PC und PI Bestandteil des Lungensurfactants [Egberts *et al.* 1988].

Phosphatidylserin (PS) ist als *second messenger* sehr bedeutend. Es spielt in der Signaltransduktion und bei der Apoptose eine wichtige Rolle [Farooqui *et al.* 2000].

Cardiolipin (CL) ist ein Diphosphatidylglycerol mit vier Fettsäureestern und wird von dem Enzym CL-Synthase aus PG und CDP-DAG in der inneren Membran der Mitochondrien synthetisiert. Es ist essentiell für die Funktion bestimmter Enzyme der oxidativen Phosphorylierung und damit zur Energiegewinnung für den Herzschlag. Die Hauptkomponente im Herzen ist die vierfach mit Linolsäure substituierte Spezies (CL (18:2)<sub>4</sub>) [Hsu und Turk 2005].



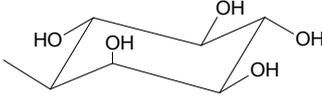
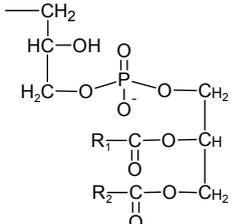
|                      | Kopfgruppe   | Phospholipidklasse      | Abkürzung |
|----------------------|--|-------------------------|-----------|
|                      | — H  | Phosphatidsäure         | <b>PA</b> |
| Ethanolamin          | —CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>                    | Phosphatidylethanolamin | <b>PE</b> |
| Cholin               | —CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>   | Phosphatidylcholin      | <b>PC</b> |
| Serin                | —CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )<br> <br>COO <sup>-</sup>       | Phosphatidylserin       | <b>PS</b> |
| Glycerol             | —CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -OH                                       | Phosphatidylglycerin    | <b>PG</b> |
| Inositol             |   | Phosphatidylinositol    | <b>PI</b> |
| Phosphatidylglycerin |  | Cardiolipin             | <b>CL</b> |

Abb. 1-1: Chemische Strukturen verschiedener Glycerophospholipidklassen.

Neben den Phospholipiden, bei denen die Fettsäuren über Esterbindungen am Molekül gebunden sind und die als Diacyl-Phospholipide bezeichnet werden, können noch weitere Phospholipid-Derivate vorliegen. So kann anstelle der Fettsäure ein langkettiger Alkohol über eine Etherbindung an das Glycerolgrundgerüst verknüpft sein (meist am C1-Atom). Diese PL werden als Etherlipide bezeichnet und weisen als Kopfgruppe hauptsächlich Phosphatidylcholin oder -ethanolamin auf. Ein wichtiger Vertreter ist der so genannte *platelet-activating-factor* (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-Phosphocholin). PAF spielt eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung. Außerdem besitzt PAF eine selektive Wirkung auf den Blutdruck und ist in den Tumor-Stoffwechsel integriert [Detopoulou *et al.* 2009, Mannor *et al.* 2000].

Bei den Enoetherlipiden (auch Plasmalogene genannt) ist ein langkettiger Alkohol über eine Vinylotherbindung an das GlycerinGrundgerüst verknüpft. Als

Kopfgruppe treten auch hier am häufigsten Phosphatidylcholin oder –ethanolamin auf (siehe Abbildung 1-2). Plasmalogene stellen etwa 18% der Phospholipide dar, wobei die Konzentration in verschiedenen Organen sehr stark variieren kann [Morita *et al.* 2010].

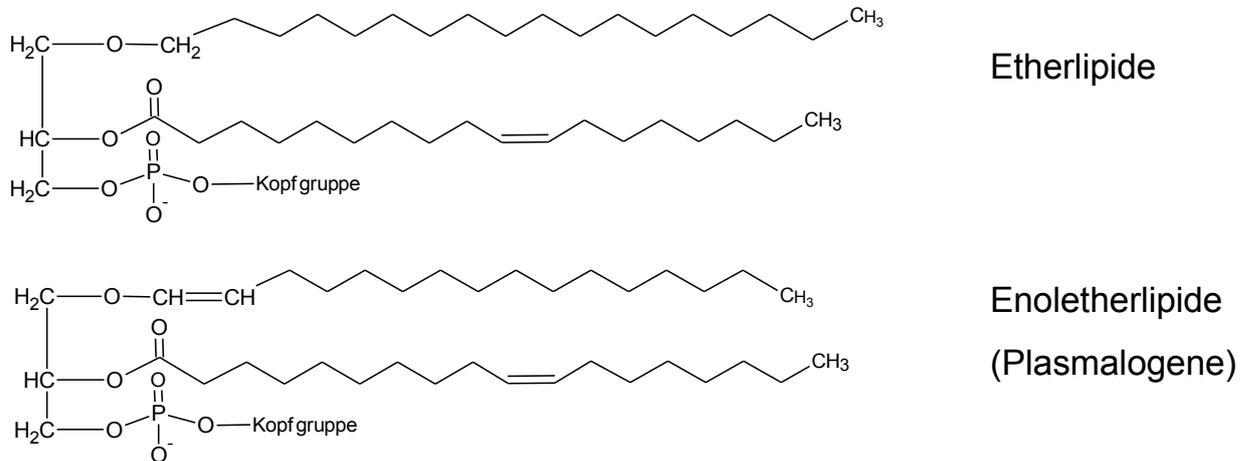
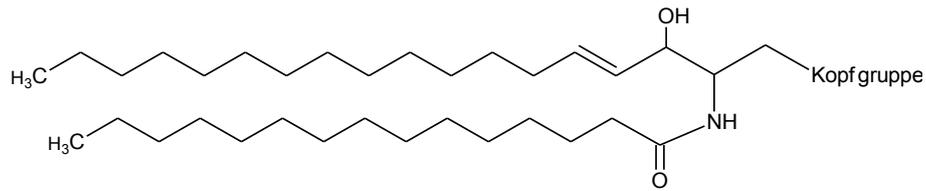


Abb. 1-2: Chemische Strukturen der Etherlipide und Enoletherlipide (Plasmalogene).

### 1.1.4 Sphingolipide

Sphingolipide enthalten als Grundgerüst den 18-kettigen Aminoalkohol Sphingosin, dessen langer hydrophober Kohlenwasserstoffrest die Rolle der Fettsäurekette in den Phospholipiden ersetzt. Ist an das Sphingosinmolekül eine Fettsäure über eine Amidbindung an der C2-Position gebunden, so liegen Ceramide (Cer) vor (Abb. 1-3). Bei Sphingomyelinen (SPH) weist der Aminoalkohol neben der Fettsäure am C1-Atom analog zu den Phospholipiden eine polare Kopfgruppe auf. Dabei handelt es sich in der Regel um Phosphocholin. SPH wirken als Hormone und dienen der Signaltransduktion als intrazelluläre Botenstoffe [Peterson *et al.* 2006]. Zudem sind sie Modulatoren des Zellwachstums und der Apoptose. Hauptsächlich ist die Fettsäure Nervonsäure (24:1) im Molekül enthalten, aber auch Lignocerinsäure (24:0), Cerotinsäure (26:0) und Hexacosaensäure (26:1) sind vorhanden [Martinez *et al.* 1998]. SPH in Säugetieren enthält keine Hydroxy-Fettsäuren, während Ceramide (Cer), Galactosylcerebroside (GalCer) und Sulfatide (S-GalCer) auch mit Hydroxy-Fettsäuren verestert sein können [O'Brien und Rouser 1964].



|                    | Kopfgruppe | Sphingolipidklasse   | Abkürzung       |
|--------------------|------------|----------------------|-----------------|
|                    | O-H        | Ceramid              | <b>Cer</b>      |
| Galaktose          |            | Galaktosylcerebrosid | <b>GalCer</b>   |
| Galaktose-3-sulfat |            | Sulfatid             | <b>S-GalCer</b> |
| Phosphocholin      |            | Sphingomyelin        | <b>SPH</b>      |

Abb. 1-3: Chemische Strukturen einiger Sphingolipide.

Cerebroside zählen zu den neutralen Glykosphingolipiden, denn sie weisen als polare Kopfgruppe einen oder mehrere  $\beta$ -glykosidisch gebundene Zucker auf. Im Nervengewebe kommen fast ausschließlich Galaktosylcerebroside (GalCer) vor, die Glukosylcerebroside (GlcCer) hingegen in anderen Organen. GalCer werden durch das Enzym Galaktosylcerebrosidase in Ceramide gespalten. Im Gegensatz zu den Ceramiden wirken sie als Inhibitoren der Apoptose [Beier und Görögh, 2005].

Sulfatide (S-GalCer) werden den sauren Glykosphingolipiden zugeordnet und enthalten einen modifizierten Zucker, der am C3-Kohlenstoffatom mit Schwefelsäure verestert ist. Sowohl GalCer als auch S-GalCer sind an der Bildung und Erhaltung des Myelins beteiligt [Marcus und Popko 2002].

## 1.2 Anomalien im Lipidstoffwechsel

Die Ursachen für einen gestörten Lipidstoffwechsel können sehr vielseitig sein. Neben genetisch bedingten Vorbelastungen spielen auch äußere Faktoren (z.B. die Ernährung) eine Rolle. Da das Gehirn eines der lipidreichsten Organe ist, verändern viele pathogene Prozesse die Lipidzusammensetzung im Gehirn u. a. neurodegenerative Erkrankungen, Morbus Alzheimer und Schizophrenie. Besonders Anomalien im Phospholipidstoffwechsel werden als Folge vieler Krankheiten beschrieben.

In Tabelle 1 ist eine Auswahl an Krankheiten aufgeführt, bei denen eine veränderte Lipidkonzentration nachgewiesen wurde. Bei Schizophrenie-Patienten wurde eine erhöhte PE-Konzentration *post mortem* im Hirngewebe beobachtet [Horrobin 1998, Ross *et al.* 1999], während die Konzentration dieses Phospholipids bei Alzheimer-Patienten verringert ist [Prasad *et al.* 1998].

Das Barth-Syndrom ist eine seltene x-chromosomal-rezessiv vererbte Krankheit, von der nur die männliche Population betroffen ist. Durch eine verringerte CL-Konzentration, vor allem Tetra-Linolsäure(18:2)-CL, werden Leitsymptome wie Kardiomyopathie und Neutropenie beobachtet [Gebert *et al.* 2009, Chicco und Sparagna 2007]. Auch *post mortem* Untersuchungen des Herzens nach einem Herzinfarkt zeigten, dass Tetra-Linolsäure(18:2)-CL, die im gesunden Herzen häufigste Komponente, stark verringert war. Im Gegensatz dazu waren die sonst geringer vertretenen Komponenten mit höher ungesättigten Fettsäuren (z.B. 20:4 und 22:6) angestiegen [Chicco und Sparagna 2007].

Bei Zellweger-Patienten wurde eine verringerte Plasmalogen-Konzentration in den Peroxisomen beobachtet, denn sie spielen eine wesentliche Rolle in der Synthese von Plasmalogenen [Styger *et al.* 2002]. Das Gaucher-Syndrom ist eine autosomal-rezessive, lysosomale Speicherkrankheit, bei der ebenfalls eine verringerte Plasmalogen-Konzentration nachgewiesen wurde [Moraitou *et al.* 2014].

Auch das Niemann-Pick-Syndrom zählt zu den lysosomalen Speicherkrankheiten, bei der es aufgrund des fehlenden Enzyms Sphingomyelinase zu einer Akkumulation von SPH in den Lysosomen kommt [Kolter *et al.* 2006]. Die Metachromatische Leukodystrophie ist ebenfalls eine Lipidspeicherkrankheit,

wobei aufgrund des Fehlens des Enzyms *Arylsulfatase A* eine Ansammlung von Sulfatid in den Lysosomen resultiert. Ferner ist die Sulfatid-Konzentration bei *Morbus Alzheimer* verringert [Han *et al.* 2002], während bei *Morbus Parkinson* erhöhte Konzentrationen beobachtet wurden [Cheng *et al.* 2003].

**Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Lipiden und Krankheiten**

|                    | Krankheit                              | Beschreibung                           | Literatur                                 |
|--------------------|--|--|---|
| <b>PE</b>          | Schizophrenie                          | ↑ Konzentration im Hirn                | Horrobin 1998,<br>Gattaz und Brunner 1996 |
|                    | Morbus Alzheimer                       | ↓ Konzentration im Hirn                | Prasad <i>et al.</i> 1998                 |
| <b>Cardiolipin</b> | Barth-Syndrom                          | ↑ CL-Degradierung,                     | Chicco, Sparagna 2007                     |
|                    | Herzinfarkt                            | ↓ De-novo-Synthese im Herzen           |   |
| <b>Plasmalogen</b> | Zellweger-Syndrom                      | ↓ Konzentration in den Peroxisomen     | Styger <i>et al.</i> 2002                 |
|                    | Morbus Alzheimer                       | ↓ Konzentration                        | Han <i>et al.</i> 2001                    |
|                    | Gaucher-Syndrom                        | ↓ Konzentration                        | Moraitou <i>et al.</i> 2014               |
| <b>SPH</b>         | Niemann-Pick-Syndrom                   | SPH-Akkumulation in den Lysosomen      | Kolter <i>et al.</i> 2006                 |
| <b>S-GalCer</b>    | Metachromatische Leukodystrophie (MLD) | Sulfatid-Akkumulation in den Lysosomen | Isaac <i>et al.</i> 2006                  |
|                    | Morbus Alzheimer                       | ↓ Konzentration                        | Han <i>et al.</i> 2002                    |
|                    | Morbus Parkinson                       | ↑ Konzentration                        | Cheng <i>et al.</i> 2003                  |

Nicht nur bei neurodegenerativen Erkrankungen liegt ein veränderter Lipidstoffwechsel vor, sondern auch bei Krankheiten wie Diabetes und Carcinomen. In Tumorzellen wurde eine GalCer-Akkumulation an der Zelloberfläche beobachtet, die vermutlich aufgrund der transkriptionellen Repression des Galactocerebrosidase Gens entsteht. Durch die Unterdrückung des Enzyms kann GalCer, welches ein Apoptose-Inhibitor ist, nicht mehr zu Ceramid gespalten werden. Somit wird der Zelltod gehemmt und kann aufgrund des Fehlens von Ceramid, welches als Apoptose-Aktivator fungiert, nicht

eingeleitet werden [Beier und Görögh 2005]. Wang *et al.* (2005) ermittelten zwei PE-Spezies als potentielle Biomarker für Diabetes Typ 2 aus Blutplasma. Bei diesen handelt es sich um PE (16:0/22:6) und PE (18:0/20:4). Auch Lyso-PA zählt zu den bioaktiven Phospholipiden und wurde in höheren Konzentrationen im Blutplasma von Patienten, die an Eierstockkrebs erkrankt waren, nachgewiesen [Mills und Moolenaar 2003]. Lyso-PC (18:1) und Lyso-PC (18:2) werden als potentielle Biomarker für Darmkrebs diskutiert. Ihre Konzentration im Blutplasma von Erkrankten ist deutlich niedriger als bei gesunden Kontrollen [Zhao *et al.* 2007].

### 1.3 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion aus Zellen und Gewebe ist eine weit verbreitete Probenvorbereitungstechnik für die anschließende Analyse von Lipidprofilen. Dafür ist eine einfache und reproduzierbare Methode erwünscht, die ohne Verluste und ohne eine Lipidklasse zu vernachlässigen quantitativ alle Lipide erfasst.

Die älteste Methode zur Lipidextraktion ist die Zweiphasenextraktion bzw. Dualphasenextraktion nach Folch *et al.* (1957), bei der mit Chloroform/Methanol (2:1) homogenisiertes Hirngewebe extrahiert und anschließend mit NaCl-Lösung gewaschen wird. Bligh und Dyer (1959) reduzierten lediglich den Lösungsmittelverbrauch und extrahierten ebenfalls Gewebehomogenat mit Chloroform/Methanol (2:1). Auch Daae und Bremer (1970) bzw. Bjerve *et al.* (1974) nutzten eine Zweiphasenextraktion mit Butanol/Wasser um Lipide aus Rattenleber zu isolieren. Christiansen (1975) führte die Einphasenextraktion ein, um nachweisliche Verluste von Lipiden in der wässrigen Phase zu verhindern. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform/Methanol (2:1) verwendet. Nachdem die ausgefallenen Proteine und die unlöslichen Zellbestandteile von Rinderherz durch Filtrieren entfernt wurden, wurde das Extrakt eingedampft. Mit Chloroform wurden weniger polare und mit Chloroform/Methanol/Wasser (4:10:2) wurden polare Lipide in zwei getrennten Extrakten wieder aufgenommen. Drei Jahre später veröffentlichten Hara und Radin (1978) eine weitere Einphasenextraktion. Im Gegensatz zu dem gängigen Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol verwendeten sie die Lösungsmittel Hexan/Isopropanol. Aus Rattenhirn extrahierten sie mit Hexan/Isopropanol (3:2) die Lipide. Beckonert *et al.*

(2003) extrahierten Lipide aus Brustgewebe mit jeweils gleichen Anteilen an Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:1). Ausgehend von der Folch bzw. Bligh und Dyer Methode entwickelten Matyash *et al.* (2008) eine Zweiphasenextraktionsmethode mit Methyl-*tert*-butylether (MTBE), Methanol und Wasser zur Extraktion der Lipide in Mäusehirn. Sie erhielten Extrakte, die aufgrund ihres geringen Salzgehaltes besser für massenspektrometrische Untersuchungen geeignet waren als chloroformhaltige Extrakte. Eine ähnliche Methode wurde bereits automatisiert und an Blutplasmaproben angewandt [Liebisch *et al.* 2004]. Für eine bessere Wiederfindung von Lyso-Phospholipiden extrahierten Zhao und Xu (2010) nur mit Methanol. Eine weitere Einphasenextraktion stellt die Methode nach Zhou *et al.* (2012) dar, welche Lipide aus Blutplasma mit Isopropanol extrahierten.

## 1.4 Chromatographische Trennmethoden

Chromatographische Trennverfahren nehmen eine zentrale Stellung in der Analytik organischer Verbindungen ein. Sie finden Anwendung in der Probenvorbereitung, Stoffanreicherung und der Trennung komplexer Gemische. Unter dem Begriff Chromatographie werden physikalische Prozesse zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung durch die Adsorption bzw. Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt [Schwedt 1994]. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewendeten Methoden (Festphasenextraktion und die Hochleistungsflüssigchromatographie) erläutert.

### 1.4.1 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion stellt ein schnelles und kostengünstiges System zur Probenvorbereitung dar und zählt zu den adsorptionschromatographischen Verfahren [Kicinski 1996].

Sie hat sich als Methode zur Isolierung und Trennung von Lipiden bewährt [Fauland *et al.* 2013, Zhao *et al.* 2010]. Dabei wird das Analytengemisch in einem Lösungsmittel aufgenommen und auf eine Kartusche mit der stationären Phase aufgetragen. Die Trennung erfolgt auf Grund von Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der stationären festen Phase, dem Analyten und der

mobilen Phase. Durch den Einsatz verschiedener Elutionsmittel kann z.B. eine Abtrennung störender (Matrix-) Komponenten oder eine Auftrennung und Isolierung verschiedener Analyten erfolgen.

Als stationäre Phase werden verschiedene Sorbentien verwendet. Silikagel bzw. Kieselgel ist das am häufigsten verwendete Adsorbens [Grey 2008]. Es besteht aus dreidimensional vernetztem  $\text{SiO}_2$ , wobei an der Oberfläche freie Silanolgruppen vorhanden sind. Diese bestimmen mit ihrem schwach sauren Charakter die Trenneigenschaften dieser stationären Phase und können mit polaren Komponenten über Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen interagieren [Grey 2008].

Durch vielfältige Möglichkeiten der Modifizierung der freien Hydroxygruppen an der Oberfläche des Kieselgels können u. a. unterschiedliche polare und unpolare Sorbentien sowie spezielle Ionenaustauscher erzeugt werden. Phenyl-, Oktyl-, und Oktadecyl-Phasen sind Beispiele für unpolare Sorbentien, während unmodifiziertes Silikagel-, Amino- und Diol-Phasen polare Sorbentien darstellen. An- bzw. Kationenaustauscher finden Anwendung bei der Trennung von basischen und sauren Analyten [Krishnan *et al.* 2009].

Obwohl viele verschieden modifizierte Kieselgele kommerziell erhältlich sind, hat sich neben der reinen Kieselgelphase die Aminopropyl-Phase ( $\text{NH}_2$ -Phase) bei der Analyse von Lipiden durchgesetzt. Die polaren Aminogruppen können mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide wechselwirken und aufgrund ihrer Ionisierbarkeit können sie ebenfalls schwache ionische Wechselwirkungen eingehen [Krishnan *et al.* 2009].

#### 1.4.1.1 Entwicklung der Festphasenextraktion

Bereits lange bevor die ersten SPE-Methoden veröffentlicht wurden, wurden adsorptionschromatographische Verfahren benutzt, um Lipidextrakte aufzutrennen. Hanahan *et al.* beschrieben 1957 eine Methode, mit der über eine Kieselgelsäule Lipidextrakte aus Rattenleber, Rinderleber und Hefen mit unterschiedlichen Chloroform/Methanol-Gemischen aufgetrennt wurden. Gluck *et al.* 1966 verwendeten als stationäre Phase Diethylaminoethyl(DEAE)-Cellulose-Acetat um die Lipide aus Kaninchenleber zu isolieren. Eine weitere stationäre

Phase, Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ ), wurde von Slomiany *et al.* (1970) eingesetzt. Dabei wurden die Lipide aus Rinderserum mit Aceton/Methanol-Gemischen in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen sowie mit Diethylether:Ethanol:0,04M KOH in einzelne Klassen getrennt.

Obwohl bereits im Jahre 1978 die erste Kartusche für die SPE eingeführt wurde, verlief die Entwicklung von SPE-Methoden zunächst relativ zögerlich [Hennion 1999].

Kaluzny *et al.* (1985) gehörten mit zu den ersten Arbeitsgruppen, die eine effiziente SPE-Methode für die Trennung von Lipiden vorstellten. Sie verwendeten dazu Aminopropyl-Phasen ( $\text{NH}_2$ -Phasen) und isolierten verschiedene Lipidklassen aus Rinderfettgewebe. Um die Trennleistung zu erhöhen, verwendeten sie drei SPE-Kartuschen. Über die erste  $\text{NH}_2$ -Kartusche trennten sie die neutralen Lipide, die freien Fettsäuren und die Phospholipide. Die neutralen Lipide wurden im nächsten Schritt über eine zweite  $\text{NH}_2$ -Kartusche in die weiteren Klassen (CE, TAG, Chol, DAG und MAG) aufgetrennt. Die dritte Kartusche wurde verwendet, um eine vorzeitige Elution von Chol zu verhindern.

Wenige Jahre nachdem Kaluzny *et al.* ihre Methode veröffentlichten, nahm die Zahl an publizierten Artikeln zu. So wurde von Hamilton *et al.* (1988) eine weitere Methode zur Lipidklassentrennung beschrieben, wobei CE, TAG, Fettsäuren und Chol aus Serum über eine Kieselgel-Kartusche isoliert wurden. Weiterhin wurden die Phospholipide PE und PI in einer Fraktion beobachtet, während PC und SPH gemeinsam eluierten.

Die überwiegende Anzahl an publizierten Methoden stellten jedoch Erweiterungen der Trennung von Kaluzny *et al.* dar. Relativ früh wurde erkannt, dass bei der Elution der Phospholipide mit Methanol die sauren Phospholipide auf der Kartusche retardiert bleiben [Egberts *et al.* 1988]. Egberts *et al.* verbesserten die Methode, indem sie nach der Abtrennung der neutralen Phospholipide auch die sauren Phospholipide PG, PI und PS aus Fruchtwasser isolierten. Dies erreichten sie mit einer Erhöhung der Ionenstärke durch Zusatz von Ammoniumhydroxid. Auch viele andere Autoren haben ausgehend von der Kaluzny-Methode die Phospholipide weiter aufgetrennt. Kim *et al.* (1990) isolierten PS und PI aus Rattenplasma, indem sie mittels Ammoniumacetat nicht nur die Ionenstärke erhöhten sondern auch den pH-Wert des Eluenten mit Hilfe von Ameisensäure erniedrigten. Alvarez *et al.* (1992) trennten die Lipide in Humansperma auf. Sie

erzielten die Elution von PG, CL, PI und PS mit Chloroform, Methanol und Ammoniumacetat.

Die weitere Auftrennung der einzelnen Phospholipidklassen erfolgt immer noch überwiegend mit Verfahren wie die Dünnschichtchromatographie (*Thinlayer Chromatography*, TLC) oder die Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) [Pietsch *et al.* 1993, Pérez-Palacios *et al.* 2007]. Es wurden aber auch Ansätze gemacht, die einzelnen Phospholipidklassen mittels SPE zu trennen. Publikationen sind dabei oftmals auf eine spezielle Phospholipidklasse bezogen [Egberts *et al.* 1988]. Die Trennung der Phospholipide in ihrer Gesamtheit wurde nur in wenigen Methoden beschrieben.

Für die Auftrennung der sauren Phospholipide nutzte Palmer (1981) die ionischen Wechselwirkungen des Antibiotikums Neomycin. Mit diesem schwachen Anionenaustauscher gelang es ihm, die sauren Phospholipide (PA, PG, PI, PS) aus Rattenhirn und -leber zu trennen und mittels TLC nachzuweisen. Die neutralen Phospholipide (PE, PC, SPH) wurden hingegen nicht getrennt, sondern in einer Fraktion gemeinsam eluiert.

Schweisguth *et al.* (1989) trennten mit Hilfe einer Silikagelkartusche und Eluenten mit verschiedenen Chloroform/Methanol-Verhältnissen die Lipide aus Rinderhirn in vier Fraktionen, die sie anschließend mittels TLC analysierten. Nach der Trennung der neutralen Lipide, wurden zunächst Cerebroside, anschließend PG und PE und als letztes PC, LPC, SPH, PS und PI eluiert.

Pietsch *et al.* (1993) optimierten die Methode nach Kaluzny *et al.*, indem sie nach der Abtrennung der neutralen Lipide und der Fettsäuren, die Phospholipide PC, PE, PS und PI über die gleiche NH<sub>2</sub>-Kartusche fraktionierend eluierten. Hoffmann *et al.* (2005) ergänzten die Methode um einen Schritt und eluierten im ersten Schritt CE mit Hexan. Sie analysierten Lipidextrakte aus gesundem Nierengewebe und Nierenzellkarzinomen. Suchoka *et al.* (2003) isolierten die Gesamtphospholipide aus Blutplasma und trennten diese mittels HPLC weiter in die einzelnen Klassen (PC, PE, PI und lyso-PC) auf.

Bisher wurden jeweils Methoden entwickelt, die auf spezielle Problemstellungen begrenzt waren. Insofern existiert noch keine allgemein anwendbare Methode, die auf verschiedene Probenmatrices übertragbar ist und alle Phospholipidklassen in alle Unterklassen trennt. Dabei ist sowohl eine qualitative als auch quantitative Erfassung der Lipide erstrebenswert.

## 1.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Der Begriff HPLC wurde Anfang der siebziger Jahre eingeführt, um die moderne Hochleistungsmethode von der klassischen Säulen-Flüssigchromatographie, die um 1930 entwickelt wurde, zu unterscheiden.

Die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*) wird zur Auftrennung von schwer- oder nicht flüchtigen Komponenten eingesetzt. Dabei werden die Analyten mit der mobilen Phase (Laufmittel) unter hohem Druck durch eine Säule, die das Trennmateriale enthält, transportiert. In der Trennsäule wird die Probe an der stationären Phase adsorbiert und durch Adsorption/Desorptions-Vorgänge nach Löslichkeitskriterien und Adsorptionsvermögen getrennt. Oft sind HPLC-Anlagen mit UV-Detektoren ausgerüstet, die aber in der Lipidanalytik aufgrund fehlender chromophorer Gruppen nur bedingt einsetzbar sind [Gottwald 1993]. Hierfür eignet sich die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie (MS) (vgl. Kap. 1.5).

Wie bei den SPE-Kartuschen gibt es auch bei den HPLC-Säulen verschiedenste Trennmateriale, wobei im Wesentlichen zwei unterschieden werden:

Bei der Normalphasenchromatographie (NP-HPLC) werden die Analyten über ein Kieselgel oder eine andere polare Phase getrennt. Das verwendete Laufmittel ist unpolarer als die stationäre Phase. Somit werden die Substanzen hinsichtlich ihrer Polarität getrennt. Die Reihenfolge der Elution verläuft von unpolar nach polar.

Bei der Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) ist die stationäre Phase unpolarer als die mobile Phase. Die polaren Silanolgruppen des Kieselgels sind mit unpolaren siliziumorganischen Verbindungen derivatisiert (Silanisierung). Lipophile Analyten werden somit länger auf der Säule zurück gehalten als polare Komponenten [Peterson und Cummings 2006].

Die Trennung von Lipidklassen kann entweder mit der NP-HPLC oder der RP-HPLC erreicht werden. Bei der NP-HPLC basiert die Trennung auf den unterschiedlichen Polaritäten der Phospholipid-Kopfgruppen, wobei die Elution nach steigender Polarität erfolgt. Für die Trennung der Lipideinzelkomponenten innerhalb einer Klasse eignet sich die RP-HPLC aufgrund der unpolaren Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Fettsäureseitenketten besser. In Tabelle 2 ist eine Übersicht einiger ausgewählter Literaturstellen über RP-HPLC-

Methoden zur Trennung von PL-Einzelkomponenten dargestellt. Neben verschiedenen Säulen, werden auch unterschiedliche Eluenten eingesetzt. Die am häufigsten verwendete Säule ist jedoch die RP-C18-Säule; als Eluenten werden vorwiegend Acetonitril und Methanol eingesetzt.

**Tabelle 2: Ausgewählte HPLC-Methoden aus der Literatur zur PL-Einzelkomponententrennung**

| Autor                          | Säule                              | Eluent   | Fluss                     | Detektor              | Spezies |
|--------------------------------|------------------------------------|--|---------------------------|-----------------------|---------|
| Abidi<br><i>et al.</i> 1995    | Diverse<br>C-18                    | Acetonitril/Methanol/50 mM<br>Tetramethyl-ammoniumphosphate<br>(49:49:2)   | Isokratisch<br>1 mL/min   | UV-Detektor<br>208 nm | PA      |
| Abidi<br><i>et al.</i> 1998    | Ultrasphere<br>ODS C-18            | Methanol/Hexan/<br>0,1M Ammoniumacetat (50:3:2,5)  | Isokratisch<br>1 mL/min   | Thermospray-<br>MS    | PS      |
| Yano<br><i>et al.</i> 1998     | RP-18<br>Merck<br>Lichrosorb       | Acetonitril/Methanol/Ethylacetat<br>(12:1:7)   | Isokratisch<br>1,2 mL/min | Fluoreszenz           | Cer     |
| Larsen<br><i>et al.</i> 2002   | PS/DVB<br>C-30<br>C-18             | Ammoniumformiat/2-Propanol/THF<br>(50:35:15)<br>(30:55:15)<br>(35:50:15)   | Isokratisch               | ESI-MS                | PS      |
| Willmann<br><i>et al.</i> 2007 | Nucleodur®<br>Sphinx<br>Phenyl/C18 | Wasser mit 0,1%<br>Ameisensäure/2-Propanol/<br>Methanol/THF (35:30:20:15)  | Isokratisch<br>0,6 mL/min | ESI-MS                | SPH     |
| Helander<br><i>et al.</i> 2009 | C-4                                | A: 2mM Ammoniumacetat/<br>Acetonitril (20:80)<br>B: 2-Propanol   | Gradient<br>0,2 mL/min    | ESI-MS                | PE      |
| Kim<br><i>et al.</i> 2011      | C-18                               | A: Acetonitril/Wasser/Triethylamin/<br>Essigsäure (450:50:2,5:2,5)<br>B: 2-Propanol/<br>Wasser/Triethylamin/Essigsäure<br>(450:50:2,5:2,5) | Gradient<br>0,4 mL/min    | ESI-MS                | CL      |
| Zhou<br><i>et al.</i> 2012     | C-18 HTec<br>Nucleodur®            | Methanol + 5 mM<br>Ammoniumformiat   | Isokratisch<br>1 mL/min   | ESI-MS                | PE, SPH |

## 1.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik, bei der Ionen in der Gasphase nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt werden. Dadurch ist es

möglich, die relative Molekülmasse<sup>1</sup> von Substanzen zu bestimmen. Zudem können Strukturinformationen aus Fragmentierungsexperimenten gewonnen werden. Die heutigen schonenden Ionisierungstechniken ermöglichen die Analyse schwer flüchtiger bzw. thermolabiler Verbindungen, da diese nicht voraussetzen, dass die Moleküle vor der Ionisierung in die Gasphase überführt werden. Für die Lipidanalytik eignen sich schonende Verfahren wie Elektrosprayionisation (ESI), Fast-Atom-Bombardment (FAB) und Matrix unterstützte Laserdesorption-Ionisation (MALDI). Auch die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) kann bei der Analyse von Lipiden eingesetzt werden [Guan 2009].

### 1.5.1 ESI-Massenspektrometrie von Phospholipiden

Eine sanfte Ionisierungstechnik ist die Elektrosprayionisierung (ESI), da in der Regel bei der Ionisierung keine oder nur eine mäßige Fragmentierung der Analytmoleküle erfolgt. Die mittels ESI erzeugten Ionen liegen meist einfach geladen vor, können aber auch mehrfach geladen auftreten. Typischerweise werden so genannte Quasi-Molekülonen detektiert, die durch Anlagerung bzw. Abspaltung von Ionen aus der Lösung entstehen [Fenn *et al.* 1989]. Im positiven Ionenmodus kann beispielsweise die Anlagerung von Protonen, Natrium- oder Kaliumionen beobachtet werden, während im negativen Ionenmodus die Abspaltung von Protonen oder z.B. die Bildung von Chlorid- oder Formiataddukten auftreten können [Hoffmann 2007].

Die Analyse von Phospholipiden mittels ESI-MS hat in den vergangenen 10 bis 15 Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Der Grund hierfür liegt in der einfachen Handhabung. So bedarf es bei dieser Messmethode keiner Derivatisierung, wie es zum Beispiel häufig für die Gaschromatographie erforderlich ist. Zudem ist diese Methode sehr empfindlich, experimentell wenig aufwendig und liefert reproduzierbare Ergebnisse. Ein weiterer Vorteil ist die Analyse von intakten Molekülen, wodurch die genaue Fettsäurekombination der jeweiligen Lipidkomponente ermittelt werden kann [Brügger *et al.* 1997]. Der Nachteil der Analyse von Phospholipiden mit ESI-MS liegt darin, dass ohne großen Aufwand bis heute keine Quantifizierung möglich ist. Jedoch sind viele

---

<sup>1</sup> Die relative Molekülmasse (Nominalmasse) ist monoisotopisch. Sie wird aus den Massen der Isotope mit der geringsten Masse ermittelt [Grey 2008].

Ansätze gemacht worden, um den Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der Konzentration zu bestimmen [Brügger *et al.* 1997, Metzger *et al.* 1995, Han *et al.* 1996, Ford *et al.* 1996].

Die Analyse von Phospholipiden mittels Tandem-Massenspektrometrie liefert im positiven Ionenmodus Informationen über die jeweilige Kopfgruppe. Mit Ausnahme von SPH und PC, bei denen die Kopfgruppe als Produktion abgespalten wird, zeigen alle Phospholipide einen Neutralteilverlust ihrer Kopfgruppe [Murphy 2002].

Im negativen Ionenmodus ist es möglich, die Fettsäurezusammensetzung der PL-Einzelkomponenten zu analysieren. Die Fettsäuren können entweder als Carboxylat-Ionen nachgewiesen werden oder über die Neutralteilabspaltung als freie Fettsäure bzw. als Keten. Zudem ist es möglich, die Position der Fettsäuren am Glycerolgrundgerüst zu bestimmen. Es ist bekannt, dass bei einer Kettenlänge von 16-20 Kohlenstoffatomen mit 1-4 Doppelbindungen zunächst die Fettsäure an der *sn*-2 Position abgespalten wird [Murphy 2002]. Somit ist die Intensität des Fettsäureanion-Signals an *sn*-2 Position höher. Ausnahmen dieser Regel stellen PA, PS und PI dar. Hier ist das Signal des Fettsäureanions an *sn*-1 Position intensiver [Pulfer *et al.* 2003]. Zudem wurde bei diesen Phospholipiden festgestellt, dass die Abspaltung der freien Fettsäure gegenüber der Abspaltung als Keten bevorzugt ist [Willmann 2007].

## 1.6 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es aufgrund der medizinischen Bedeutung der Lipide die Lipidanalytik durch geeignete Kombinationen einzelner Analysetechniken zu optimieren. Die einzelnen Schritte umfassen dabei die Extraktion, die chromatographische Auftrennung, die Detektion, die Strukturaufklärung bzw. die stereospezifische Charakterisierung und die Quantifizierung.

Die Lipidanalytik beginnt mit einem geeigneten Extraktionsverfahren, bei dem die Lipide aus der umgebenden Matrix isoliert werden. Die Lipidextrakte biologischer Proben sind komplexe Gemische verschiedener Lipidklassen. Die vielfältigen Einzelkomponenten einer Lipidklasse unterscheiden sich in der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der gebundenen Fettsäure sowie auch in der Fettsäurebindung. Diese strukturelle Vielfalt der Lipide erschwert jedoch ihre Analyse. Deshalb sind chromatographische Trennmethoden in der Lipidanalytik unverzichtbar.

Für die effiziente Auftrennung von Lipiden und insbesondere von Phospholipiden wird die SPE genutzt. Eine Auftrennung der NL (Chol, CE, TAG, DAG, MAG) wurde bereits in der Arbeitsgruppe entwickelt [Nehen 2011], so dass der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Auftrennung der Phospholipide in deren Unterklassen liegt. Hierzu wird ausgehend von Literaturmethoden ein verbessertes Verfahren entwickelt. Die neu entwickelte Methode wird auf verschiedene Qualitätskriterien (u. a. Reproduzierbarkeit und Wiederfindung) kontrolliert. Um die Übertragbarkeit und Robustheit der entwickelten Methode zu überprüfen, wird diese auf Lipidextrakte unterschiedlicher Zusammensetzung sowie verschiedenen Ursprungs angewandt.

Nach der Lipidklassentrennung mit der SPE ist die weitere Auftrennung ausgewählter Phospholipidklassen unterschiedlichen Ursprungs mit Hilfe der RP-HPLC in die Einzelkomponenten vorgesehen.

Neben den verschiedenen chromatographischen Trennverfahren (SPE, HPLC) werden in dieser Arbeit zur Detektion der Lipide die Massenspektrometrie und die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Aufgrund der Ermittlung struktureller Informationen und dienen sie der Identifizierung, Charakterisierung und (semi-) Quantifizierung der Lipidkomponenten.

Die online-Kopplung der RP-HPLC mit der Massenspektrometrie eignet sich besonders gut für die Identifizierung der Phospholipid-Einzelkomponenten, da die gebundenen Fettsäurereste und deren Position im Molekül durch Tandem-MS ermittelt werden können. Zudem stellt die Massenspektrometrie eine sehr empfindliche Analysetechnik dar, die die Messung von gering konzentrierten Komponenten ermöglicht.

Die Quantifizierung unter Verwendung eines externen Standards erfolgt mit der NMR-Spektroskopie, die neben der Analyse von komplexen Gemischen auch die Strukturaufklärung unbekannter Substanzen ermöglicht. Ein großer Vorteil hierbei ist, dass keine Derivatisierungen nötig sind und so keine Veränderung der Probe erfolgt. Zudem handelt es sich um eine nicht-destruktive Analysetechnik, so dass die Proben im Folgenden weiter bearbeitet werden [Wishart *et al.* 2008, Culeddu *et al.* 1995].

Durch die Kombination verschiedener analytischer Techniken gelingt es somit, die Vorteile der einzelnen Verfahren zu vereinen.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Wahl der Extraktionsmethode

Für die Isolierung von Lipiden aus Gewebe eignet sich besonders die Flüssigphasenextraktion. Dieser Schritt ist ein wichtiger Teil in der Lipidanalytik, denn er stellt eine wesentliche Fehlerquelle dar. Aus diesem Grund werden häufig bereits bewährte Methoden verwendet bzw. modifiziert, um sie an die jeweilige Fragestellung anzupassen.

Aus den vorhandenen Literaturmethoden zur Lipidextraktion (vgl. Kapitel 1.3) wurden drei Verfahren zum Vergleich ausgewählt. Zum einen ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Verfahren (CMB-Methode, Beckonert *et al.* 2003). Zum anderen eine Methode basierend auf Isopropanol (Isopropanol-Methode, Zhou *et al.* 2012), da hier weniger gesundheitsgefährdende Lösungsmittel eingesetzt werden. Und eine auf MTBE basierende Methode (MTBE-Methode; Matyash *et al.* 2008), deren Extrakte einen geringeren Salzgehalt aufweisen und damit für die MS besser geeignet sind.

Für den Vergleich wurde als Probenmaterial neurales Gewebe vom Schwein verwendet. Um einen Einfluss des Lösungsmittelvolumens auszuschließen, wurde in allen Methoden ein identisches Volumen von 9 mL eingesetzt (vgl. Kapitel 5.1, 5.2, 5.3). Die Extrakte wurden mit 1D- und 2D-NMR-Experimenten qualitativ und quantitativ analysiert.

#### 2.1.1 CMB - Gewebeextraktion

Bei der CMB-Methode (vgl. Kapitel 5.1) wird jeweils die gleiche Menge der mit Eis gekühlten Lösungsmittel Methanol/Chloroform/Wasser (1:1:1) eingesetzt und nach jeder Lösungsmittelzugabe wird mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Nach anschließendem Zentrifugieren bilden sich folgende drei Phasen: oben befindet sich die wässrig-methanolische Phase, in der Mitte die denaturierten Proteine als Pellet und unten die Lipide in der chloroformhaltigen Phase. Letztere Phase wird abpipettiert und im Stickstoffstrom eingedampft [Beckonert *et al.* 2003].

### 2.1.2 Extraktion mit Isopropanol

Bei der Isopropanol-Methode (vgl. Kapitel 5.2), die für Blutplasma entwickelt wurde, wird der Probe Isopropanol zugegeben, mit dem Vortex-Schüttler durchmischt, equilibriert und anschließend zentrifugiert [Zhou *et al.* 2012].

Diese Methode wurde mit leichten Modifizierungen an die Extraktion der Lipide aus Schweinehirn angepasst. Dazu wurde das Gewebe zum schonenden Zellaufschluss mit einem Potter homogenisiert, damit die Lipide für die Extraktion zugänglich waren. Im Vergleich zu Plasma sind die Lipide im Gewebe überwiegend in Membranen verankert. Die Equilibrierung und die Zentrifugierung wurden so durchgeführt wie beschrieben.

### 2.1.3 Extraktion mit MTBE

Die MTBE-Methode (vgl. Kapitel 5.3) ist eine speziell für die ESI-MS-Analyse entwickelte Methode, bei der das Gewebehomogenat mit Methanol und MTBE in einem Schüttler inkubiert wird. Zur besseren Phasentrennung wird Wasser hinzugegeben und zentrifugiert [Matyash *et al.* 2008].

Diese Methode wurde mit veränderten Lösungsmittelvolumen durchgeführt, um mit den beiden bereits genannten Extraktionsmethoden vergleichbar zu sein. Es wurde zunächst mit 5 mL MTBE im Potter homogenisiert, dann wurden 2 mL Methanol und schließlich 1,5 mL Wasser zugegeben. Nach 60 min Inkubation wurde 10 min zentrifugiert.

### 2.1.4 Vergleich der Extraktionsmethoden

Die drei untersuchten Methoden wurden nach fünf unterschiedlichen Kriterien verglichen und bewertet. Dabei war die Handhabung, der zeitliche Aufwand, die Eignung der Extrakte und die Qualität sowie Quantität der Ausbeute entscheidend. Die einfachste Handhabung bot die Isopropanol-Methode, denn hierbei gab es lediglich eine organische Phase und ein Pellet. Das Abnehmen der Lipidphase war daher sehr gut möglich. Bei diesem Extraktionsverfahren erwies sich jedoch die Aufnahme des eingedampften Extraktes in deuteriertem Chloroform/Methanol

(2:1) als problematisch, da einige Bestandteile unlöslich waren und abzentrifugiert wurden um die NMR-Messungen nicht zu beeinträchtigen. Möglicherweise wurden durch Isopropanol nicht nur lipophile Bestandteile sondern auch polarere Zellbestandteile extrahiert.

Bei der CMB- und MTBE-Methode bildeten sich jeweils drei Phasen (in unterschiedlicher Reihenfolge): eine wässrig-methanolische Phase, ein Pellet mit unlöslichen Zellbestandteilen und eine lipidhaltige Phase. Aufgrund der geringeren Dichte von MTBE im Vergleich zu Methanol und Wasser war hier die lipidhaltige MTBE-Phase oben, gefolgt von der methanolisch-wässrigen Phase in der Mitte und dem Pellet unten. Dadurch ließ sich der Lipidextrakt einfach abnehmen. Nachteilig bei dieser Methode war jedoch eine schlecht ausgebildete Phasentrennung zwischen wässriger und organischer Phase, so dass die Lipidextrakte geringe Anteile der wässrigen Phase enthielten. Dies wirkte sich negativ auf die Qualität der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aus, welche ein breites Wasser-Signal aufwiesen (siehe Abb. 2.1). Außerdem können die Metabolite der wässrig-methanolischen Phase die Messung beeinflussen. Durch Signalüberlagerungen können die Integrale und somit die Quantifizierung verfälscht werden.

Bei der CMB-Methode befand sich die lipidhaltige Chloroformphase aufgrund der höheren Dichte unten, getrennt von der methanolisch-wässrigen Phase (oben) durch das Pellet (Mitte). Somit zeigte diese Lösungsmittelkombination eine bessere Phasentrennung. Es war zwar insgesamt schwieriger die Lipidphase abzutrennen, aber durch die räumliche Trennung zur wässrigen Phase durch das Pellet, konnte der Lipidextrakt sauber abgenommen werden. Damit war die Handhabung insgesamt einfacher und weniger fehleranfällig als bei den anderen Methoden.

Der zeitliche Aufwand der drei Extraktionsmethoden hing zunächst von dem ersten Schritt, bei dem mit dem Potter homogenisiert wurde, ab. Bei der CMB- und MTBE-Methode wurden je drei Lösungsmittel verwendet, während es bei der Isopropanol-Methode nur Isopropanol war. Das zweite Kriterium für die Zeit stellte hier die Inkubation dar, die bei der Isopropanol-Methode bei 10 min und bei der MTBE-Methode sogar bei 60 min lag. Bei der CMB-Methode erfolgte keine Inkubation. Als letztes hing der zeitliche Aufwand von der Dauer des Zentrifugierens ab. Bei der Isopropanol-Methode wurden 5 min, bei der MTBE-

Methode wurden 10 min und bei der CMB-Methode wurden 30 min zentrifugiert. Insgesamt stellte die Isopropanol-Methode mit 20 min die schnellste Methode dar.

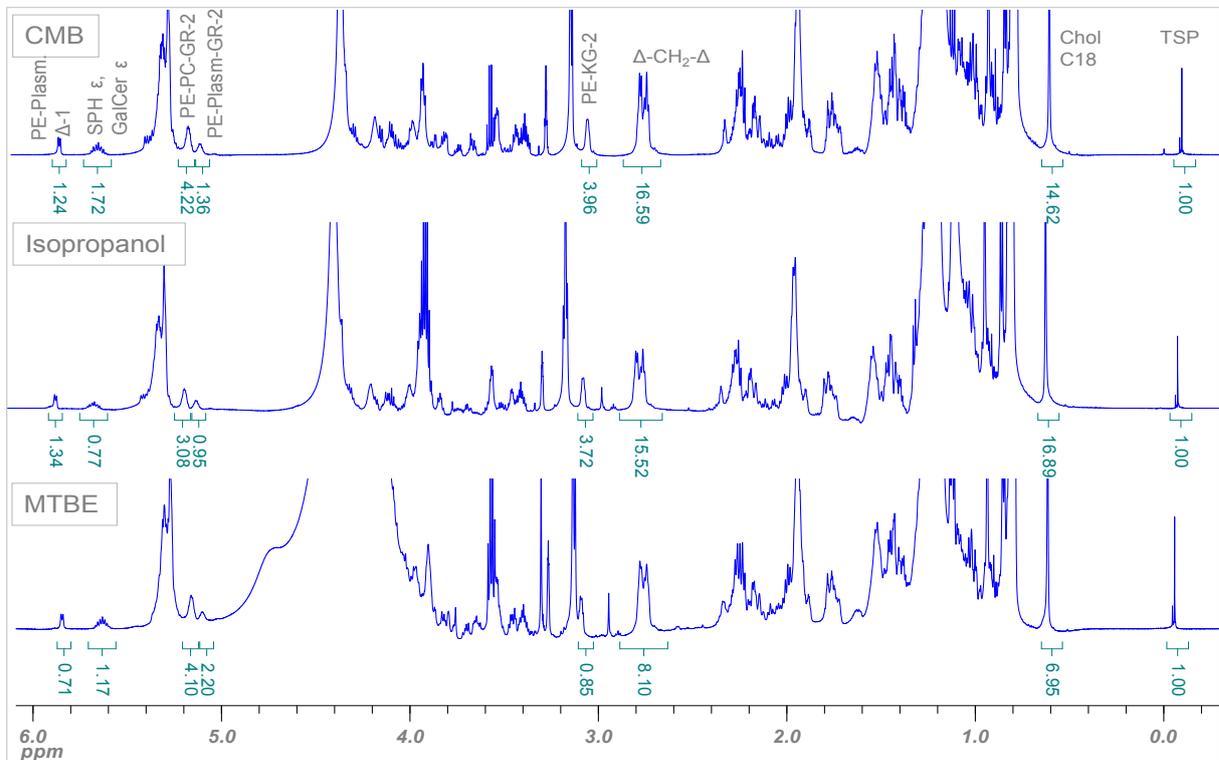


Abb.: 2-1: Ausschnitte aus den 600 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der CMB-, Isopropanol- und MTBE-Extrakte.

Qualitative Unterschiede in den Extrakten konnten nicht festgestellt werden. In allen drei Lipidextrakten wurden folgende Lipide identifiziert: Chol, TAG (Nebenkomponente), DAG (Nebenkomponente), GalCer, PE, PE-Plasmalogen, PC, SPH, PS (nur im HSQC-Spektrum nachweisbar, sodass aufgrund von Signalüberlagerungen für PS keine Quantifizierung aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum möglich ist) und PI (nur im ESI-MS nachweisbar).

Im Gegensatz dazu wurden bei einem quantitativen Vergleich einiger ausgesuchter Signale Unterschiede beobachtet. Demnach wurde mit der MTBE-Methode eine geringere Extraktionseffizienz erzielt. Vor allem Cholesterol aus der Klasse der neutralen Lipide war im Vergleich zu den anderen beiden Methoden deutlich geringer konzentriert. Auch PE und Plasmalogene waren im MTBE-Extrakt nur geringfügig enthalten. Im Isopropanol-Extrakt hingegen war der Anteil

an neutralen Lipiden hoch (vgl. CMB-Methode), während der Anteil für GalCer geringer war. Für die CMB-Extraktion kann festgehalten werden, dass die neutralen Lipide etwas geringer konzentriert als bei der Isopropanol-Methode waren. PE und GalCer jedoch waren in hoher Konzentration enthalten. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse/Bewertung ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der drei Extraktionsmethoden**

|                             | <b>CMB</b>  | <b>Isopropanol</b>   | <b>MTBE</b>  |
|-----------------------------|---|--|--|
| <b>Handhabung</b>           | erschwert   | einfach  | einfach  |
| <b>Zeitlicher Aufwand</b>   | 3 LSM*= 3 x Potter<br>30 min Zentrifuge<br>= ~ 45 min       | 1 LSM*= 1x Potter<br>10 min Inkubation<br>5 min Zentrifuge<br>= ~ 20 min | 3 LSM*= 3 x Potter<br>60 min Inkubation<br>10 min Zentrifuge<br>= ~ 85 min |
| <b>Eignung der Extrakte</b> | <sup>1</sup> H-NMR gute Auflösung<br>-klare NMR-Lösung      | <sup>1</sup> H-NMR schlechtere Auflösung<br>-trübe NMR-Lösung            | <sup>1</sup> H-NMR schlechtere Auflösung<br>-trübe NMR-Lösung              |
| <b>Quantitative Analyse</b> | Chol ↓<br>PE ↑<br>GalCer ↑<br>Plasm ↑                       | Chol ↑<br>GalCer ↓<br>Lyso-PL ↓<br>Plasm ↑                               | Chol ↓<br>PE ↓<br>GalCer ↑<br>Plasm ↓                                      |
| <b>Qualitative Analyse</b>  | Chol, TAG, DAG, GalCer, PE, PE-Plasmalogen, PC, SPH, PS, PI |  |  |

\* LSM= Lösungsmittel

Zusammenfassend kann aufgrund der besseren Eignung der Extrakte für die NMR-Analyse die CMB-Methode empfohlen werden. Auch quantitative Betrachtungen zeigen, dass diese Methode für die Extraktion von Lipiden aus Gewebe geeigneter ist. Der zeitliche Aufwand könnte verringert werden, in dem kürzer zentrifugiert wird. Die Isopropanol- und MTBE-Methode sind für eine quantitative Analyse mittels der NMR-Spektroskopie nicht zu empfehlen. Somit wurde in dieser Arbeit die CMB-Methode mit einer verkürzten Zentrifugierzeit (20 min) benutzt, da auch dabei vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden.

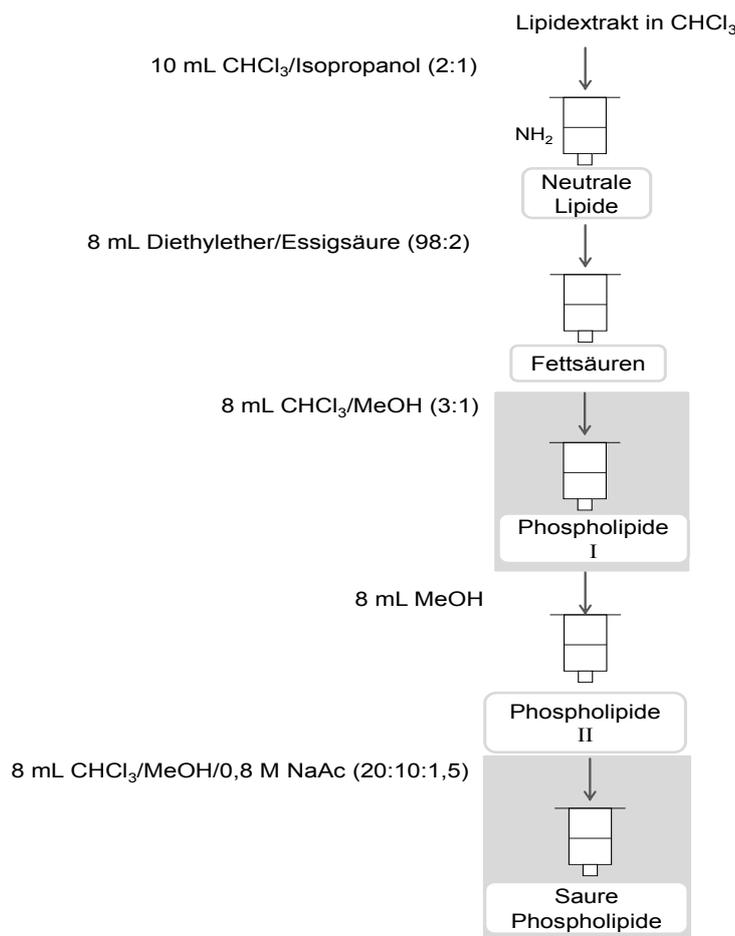
## 2.2 SPE Methodenentwicklung

Ausgehend von verschiedenen Methoden aus der Literatur wird in dieser Arbeit eine SPE-Methode zur Auftrennung von Phospholipiden entwickelt. Diese Methodenentwicklung erfolgt in mehreren Abschnitten. Im ersten Abschnitt wird eine Literaturmethode modifiziert und in den nachfolgenden Abschnitten werden die Trennprobleme bestimmter Phospholipidklassen beschrieben. Aus Literaturmethoden (siehe Kapitel 1.4.1) wurden zwei vielversprechende SPE-Methoden ausgewählt, bei denen die eine mit Aminopropylkartuschen [Kaluzny *et al.* 1984] und die andere mit Silikagelkartuschen [Schweisguth *et al.* 1989] durchgeführt wird. Erstere Methode umfasst die Trennung aller Lipidklassen, so dass durch die Weiterentwicklung der Methode alle neutralen Lipide und alle Phospholipide in die einzelnen Klassen getrennt werden können. Bei der SPE-Methode nach Schweisguth *et al.* (1989) handelt es sich um eine gezielte Auftrennung der Phospholipidklassen. Eine Kombination dieser beiden Methoden stellt somit eine umfassende Trennmethode dar.

Der Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung einer Phospholipidklassentrennung in dieser Arbeit ist die weit verbreitete SPE-Methode nach Kaluzny *et al.* (1984) (siehe Kapitel 5.4). Dabei werden die Lipide unter Verwendung von drei Aminopropylkartuschen in acht Fraktionen nach steigender Polarität getrennt. Diese diente bereits innerhalb der Arbeitsgruppe als Ansatz für die Entwicklung einer optimierten Trennmethode der neutralen Lipide [Nehen 2011], so dass in dieser Arbeit nur der erste Teil dieser Methode modifiziert wird, da hier die Elution der Phospholipide erfolgt. Alle erhaltenen Fraktionen aus der SPE-Methodenentwicklung wurden NMR-spektroskopisch untersucht und die Integrale miteinander verglichen.

### 2.2.1 Modifizierte Methode nach Kaluzny *et al.* 1985

Im Verfahren nach Kaluzny *et al.* (1985) werden zunächst die neutralen Lipide, anschließend die freien Fettsäuren und danach die Phospholipide getrennt. Die ersten beiden Schritte der Originalmethode, welche anhand von Standards überprüft wurden, werden beibehalten. Um eine Trennung der verschiedenen Phospholipidklassen zu erreichen, wird als nächstes ein zusätzlicher Fraktionsschritt eingeführt (Abb.2-2, Phospholipide I), bei dem zunächst die Phospholipide (PE, PC) mit Chloroform/Methanol (3:1) eluiert werden. Dann wird analog der Originalmethode mit Methanol eluiert, um weitere Phospholipide (SPH) abzutrennen. Der letzte Elutionsschritt stellt eine Erweiterung dar, die nach Alvarez *et al.* (1992) durchgeführt wird, um saure Phospholipide (PS, PI, PA) mittels Chloroform/Methanol/0,8 M Natriumacetat (20:10:1,5) zu erhalten.



**Abb. 2-2:** Schematische Darstellung des ersten Teils der SPE-Methode nach Kaluzny *et al.* (1985) sowie der Erweiterung (grau unterlegt).

Dieses modifizierte Verfahren wurde mit einem Standardgemisch bestehend aus Chol, TAG, PE, PC, SPH und PI getestet. Die neutralen Lipide Chol und TAG eluierten quantitativ zusammen in der ersten Fraktion. In der Fraktion „Phospholipide I“ wurde PE, PC und SPH identifiziert, während in der darauf folgenden Fraktion „Phospholipide II“ PC und SPH eluiert wurden. PI eluierte in der letzten Fraktion. Die Wiederfindung für Chol und TAG lag zwischen 80-88 %, während sie für PE mit < 40 % eher sehr gering ausfiel. Die Wiederfindung für PC und SPH lag zwischen 70-80 %. Für PI konnte die Wiederfindung aufgrund von Signalverbreiterungen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht bestimmt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diese Methode neben der Trennung der neutralen Lipide auch eine ansatzweise Trennung der Phospholipide ermöglicht. Dies zeigt sich vor allem bei der Elution von PE, welches nur in der Phospholipide I Fraktion nachgewiesen wurde. Aufgrund der geringen Wiederfindung und der schlechteren Reproduzierbarkeit der PE-Elution von der Aminopropylkartusche wird im Folgenden jedoch nicht-modifiziertes Kieselgel zur Trennung der Phospholipide verwendet.

### 2.2.2 Trennversuche von PE, PC und SPH

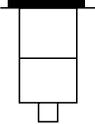
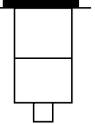
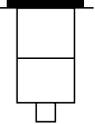
Im zweiten Abschnitt der Methodenentwicklung ist es das Ziel, die Phospholipide PE, PC und SPH über eine Silikagelkartusche aufzutrennen. Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse wurden folgende Eluenten mit steigender Polarität eingesetzt: (1) Chloroform/Methanol (3:1), (2) Chloroform/Methanol (1,5:1) und (3) Methanol.

Die drei Phospholipide PE, PC und SPH weisen trotz ihrer ähnlichen Struktur unterschiedliche Polaritäten auf. Die Ethanolamin-Kopfgruppe ist unpolarer als die Cholin-Kopfgruppe, solange die PE-Aminogruppe nicht protoniert ist. PC und SPH haben die gleiche Kopfgruppe, doch PC ist ein Glycerol-Derivat während SPH ein Sphingosin-Grundgerüst aufweist. Somit tragen bei PC zwei Esterbindungen und bei SPH eine Amidbindung sowie eine freie Hydroxy-Gruppe zur Polarität des Grundgerüsts bei. Außerdem befinden sich im SPH-Molekül sowohl Wasserstoffbrückenakzeptoren als auch Wasserstoffbrückendonoren. Im PC-Molekül hingegen sind nur Wasserstoffbrückenakzeptoren vorhanden. Dadurch

kann SPH stärkere intermolekulare Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Folglich wird eine Elutionsreihenfolge von PE, PC und SPH erwartet. Die erste Fraktion enthielt ausschließlich PE. In der zweiten Fraktion wurden restliches PE (20 %) und PC nachgewiesen. Die letzte Fraktion enthielt PC und SPH. Für alle drei Phospholipide war sowohl die Wiederfindungsrate (PE 75 %, PC 88 %, SPH 80 %) als auch die Reproduzierbarkeit gut. PE, PC und SPH eluierten zwar in der erwarteten Reihenfolge, eine vollständige Trennung der drei Phospholipide wurde jedoch noch nicht erreicht. Deshalb benötigt diese Trennung noch Verbesserungen, die im folgenden Kapitel beschrieben sind.

### 2.2.3 Optimierung der PC-Trennung

Zur Trennung von PE, PC und SPH wurden weitere Ansätze durchgeführt. Aus den vorherigen Ergebnissen war bekannt, dass PE mit Chloroform/Methanol (3:1) noch nicht vollständig eluierte. Des Weiteren wurden PC und SPH mit einem Gemisch von Chloroform/Methanol in einem Verhältnis von 1,5:1 noch nicht getrennt. Der Schwerpunkt der folgenden Experimente lag zunächst auf der Trennung von PC, weshalb das erste und dritte Lösungsmittel beibehalten wurden. Es wurden drei verschiedene Lösungsmittelgemische für die PC-Abtrennung ausgetestet (Abb. 2-3), wobei gezielt nur der zweite Eluent verändert wurde, um dessen Einfluss zu untersuchen. Nachdem die Polaritäten verschiedener Lösungsmittel gemäß der Elutropen Reihe verglichen wurden, wurden folgende Gemische ausgewählt: Chloroform/Acetonitril (1:2), Diethylether/Methanol (1:1) und Ethylacetat/Methanol (1:1).

| A   | B   | C   |
|---|---|---|
| SiOH<br> | SiOH<br> | SiOH<br> |
| 1: 12 mL CHCl <sub>3</sub> :MeOH (3:1)  | 1: 12 mL CHCl <sub>3</sub> :MeOH (3:1)  | 1: 12 mL CHCl <sub>3</sub> :MeOH (3:1)  |
| 2: 12 mL CHCl <sub>3</sub> :Acetonitril (1:2)   | 2: 12 mL Diethylether:MeOH (1:1)  | 2: 12 mL Ethylacetat:MeOH (1:1)   |
| 3: 12 mL MeOH   | 3: 12 mL MeOH   | 3: 12 mL MeOH   |

**Abb. 2-3: Trennansätze von PE, PC und SPH über eine Silikagelkartusche.**

Der Vergleich der <sup>1</sup>H-Spektren der jeweiligen 2. Fraktion (in Abb. 2-3 grau unterlegt) zeigte, dass (A) Chloroform/Acetonitril die geringste Elutionseffizienz aufweist, denn diese Fraktion enthielt lediglich 20 % PC. Mit Ethylacetat/Methanol (C) eluierte 25 % PC. Die beste Elutionseffizienz wurde bei (B) Diethylether/Methanol (1:1) mit 92 % erreicht. Allerdings eluierte hier auch bereits SPH.

Nach der elutropen Reihe für Kieselgel besitzen Ethylacetat und Diethylether die gleiche Elutionskraft ( $\epsilon^0 = 0,38$ ) [Schwedt 1994]. Die Elutionskraft bzw. Elutionsstärke ( $\epsilon^0$ ) ist ein Maß zur Verdrängung des Analyten von der stationären Phase, die definitionsgemäß für die Adsorption von Pentan an reinem SiO<sub>2</sub> null ist. Trotz gleicher Elutionskraft können bei Verwendung von Gemischen Unterschiede in den Trenneffekten auftreten, die auf sekundäre Lösungsmittelleffekte zurückzuführen sind. Dabei sind die Polaritäten einzelner Lösungsmittel, sowie spezifische Wechselwirkungen auf molekularer Ebene von besonderer Bedeutung. Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wechselwirkungen mit  $\pi$ -Systemen und sterische Wechselwirkungen sind folglich ebenfalls zu berücksichtigen [Schwedt 1994].

Mit Diethylether/Methanol (1:1) wurde somit die stärkste Elutionseffizienz für PC erzielt und im Folgenden zunächst übernommen, trotz der Koelution von SPH.

## 2.2.4 Auftrennung der Phospholipide aus Schweinehirn

Die bisherigen Trennexperimente wurden anschließend an einem realen Extrakt getestet, welcher eine komplexere Lipidzusammensetzung hat als die verwendeten Standardlösungen. Dazu wurde ein Lipidextrakt aus Schweinehirn zunächst über eine Aminopropylkartusche analog nach Kaluzny *et al.* aufgetrennt. Die so erhaltenen Phospholipide wurden im Stickstoffstrom eingedampft und in Chloroform wieder aufgenommen. Anschließend wurden sie auf eine Silikagelkartusche aufgetragen. In Tabelle 4 sind sowohl die Elutionsschritte als auch die Ergebnisse dargestellt.

**Tabelle 4: Ergebnisse aus der SPE-Auftrennung der PL aus Schweinehirn über eine Kieselgelkartusche**

| <b>Fraktion</b> | <b>Eluent</b>                 | <b>Ergebnisse</b>     |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------|
| <b>1</b>        | CHCl <sub>3</sub> /MeOH (3:1) | GalCer, PE, PE-Plasm. |
| <b>2</b>        | CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2:1) | PE, PE-Plasm.         |
| <b>3</b>        | Diethylether/MeOH<br>(1:1)    | PC                    |
| <b>4</b>        | MeOH                          | PC, SPH               |

Der zweite Schritt wurde an dieser Stelle ergänzt, um PE vollständig ab zu trennen, so dass es nicht in die folgende PC-Fraktion verschleppt wird. In der 1. Fraktion wurden GalCer, PE-Plasmalogene und PE identifiziert. GalCer kommen vor allem im Gehirn vor und machen etwa 30 % der gesamten Lipidkonzentration des Myelins aus [Han *et al.* 2005]. Die Plasmalogene der PE-Klasse kommen vor allem in neuronalem Gewebe vor. Diese besonderen Phospholipid-Spezies sind eine Quelle für Arachidonsäure. Außerdem erleichtern sie die Membranfusion und schützen die Zelle vor Oxidationsprozessen [Braverman *et al.* 2012]. In der 2. Fraktion befanden sich in geringer Menge PE

und PE-Plasmalogene. Die 3. Fraktion enthielt ausschließlich PC. In der letzten Fraktion wurden restliches PC und SPH nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Trennung der durch die Kaluzny-Methode erhaltenen Phospholipide mit einem nachfolgenden Trennschritt über eine Silikagelkartusche einen möglichen Ansatz darstellt. Der Nachteil dieser Kombination liegt jedoch in der Verwendung von zwei Kartuschen. Dadurch sind, abgesehen von dem erhöhtem Materialverbrauch, Verluste der Lipide möglich. Außerdem können weitere Fehler durch die zusätzlichen Schritte (wie z.B. Abdampfen) erfolgen. Deshalb wird diese Methode für eine Quantifizierung als unzureichend eingestuft, weil die Quelle für zufällige Fehler zu groß ist. Das nächste Ziel ist es somit, auch die neutralen Lipide über die Silikagelkartusche zu trennen, damit die Aminopropylkartusche eingespart werden kann. Dadurch sollten zum einen eine bessere Wiederfindung erreicht und zum anderen Zeit und Kosten eingespart werden.

Im nächsten Abschnitt wird die SPE-Methode nach Schweisguth *et al.* (1989) vorgestellt, die mit verschiedenen Chloroform/Methanol-Verhältnissen unter Verwendung einer Silikagelkartusche durchgeführt wird.

### 2.2.5 Methode nach Schweisguth *et al.* 1989

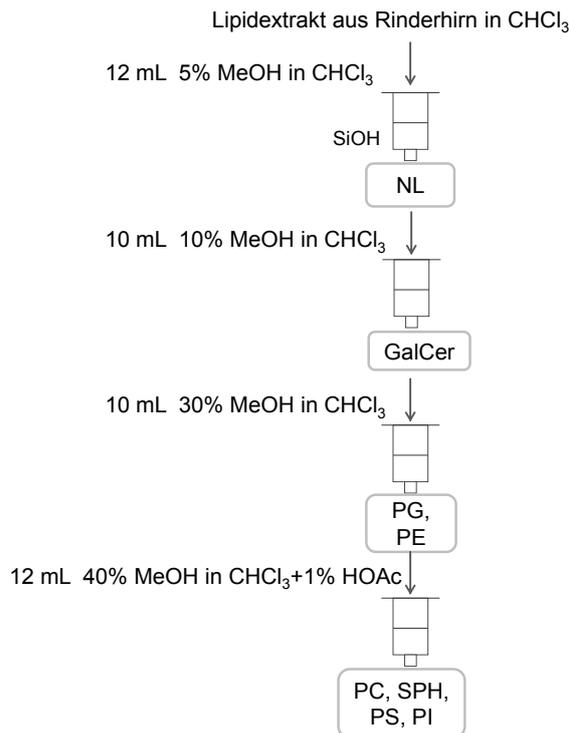
Schweisguth *et al.* trennten ein lipophiles Rinderhirnextrakt über eine Silikagelkartusche in vier Schritten auf und analysierten die Fraktionen anschließend über die Dünnschichtchromatographie. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt.

Zunächst werden die neutralen Lipide (NL) mit 5 % Methanol in Chloroform eluiert. In den nächsten Schritten wird der Methanol-Anteil gesteigert, so dass mit 10 % Methanol in Chloroform Cer und mit 30 % Methanol in Chloroform PG und PE eluiert werden. Für die Elution von PC, SPH, PS und PI wird 40 % Methanol in Chloroform, versetzt mit 1 % Essigsäure (HOAc), verwendet.

Der Vorteil dieser SPE-Methode liegt darin, dass nur eine SPE-Kartusche verwendet wird und eine einfache Lösungsmittelzusammensetzung sowie eine geringe Lösungsmittelmenge benötigt werden, so dass die Methode als weiterer

Ausgangspunkt für eine Entwicklung einer Phospholipidklassenaufftrennung eingesetzt wurde.

Hierfür wurde ein Lipidextrakt aus Schweinehirn mit der oben beschriebenen Methode aufgetrennt und die Fraktionen mit der NMR-Spektroskopie untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 2-4: Übersicht der Festphasenextraktion nach Schweisguth *et al.* 1989.**

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der ersten Fraktion (Abb. 2-5) wurden die neutralen Lipide Chol und in geringerer Menge TAG und DAG vollständig eluiert. Daneben wurden GalCer identifiziert.

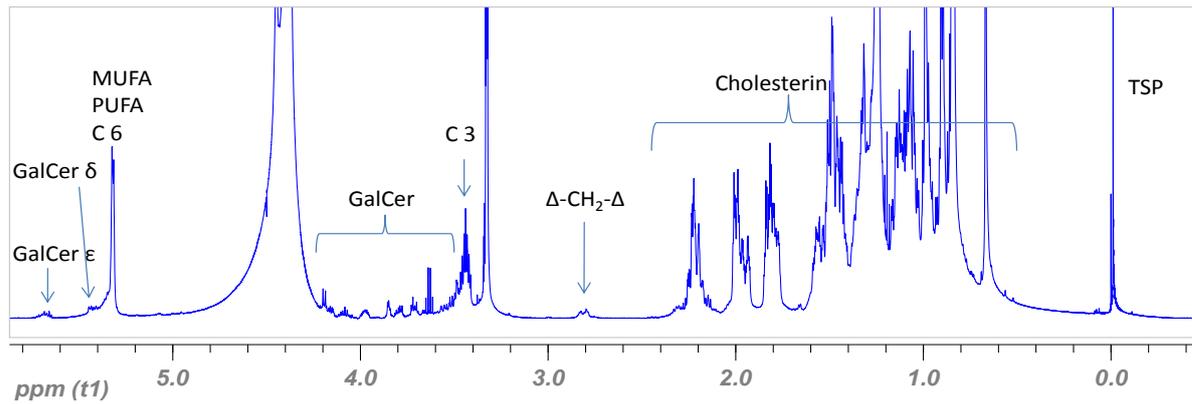


Abb. 2-5: Ausschnitt aus dem 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der 1. Fraktion nach Schweisguth.

In der zweiten Fraktion wurden ausschließlich GalCer nachgewiesen (Abb. 2-6). Sowohl aus dem  $^1\text{H}$ -Experiment als auch aus dem HSQC-Experiment (nicht gezeigt) geht hervor, dass die Fettsäuren der GalCer in beiden Fraktionen gesättigt oder einfach ungesättigt vorliegen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden nicht beobachtet. Maldonado *et al.* (2008) berichten ebenfalls nur von einfach ungesättigten Fettsäuren bei GalCer. Im Vergleich zur ersten Fraktion sind die chemischen Verschiebungen der GalCer, die in der zweiten Fraktion eluierten, im HSQC-Spektrum leicht verändert. Dies zeigt sich vor allem bei den  $\alpha$ -Methylen-Protonen des Grundgerüsts, die der Galaktose benachbart sind. Auch die Aufspaltungen der  $\epsilon$ - und  $\delta$ -Methinprotonen des Grundgerüsts unterscheiden sich im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Typen von GalCer handelt, die sich durch eine Hydroxy-Gruppe in  $\alpha$ -Position am Fettsäurerest unterscheiden (Typ 1 hydroxyliert, Typ 2 nicht hydroxyliert). In der ersten Fraktion eluiert der weniger polare Typ 2 zusammen mit den neutralen Lipiden und in der zweiten Fraktion eluieren beide Typen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines aus beiden Typen bestehenden Standards überprüft (siehe Abschnitt 2.2.6).

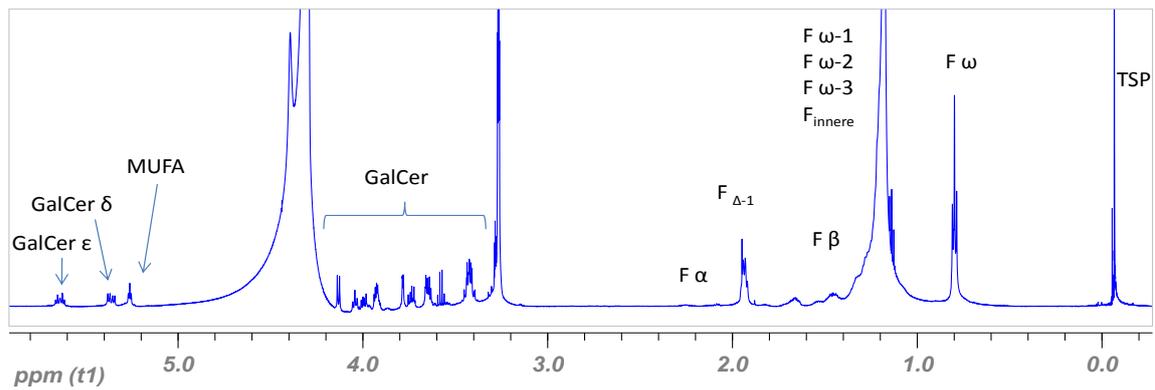


Abb. 2-6: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der 2. Fraktion nach Schweisguth.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der dritten Fraktion ist in Abbildung 2-7 dargestellt. Darin wurden PE detektiert, wobei nicht nur Diacyl-PEs, sondern auch PE-Plasmalogene enthalten sind. Des Weiteren fällt auf, dass das Methylen-Signal der mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei 2,67 ppm im Vergleich zu den anderen Spektren intensiver ist. Daraus ist zu schließen, dass die PE-Spezies überwiegend mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten. Die Interpretation des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums lässt zunächst eine geringe Verschiebung der GalCer vermuten. Dies konnte jedoch durch das HSQC-Spektrum nicht bestätigt werden. Aus dem 2D-Spektrum geht eindeutig hervor, dass es sich hierbei um einen anderen Verbindungstyp handeln muss. Im Gegensatz zu den ähnlichen <sup>1</sup>H-Verschiebungen unterscheiden sich die dazugehörigen <sup>13</sup>C-Verschiebungen von denen der GalCer. Vermutlich handelt es sich ebenfalls um eine GalCer-Spezies, welche jedoch anders substituiert ist. Für eine Identifizierung wurde diese Fraktion weiter aufgetrennt und die unbekannte Spezies isoliert (siehe Abschnitt 2.2.7).

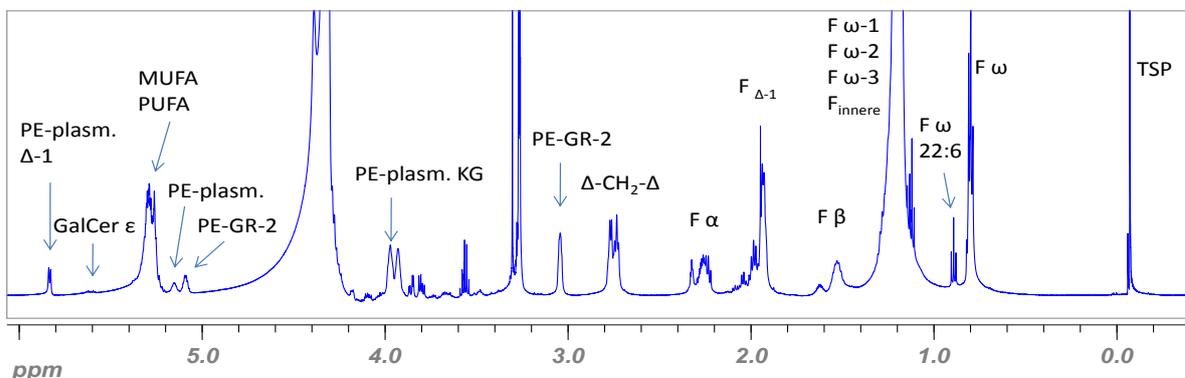


Abb. 2-7: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der 3. Fraktion nach Schweisguth.

In der letzten Fraktion wurde lediglich in geringer Menge PC identifiziert (Abb. 2-8). Auch hier wurden Spezies mit mehrfach-ungesättigten Fettsäuren identifiziert ( $\Delta$ -CH<sub>2</sub>- $\Delta$ ). Demnach scheint die Polarität des letzten Eluenten nicht ausreichend zu sein, um auch die polareren Phospholipide wie z. B. SPH zu eluieren. Diese Phospholipide verbleiben auf der Kartusche.

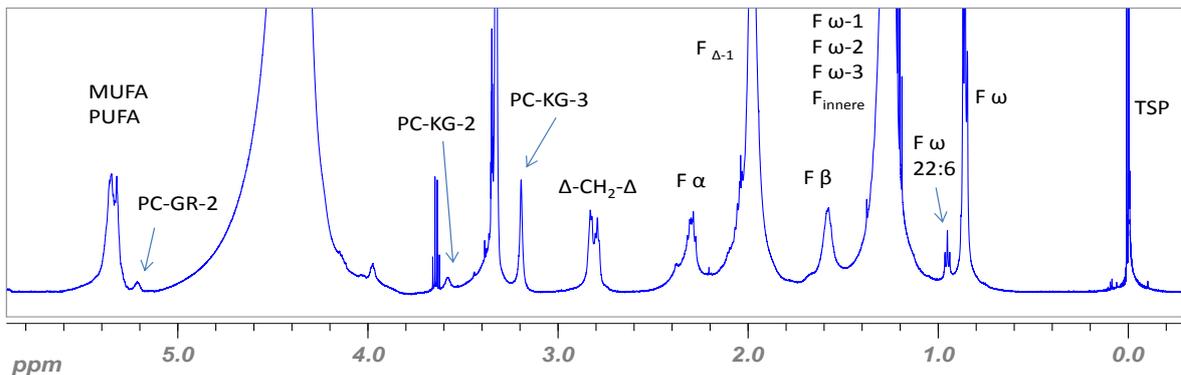


Abb. 2-8: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der 4. Fraktion nach Schweisguth.

Im Vergleich zu Schweisguth *et al.*, die Lipide aus Rinderhirn trennten, wurden bei der Auftrennung von Lipiden aus Schweinehirn ähnliche Ergebnisse beobachtet (vgl. Tab. 5).

Die Trennung der NL in der ersten Fraktion verlief erfolgreich, jedoch wurden hier zusätzlich GalCer nachgewiesen. Daneben detektierten Schweisguth *et al.* lediglich Chol, während in dieser Arbeit auch TAG und DAG in geringen Mengen identifiziert wurden. Die zweite Fraktion enthielt dagegen wie in der Literatur beschrieben ausschließlich GalCer.

**Tabelle 5: Vergleich der Ergebnisse mit denen von Schweisguth *et al.***

| Fraktion | Eluent                                    | Ergebnisse von Schweisguth | Eigene Ergebnisse                 |
|----------|---|----------------------------|-----------------------------------|
| 1        | 5% MeOH<br>in CHCl <sub>3</sub>           | Chol                       | Chol, TAG, DAG,<br>GalCer (Typ 2) |
| 2        | 10% MeOH<br>in CHCl <sub>3</sub>          | GalCer                     | GalCer<br>(Typ 1 und Typ 2)       |
| 3        | 30% MeOH<br>in CHCl <sub>3</sub>          | PG, PE                     | PE, PE-Plasmalogen,<br>GalCer     |
| 4        | 40% MeOH in<br>CHCl <sub>3</sub> +1% HOAc | PC, SPH, PS, PI            | PC                                |

In der nächsten Fraktion eluierten bei Schweisguth *et al.* PG und PE. In dieser Arbeit wurden PE, PE-Plasmalogene und GalCer nachgewiesen. Zur Abtrennung von PE und seinen Plasmalogen-Varianten ist damit ein Gemisch von 30 % Methanol in Chloroform gut geeignet. Obwohl Schweisguth *et al.* PG im Rinderhirn nachwies, konnte im Schweinehirn mittels der NMR-Spektroskopie kein PG identifiziert werden. Dies stimmt mit Ergebnissen von Tamai *et al.* (1975) und Becart *et al.* (1990) überein, die ebenfalls Lipide im Schweinehirn mittels SPE untersuchten und kein PG beobachteten. Ternes *et al.* (2005) analysierten die Lipide im Rinderhirn und identifizierten ebenfalls kein PG. Es wurde in höherer Konzentration nur in der Lunge nachgewiesen [Egberts *et al.* 1988, Christie 1985]. In der letzten Fraktion eluierten laut Schweisguth PC, SPH, PS und PI. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich PC in geringer Konzentration nachgewiesen. Dabei ist PC eine der Hauptkomponenten von biologischen Membranen und liegt in neuronalen Lipidextrakten in hohen Konzentrationen vor. Auch das Fehlen von SPH ist ein weiterer Hinweis, dass die Polarität des letzten Eluenten nicht ausreichend ist. Demnach bedarf diese Methode weiterer Verbesserungen, indem mindestens ein weiterer Elutionsschritt ergänzt wird, um restliche Phospholipide zu eluieren.

Ein möglicher Grund für die Abweichungen der detektierten Lipide in den vier Fraktionen könnte in den unterschiedlichen Detektionsmethoden liegen. Bei

Schweisguth *et al.* wurden die Lipide mit TLC identifiziert und anschließend mittels Phosphat-Bestimmung, Cholin-Bestimmung, Detektion primärerer Amine und Glykolipid-Bestimmung mit verschiedenen Reagenzien quantifiziert. Da die Autoren ebenfalls eine Dualphasenextraktion mit Chloroform/Methanol durchgeführten, kann davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung der Extrakte nicht oder nur unwesentlich durch die Extraktionsmethode beeinflusst wurde.

Bevor Verbesserungen dieser Methode beschrieben werden, wird im Folgenden zunächst auf die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der GalCer näher eingegangen.

### 2.2.6 GalCer-Standard Analyse

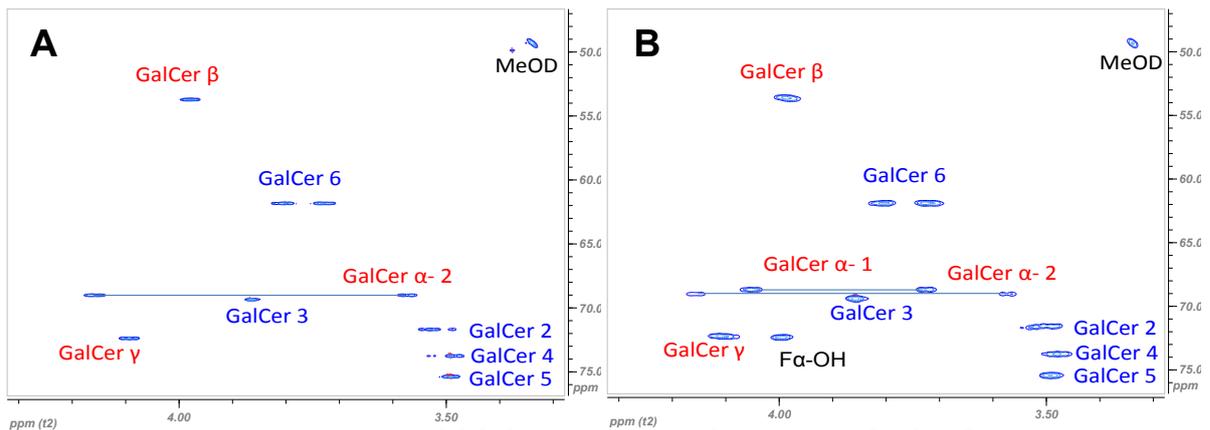
Zur Überprüfung der oben beschriebenen Ergebnisse wurde ein GalCer-Standard untersucht und mittels der SPE-Methode nach Schweisguth *et al.* aufgetrennt. Die in der Literatur angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen von GalCer beziehen sich auf das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid [Taki *et al.* 1992, Iida-Tanaka *et al.* 2000], so dass in dieser Arbeit die Verschiebungen für das verwendete Gemisch aus Chloroform/Methanol (2:1) bestimmt wurden. Auf diese Weise kann eine bessere Analyse der unbekannteren Cerebrosid-Struktur erfolgen.

Bei dem GalCer-Standard handelt es sich um ein Extrakt aus Rinderhirn. Laut Hersteller besteht dieses Gemisch aus zwei verschiedenen GalCer-Typen. Typ 1 enthält eine  $\alpha$ -Hydroxy-Fettsäure während bei Typ 2 die Fettsäure nicht hydroxyliert ist (Abb. 2-9).

Der Standard wurde sowohl mit 1D- als auch mit 2D-NMR-Experimenten untersucht. Ausschnitte des HSQC-Spektrums sind in Abbildung 2-9 dargestellt.

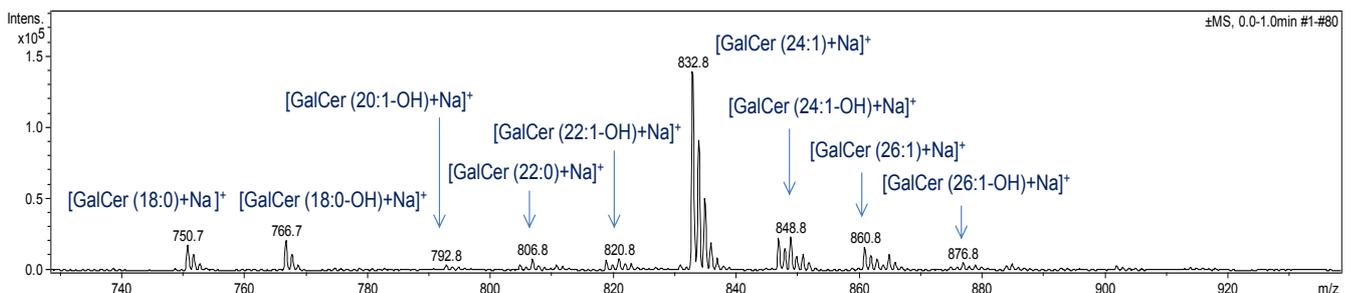


wobei Typ 2 jedoch geringer konzentriert war als Typ 1. In Abbildung 2-10 sind Ausschnitte der HSQC-Spektren beider Fraktionen dargestellt. In der ersten Fraktion (A) fehlten die Signale der  $\alpha$ -Hydroxy-Fettsäuren, so dass diese  $\alpha$ -Methylen-Signale dem GalCer Typ 2 zugeordnet werden konnten. Diese Auftrennung bestätigt somit die aus der Schweinehirn-Auftrennung erhaltenen Ergebnisse für die ersten beiden Fraktionen.



**Abb. 2-10: Ausschnitte aus den HSQC-Spektren des aufgetrennten GalCer-Standards.**  
**A: 1. Fraktion, B: 2. Fraktion.**

Des Weiteren wurde der GalCer-Standard auch mittels ESI-MS untersucht, um die NMR-spektroskopischen Ergebnisse über ein unabhängiges Verfahren abzusichern. Daneben bilden die zusätzlich gewonnenen Informationen über das Fragmentierungsverhalten die Grundlage für eine Identifizierung der unbekannt GalCer-Spezies aus der dritten Fraktion. Im positiven Ionenmodus wurden alle Spezies als  $[M+Na]^+$ -Quasi-Molekülonen detektiert (siehe Abbildung 2-11). Als Hauptkomponente wurde GalCer (24:1) nachgewiesen. In Tabelle 6 sind die jeweiligen Quasi-Molekülonen und ihre typischen Fragmente aufgeführt.



**Abb. 2-11: ESI-Massenspektrum des GalCer-Standards im positiven Ionenmodus.**



aufweist, ist es bei Typ 2 nicht vorhanden. Das  $[M-162]^-$ -Fragment (Neutralteilverlust von Galaktose- $H_2O$ ) hingegen ist bei beiden Typen mit gleicher Intensität zu beobachten.

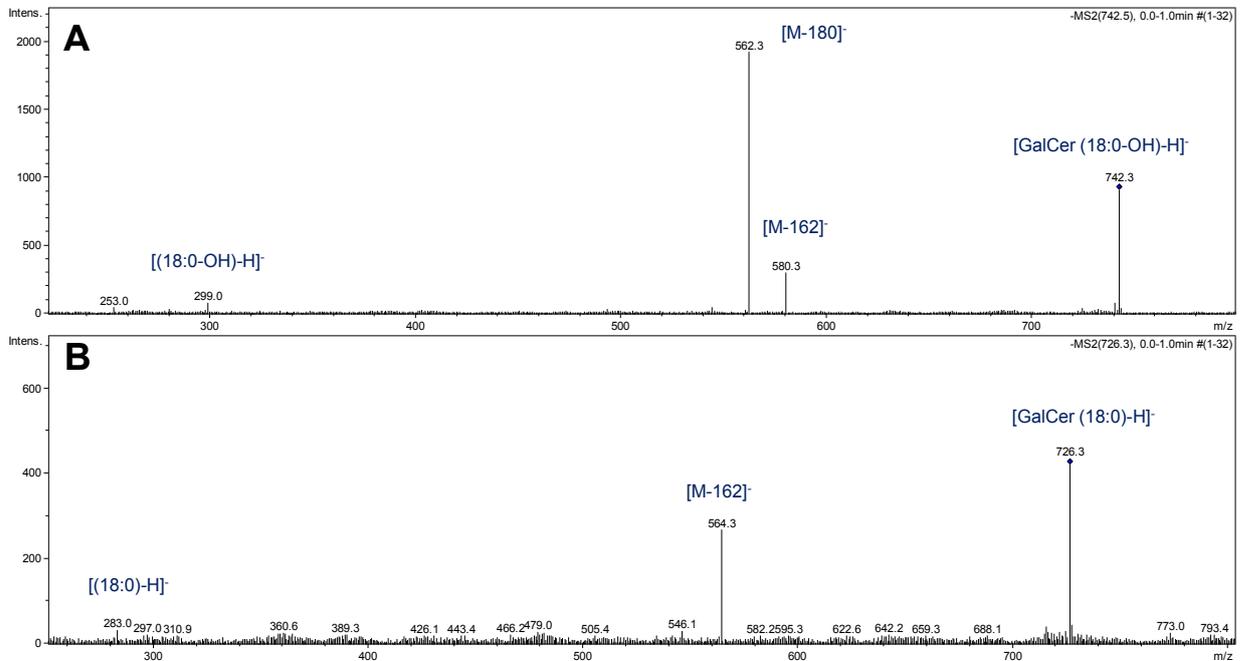


Abb. 2-13: ESI-MS/MS-Spektren von A: Typ 1, GalCer(18:0-OH) und B: Typ 2, GalCer(18:0) im negativen Ionenmodus.

### 2.2.7 Strukturaufklärung der Cerebrosid-Struktur in der 3. Fraktion

Zur Substanzidentifizierung der unbekanntes GalCer-Spezies, die zusammen mit PE-Komponenten in der dritten Fraktion eluierte, wurde diese Fraktion mittels ESI-MS untersucht. Dabei wurden neben PE-Spezies keine weiteren Komponenten identifiziert, so dass die unbekanntes Cerebrosid-Struktur isoliert wurde. Hierfür wurde diese mit einem Elutionsmittel aus 15 % Methanol in Chloroform über eine Silikagelkartusche von den PE-Komponenten abgetrennt und anschließend analysiert (ESI-MS und 1D/2D-NMR).

Erst durch die Untersuchung der reinen Cerebrosid-Fraktion mittels ESI-MS/MS konnten diese Spezies, die vorher aufgrund von Unterdrückungseffekten durch PE-Spezies nicht nachweisbar waren, analysiert werden. Die eindeutige Zuordnung erfolgte aufgrund der erhaltenen Fragmente im positiven Ionenmodus.

Die  $[M-H+2Na]^+$ -Quasi-Molekülonen (Abb. 2-14) wurden anhand der Neutralteilverluste von Natriumhydrogensulfat ( $M = 120$  u) und Schwefeltrioxid ( $M = 80$  u) als Sulfatide (S-GalCer) identifiziert. Diese Zuordnung wurde durch weitere Neutralteilverluste von Galaktose- $H_2O$  ( $M = 162$  u) und Galaktose- $2^*H_2O$  ( $M = 144$  u) bestätigt. Die erhaltenen Fragmentationen stimmten mit den genannten Neutralteilverlusten überein.

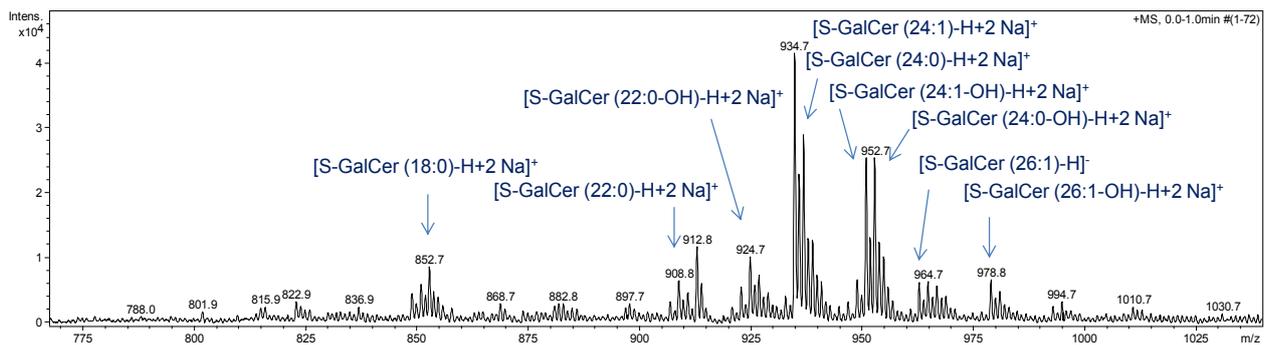
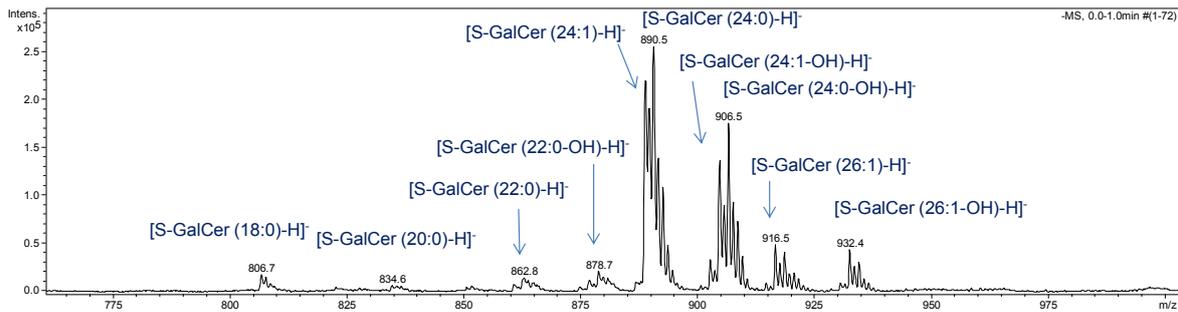


Abb. 2-14: ESI-Massenspektrum des Sulfatids im positiven Ionenmodus.

Eine Unterscheidung zwischen S-GalCer und S-GalCer-OH war im negativen Ionenmodus ( $[M-H]^-$ ) anhand der charakteristischen Fragmente  $m/z$  522,  $m/z$  540 und  $m/z$  568 möglich, die Hinweise auf hydroxylierte Komponenten geben (vgl. Hsu *et al.* 1998 und Marbois *et al.* 2000). Die variable Fettsäurekette wird dabei als Neutralteil abgespalten, so dass diese Fragmente unabhängig von der vorliegenden Einzelkomponente entstehen. Durch Wasserstoffumlagerung über einen 4-Ring entsteht  $m/z$  568. Nach einer Spaltung der  $\alpha$ -Bindung wird  $m/z$  540 gebildet. Nach weiterer Wasserabspaltung bleibt  $m/z$  522 zurück.



**Abb. 2-15: ESI-Massenspektrum der als Sulfatid identifizierten GalCer-Spezies im negativen Ionenmodus.**

Darüber hinaus zeigte sich, dass die S-GalCer im Schweinehirn eher langkettige Fettsäuren tragen. Die Kettenlänge der Fettsäure hängt mit dem Alter des Organismus zusammen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Myelinisierung und damit auch die Fettsäurekettenlänge (C22-C26) zu. Bei jüngeren Lebewesen hingegen ist S-GalCer (18:0) relativ hoch konzentriert (Marbois *et al.* 2000 und Isaac *et al.* 2006). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Hydroxylierung von S-GalCer und der Fluidität von Membranen. Bei Patienten mit multipler Sklerose wurden erhöhte Werte für hydroxylierte Sulfatide beobachtet (Marbois *et al.* 2000). Die stärkere Bildung von Wasserstoffbrücken mit anderen Molekülen schränkt hydroxylierte Fettsäuren in ihrer Mobilität ein und könnte dadurch eine Ursache für die Demyelinisierung sein.

Aus dem HSQC-Spektrum (Abb. 2-16 A) der reinen Cerebrosid-Fraktion geht hervor, dass aufgrund der Sulfatgruppe am C-3-Atom der Galaktose vor allem die C-3-, C-2- und C-4-Signale verschoben sind (vgl. Tab. 7). Dies gilt auch für die C-1- und C-5-Signale, wenn gleich in geringerem Ausmaß. Die Werte für die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Dabei weisen einige S-GalCer Hydroxy-Fettsäuren auf, die z. T. ebenfalls die chemische Verschiebung beeinflussen (siehe Kapitel 2.2.6). Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (vgl. Taki *et al.* 1992 und Iida-Tanaka *et al.* 2000).

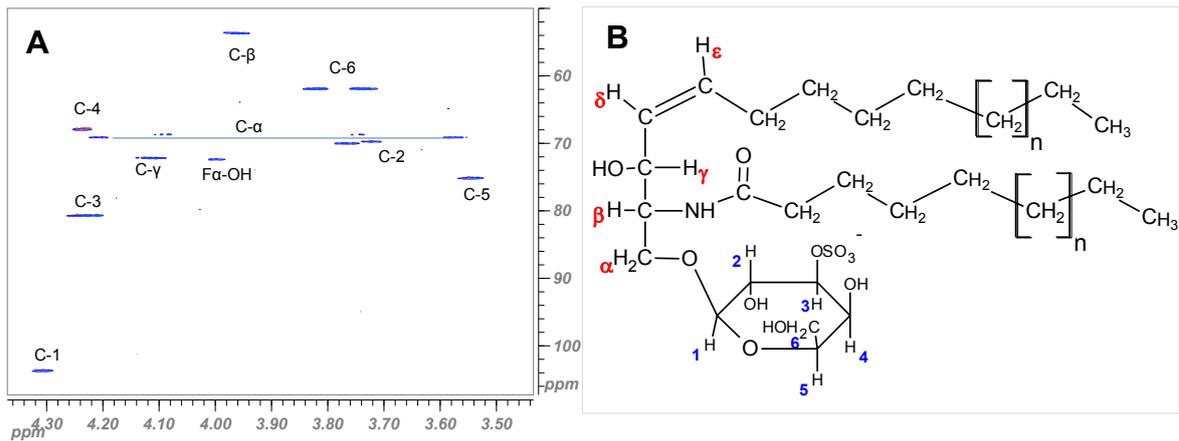


Abb.2-16: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum des Sulfatids (A) und dessen chemische Struktur (B).

Tabelle 7: Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale von Sulfatid

| Zuordnung | <sup>1</sup> H-Verschiebung [in ppm] | <sup>13</sup> C-Verschiebung [in ppm] |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| C-α       | 4,21/3,57                            | 69,16                                 |
| C-β       | 3,96                                 | 53,65                                 |
| C-γ       | 4,12                                 | 72,26                                 |
| C-δ       | 5,44                                 | 129,72                                |
| C-ε       | 5,68                                 | 134,69                                |
| C-1       | 4,31                                 | 103,81                                |
| C-2       | 3,73                                 | 69,80                                 |
| C-3       | 4,23                                 | 80,85                                 |
| C-4       | 4,24                                 | 67,93                                 |
| C-5       | 3,54                                 | 75,20                                 |
| C-6       | 3,82/3,74                            | 61,94                                 |
| F α-OH    | 4,00                                 | 72,42                                 |
| MUFA      | 5,33                                 | 130,30                                |

Nachdem das unbekannte Cerebrosid als S-GalCer identifiziert wurde, können nun Aussagen über das Elutionsverhalten getroffen werden. Aufgrund der deprotoniert vorliegenden Sulfatgruppe tragen die Sulfatide eine geladene Kopfgruppe und sind damit polarer als GalCer. Dadurch eluieren sie auch erst mit dem polareren Eluenten. Außerdem ist zu betonen, dass ohne eine NMR-spektroskopische Analyse diese Spezies nicht hätte nachgewiesen werden können. Im HSQC-Spektrum konnten diese Spezies auch neben PE identifiziert werden, während sie bei der ESI-MS Analyse durch Unterdrückungseffekte nicht

nachzuweisen waren. Erst durch die Isolierung der Spezies konnte auch eine massenspektrometrische Analyse erfolgen. Somit ermöglichte die Kombination aus NMR und MS mit vorheriger Trennung die Strukturidentifizierung des Cerebrosids. Dadurch wird die Relevanz von kombinierten Methoden in der Lipidanalytik deutlich.

### 2.2.8 Erweiterung der Methode nach Schweisguth

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Methode nach Schweisguth ebenfalls für die Trennung der neutralen Lipide geeignet ist. Darüber hinaus ermöglichte dieses Verfahren auch schon eine Trennung der GalCer von PE sowie die Trennung von GalCer und den strukturell sehr ähnlichen S-GalCer. Dennoch ist diese vielversprechende Methode noch unzureichend. Deshalb wird die Originalmethode zunächst um zwei Elutionsschritte erweitert, um alle Phospholipide zu erhalten. Anschließend werden die Eluenten jeder einzelnen Fraktion besser abgepasst (siehe Kapitel 2.2.9).

Durch die Erweiterung sollen die noch auf der Kartusche retardierten Phospholipide (restliches PC, SPH, PS, PI) mittels stärker polarerer Elutionsmittel, möglichst nach Phospholipidklassen fraktioniert, getrennt werden. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass SPH von einer Silikagelkartusche mit Methanol eluiert werden kann. Durch den Zusatz von 2 % Essigsäure zu Methanol wird die Elution der sauren Lipide PS und PI, welche noch polarer sind als SPH, erwartet.

Nach dem letzten Schritt der Schweisguth-Methode wurde daher mit Methanol eluiert (Fraktion 5), wobei restliches PC und das erwartete SPH erhalten wurden. In der nachfolgenden Fraktion (Fraktion 6: 2 % HOAc in MeOH) konnten NMR-spektroskopisch keine weiteren Lipide identifiziert werden. Demnach ist entweder die Elutionskraft des Eluenten unzureichend oder die Konzentration dieser Phospholipide zu gering für die Analysemethode. Deshalb wurde als weiterer Eluent ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/0,8 M NaAc (20:10:1,5) verwendet [Alvarez und Touchstone 1992], wobei die Elutionskraft durch den Zusatz von Natriumacetat (NaAc) gesteigert sein sollte. Die erhaltene Fraktion wurde aufgrund der sehr geringen Konzentration der sauren Phospholipide nur mittels ESI-MS untersucht, wobei lediglich eine PI-Einzelkomponente (PI (18:0/20:4)) nachgewiesen werden konnte (Abb. 2-17).

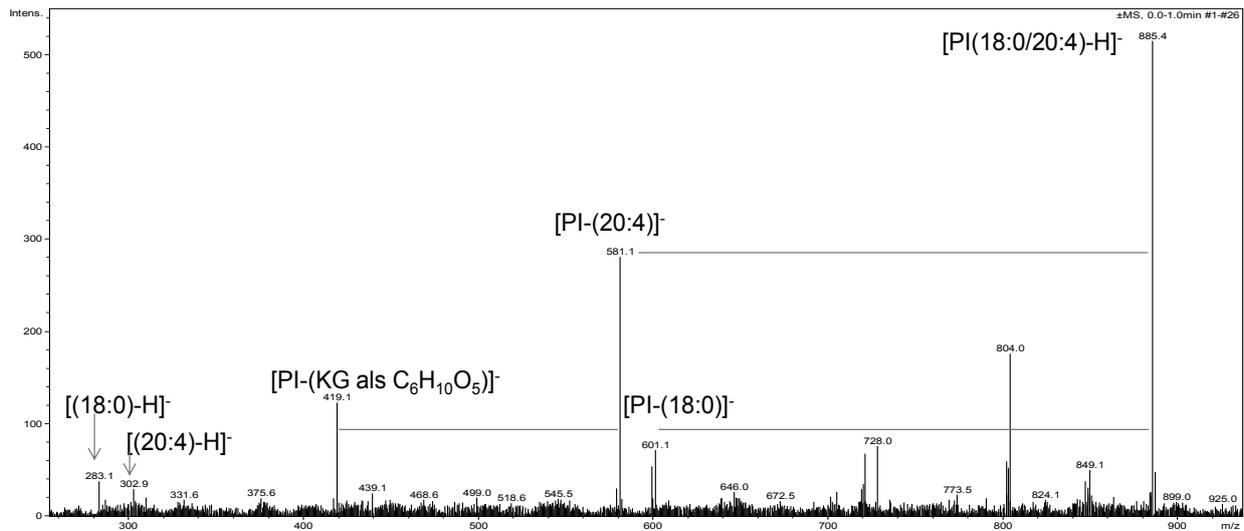


Abb. 2-17: MS/MS-Spektrum im negativen Ionenmodus des Quasi-Moleküliions  $m/z$  885.

Bezüglich des Fragmentierungsverhaltens von PI-Komponenten mittels ESI-MS ist bekannt, dass die Fettsäure, deren Fettsäureanion-Signal intensiver ist, als erstes abgespalten wird. Bei PI ist die Abspaltung der Fettsäure als Neutralteil an *sn*-2 bevorzugt. Dies liegt daran, dass sie der geladenen Phosphatgruppe benachbart ist. Somit kann anhand der relativen Signalintensitäten der Fragmente eine eindeutige Zuordnung der Stearinsäure (18:0) an *sn*-1 Position und der Arachidonsäure an *sn*-2 erfolgen. Zudem ist bekannt, dass die Abspaltung der freien Fettsäure gegenüber der Abspaltung als Keten bevorzugt ist [Willmann 2007]. Außerdem wird ein Sekundärfragment durch die Abspaltung der Kopfgruppe gebildet. Die Differenz von 162 u, ausgehend von  $m/z$  581, entspricht der Abspaltung der Inositolkopfgruppe- $H_2O$  ( $m/z$  419).

PI (18:0/20:4) ist nicht die einzige PI-Spezies, die im Schweinehirn vorkommt, aber es ist die häufigste Verbindung [Christie 1985]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die geringer konzentrierten Verbindungen unter der Nachweisgrenze lagen.

Da die Konzentration von PS im Hirn im Vergleich zu PI erhöht ist [Peterson und Cummings 2006], bleibt zu klären warum es nicht nachgewiesen wurde. Aus diesem Grund wurde die Auftrennung mittels eines Lipidextrakts dotiert mit PS (18:1/18:1) durchgeführt. Da PS weder im NMR-Experiment noch im ESI-MS nicht nachzuweisen war, musste es auf der Silikagelkartusche

zurückgeblieben sein. Es wurden deshalb zusätzlich mehrere Elutionsmittel getestet, um PS von der Kieselgelkartusche zu eluieren u.a. Chloroform/Methanol/Ameisensäure (10:20:1) [Palmer *et al.* 1981], MTBE/Methanol/Ammoniumacetat (25:4:1,8) [Hamilton *et al.* 1988] und Isopropanol/Salzsäure in Methanol (4:1) [Pietsch *et al.* 1993]. Auch in diesen Eluenten ließ sich jedoch kein PS nachweisen.

Somit wurden die Eluenten Methanol (5. Schritt) und Chloroform/Methanol/0,8 M NaAc (20:10:1,5) (6. Schritt) für die Erweiterung der SPE-Methode beibehalten.

### 2.2.9 Methodenoptimierung

Nachdem eine annähernde Trennung der Lipidklassen erreicht wurde, wurde die Methode schrittweise bis zur Trennung der Phospholipidklassen optimiert.

Der Methanol-Anteil im ersten Eluenten wurde von 5 % auf 4 % reduziert um die Elution von GalCer in dieser Fraktion zu verhindern. Der zweite Eluent (10 % Methanol in Chloroform) wurde beibehalten, da hier bereits ausschließlich GalCer eluierte. Anschließend wurde ein neuer Elutionsschritt mit 15 % Methanol in Chloroform (Fraktion 3) hinzugefügt, mit dem die S-GalCer abgetrennt werden sollten (siehe Abschnitt 2.2.7). Außerdem wurde im fünften Eluenten (40 % Methanol in Chloroform + 2 % Essigsäure) der Säureanteil auf 2 % verdoppelt, um eine höhere Konzentration an PC-Komponenten in dieser Fraktion zu erzielen. Die anderen SPE-Schritte (4. Fraktion: 30 % Methanol in Chloroform für die PE-Elution, 6. Fraktion: 100 % Methanol für die SPH-Elution) wurden zunächst nicht verändert.

In Abbildung 2-18 sind diese Optimierungsschritte (in Tab. 8 als Optimierung II bezeichnet) zusammenfassend dargestellt.

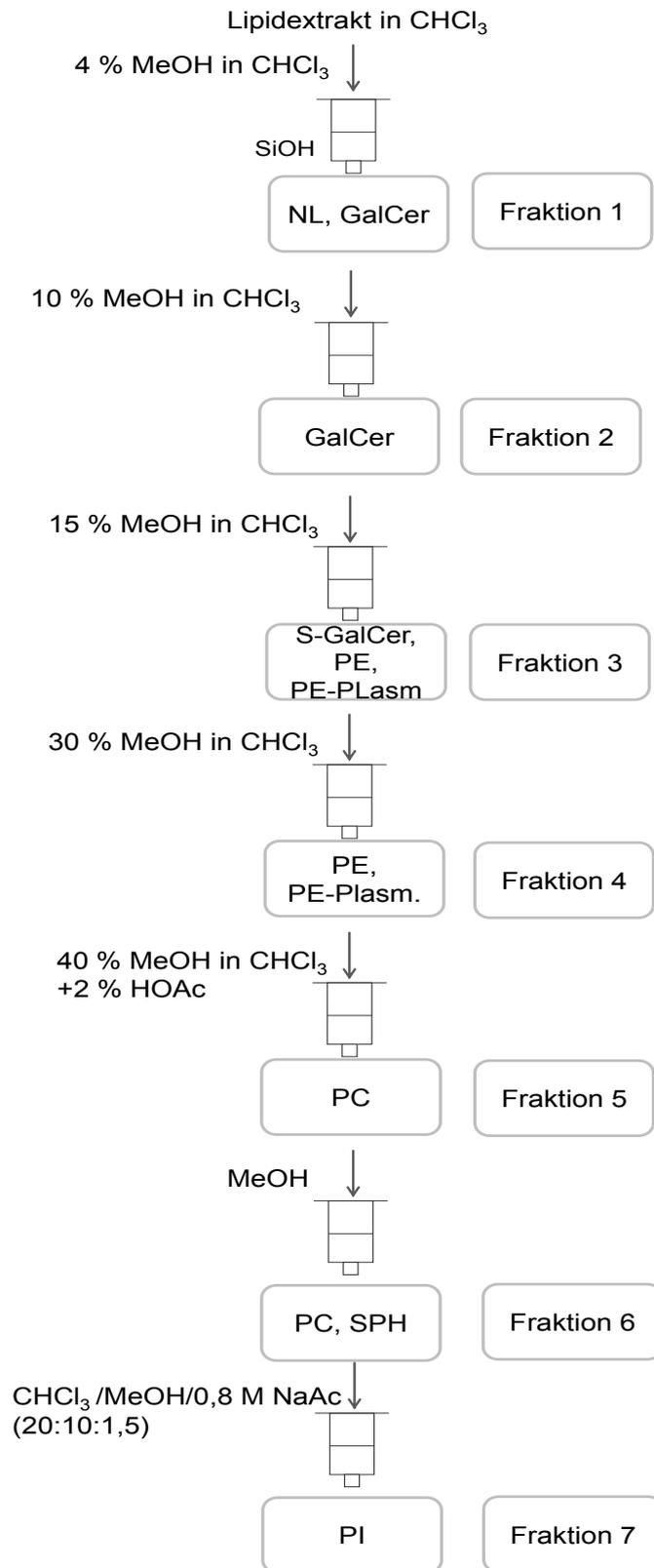


Abb. 2-18: Zweiter Optimierungsschritt der SPE-Methode (Optimierung II).

Die Ergebnisse zeigten, dass trotz der Verringerung des Methanol-Anteils im ersten Schritt weiterhin GalCer in geringer Konzentration (0,3 mmol/L) enthalten war. In der zweiten Fraktion wurden erneut ausschließlich GalCer nachgewiesen. Die dritte Fraktion enthielt neben S-GalCer auch bereits PE (1,6 mmol/L) und dessen Plasmalogen-Spezies (0,9 mmol/L). Dieses Elutionsverhalten, welches im Gegensatz zu dem Ergebnis aus Kapitel 2.2.7 verändert ist, kann durch die jeweils vorherigen Eluenten begründet werden. Ebenso beeinflussen auch die noch vorhandenen Phospholipide das Elutionsverhalten. Im nächsten Schritt muss demnach die Polarität des Eluenten weiter verringert werden. In der vierten Fraktion wurden ausschließlich PE- und seine Plasmalogen-Komponenten beobachtet. Durch die Erhöhung des Säureanteils in der fünften Fraktion stieg die PC-Konzentration von 1,7 mmol/L auf 2,3 mmol/L an und SPH eluierte noch nicht, so dass hier im nächsten Schritt der pH-Wert weiter erniedrigt werden kann. Für eine Optimierung der Methode wurden die Eluenten der ersten, dritten und fünften Fraktion jeweils in 1 %-Schritten verändert und die Ergebnisse verglichen. Die daraus resultierende optimierte Gesamtauftrennung der Lipide eines Lipidextrakts aus Schweinehirn ist im Folgenden dargestellt. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der jeweiligen Optimierungsschritte zusammengefasst, wobei zur besseren Übersicht nur eine Auswahl an Optimierungsschritten aufgeführt ist.

Mit einer Lösungsmittelzusammensetzung von 3 % Methanol in Chloroform wurde das Ziel erreicht, dass GalCer Typ 2 nicht mehr zusammen mit den neutralen Lipiden eluierte. Somit konnten beide GalCer-Typen in der zweiten Fraktion zusammen abgetrennt werden. Durch den zusätzlich eingeführten Eluenten (13 % Methanol in Chloroform) konnten die S-GalCer von den PE-Komponenten getrennt werden. Letztere eluierten zusammen mit PE-Plasmalogen-Spezies in der vierten Fraktion. Durch die schrittweise Erhöhung des Säureanteils auf 4 % des fünften Eluenten konnte ein Großteil des PC erhalten werden. Eine weitere Erhöhung der Essigsäure auf 5 % führte bereits zur Elution von SPH. Außerdem waren bereits Hydrolyse-Produkte nachzuweisen. Mit Methanol wurde restliches PC sowie SPH eluiert und in der letzten Fraktion wurde erneut PI (18:0/20:4) detektiert.

### Zusammenfassung und quantitativer Vergleich der Optimierungsschritte

In diesem Abschnitt wird die Methodenoptimierung der einzelnen Schritte zusammengefasst und quantitativ verglichen. Dazu wurden die Ergebnisse aus ausgewählten Optimierungsschritten in Tabelle 8 dargestellt. Einzelheiten zu den integrierten Bereichen und zur Quantifizierung sind dem Kapitel 5.8.3 zu entnehmen.

**Tabelle 8: Quantitativer Vergleich einzelner Optimierungsschritte**

| <b>Fraktion</b> | <b>Integriertes Signal</b> | <b>Methode nach Schweisguth<br/>Konz. [mmol/L]</b> | <b>Optimierung I<br/>Konz. [mmol/L]</b> | <b>Optimierung II<br/>Konz. [mmol/L]</b> | <b>Optimierung III<br/>Konz. [mmol/L]</b> |
|-----------------|----------------------------|--|---|--|---|
| <b>1</b>        | <b>Chol</b>                | 14,9   | 13,6                                    | 13,7                                     | 12,4                                      |
|                 | <b>GalCer</b>              | 1,1  | 0,1                                     | 0,3                                      | 0   |
|                 | MeOH-Anteil                | 5 %  | 4 %                                     | 4 %                                      | 3 %                                       |
| <b>2</b>        | <b>GalCer</b>              | 2,9  | 3,1                                     | 3,2                                      | 3,4                                       |
|                 | MeOH-Anteil                | 10 %   | 10 %                                    | 10 %                                     | 10 %                                      |
| <b>3</b>        | <b>S-GalCer</b>            | 1,2  | 0,9                                     | 0,75                                     | 0,8                                       |
|                 | <b>PE</b>                  | 6,1  | 4,9                                     | 1,6                                      | 0,1                                       |
|                 | <b>PE-Plasm</b>            | 3,7  | 3,0                                     | 0,9                                      | 0,2                                       |
|                 | MeOH-Anteil                | 30 %   | 20 %                                    | 15 %                                     | 13 %                                      |
| <b>4</b>        | <b>PE</b>                  |  | 0,3                                     | 4,4                                      | 5,9                                       |
|                 | <b>PE-Plasm</b>            |  | 0,4                                     | 3,0                                      | 4,1                                       |
|                 | MeOH-Anteil                |  | 30 %                                    | 30 %                                     | 30 %                                      |
| <b>5</b>        | <b>PC</b>                  | 1,9  | 1,7                                     | 2,3                                      | 3,7                                       |
|                 | MeOH-Anteil                | 40 % + 1 % HOAc                                    | 40 % + 1%HOAc                           | 40 % + 2 % HOAc                          | 40 % + 4 % HOAc                           |
| <b>6</b>        | <b>SPH</b>                 |  | 1,4                                     | 1,4                                      | 1,5                                       |
|                 | <b>PC</b>                  |  | 3,1                                     | 2,9                                      | 1,6                                       |
|                 | MeOH-Anteil                |  | 100 %                                   | 100 %                                    | 100 %                                     |

Beim Vergleich der einzelnen Optimierungsschritte bezüglich der jeweils ersten Fraktion wurde festgestellt, dass sich der GalCer Anteil von 1,1 mmol/L auf null reduzieren ließ. Dabei war auffällig, dass mit abnehmender Polarität auch die Konzentration des Cholesterols von 14,9 mmol/L auf 12,4 mmol/L zurückging. In den zweiten Fraktionen hingegen wurde parallel eine erwartete Konzentrationserhöhung für GalCer (Typ 1 und Typ 2) beobachtet. In der dritten Fraktion (S-GalCer) wurde durch die verminderte Polarität des Eluenten die

Elution von PE-Spezies stark reduziert. Während die Konzentration von Plasmalogenen nach der Originalmethode bei 3,7 mmol/L lag, war diese nach den Optimierungen auf 0,2 mmol/L gesunken. Vergleichbare Werte wurden auch für PE festgestellt, denn die Konzentration sank von 6,1 mmol/L auf 0,1 mmol/L. Bei der S-GalCer-Konzentration wurde ein Rückgang von 1,2 mmol/L auf 0,8 mmol/L mit der Verringerung der Polarität des Eluenten beobachtet (vgl. Fr. 1: Chol). Aus diesem Grund konnte der Methanolgehalt nicht kleiner als 13 % gewählt werden, um weitere Verluste der gering konzentrierten S-GalCer zu vermeiden. Parallel zu dem Konzentrationsverlust der PE-Spezies in der dritten Fraktion stieg die PE-Konzentration in der vierten Fraktion an. Hier wurde der Methanolanteil konstant bei 30 % gehalten und in der optimierten Gesamtaufreinigung wurden letztlich 4,1 mmol/L für PE-Plasmalogene und 5,9 mmol/L für PE-Spezies ausgemacht. In der fünften Fraktion wurde durch die Erhöhung der Säureanteils PC eluiert. Dazu wurde der Essigsäureanteil von 1 % auf 4 % gesteigert, so dass auch die PC-Konzentration von 1,9 mmol/L auf 3,7 mmol/L anstieg. Eine weitere Erhöhung des Säuregehalts wurde nicht umgesetzt, da aufgrund des niedrigen pH-Wertes eine Hydrolyse der Lipide nicht ausgeschlossen war. Außerdem erschwerten Acetat-Cluster die ESI-MS-Analyse erheblich. Somit wurden in dieser Fraktion etwa 70 % der PC-Spezies eluiert. Die nächste Fraktion, in welcher reines Methanol als Elutionsmittel eingesetzt wurde, enthielt eine relativ stabile SPH Konzentration mit Werten zwischen 1,4 mmol/L und 1,5 mmol/L. Für PC wurde ein stetiger Abfall der Konzentration von 3,1 mmol/L bis auf 1,6 mmol/L beobachtet. Somit eluierten etwa 27 % restliche PC in dieser Fraktion.

### 2.2.10 Methodenüberprüfung

Die Methodenüberprüfung ist ein wichtiges Instrument zur Qualitätssicherung. Einen wichtigen Teilaspekt stellt hierbei die Reproduzierbarkeit dar. Sie wurde für die entwickelte SPE-Methode anhand einer sechsfach-Bestimmung überprüft. Hierzu wurden jeweils 25 mg Lipidextrakt aus Schweinehirn an unterschiedlichen Tagen aufgetrennt. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse aufgeführt.

**Tabelle 9: Quantitative Auswertung der Varianz der Methode, n=6.**  
 Externer Standard: TSP-Kapillare,  $0,64 \pm 0,03$  mmol/L

|                  | 1                 | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 | 6                 | Mittelwert        | SD                | SD <sub>rel</sub> |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                  | Konz.<br>[mmol/L] | [%]               |
| <b>Chol</b>      | 12,0              | 11,0              | 12,0              | 13,5              | 13,5              | 11,0              | <b>12,2</b>       | 1,1               | 9,0               |
| <b>GalCer</b>    | 2,7               | 2,9               | 2,9               | 2,7               | 2,7               | 2,9               | <b>2,8</b>        | 0,1               | 3,6               |
| <b>Sulfatid</b>  | 0,8               | 0,6               | 0,5               | 0,7               | 0,8               | 0,9               | <b>0,7</b>        | 0,1               | 14,3              |
| <b>PE</b>        | 4,5               | 5,0               | 4,7               | 4,9               | 4,9               | 5,0               | <b>4,9</b>        | 0,2               | 4,1               |
| <b>PE-Plasm.</b> | 3,5               | 3,6               | 3,2               | 2,8               | 3,2               | 3,4               | <b>3,3</b>        | 0,3               | 9,1               |
| <b>PC</b>        | 2,9               | 2,9               | 2,1               | 3,1               | 3,4               | 3,3               | <b>3,0</b>        | 0,5               | 16,7              |
| <b>SPH</b>       | 1,0               | 1,1               | 1,5               | 0,9               | 1,0               | 1,0               | <b>1,1</b>        | 0,2               | 18,2              |

Zur Bestimmung der Streuung von Werten um den Mittelwert und damit der Messunsicherheit einer Methode wird die Standardabweichung angegeben. Als Streuungsmaß und damit als Präzisionsmaß wird die relative Standardabweichung ermittelt, die identisch ist mit dem Variationskoeffizient. Dieser ist der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert und sollte  $<1$  sein [Kromidas 2011]. Der ermittelte Variationskoeffizient liegt zwischen 0,04-0,2 und ist somit in einem annehmbaren Bereich. Zufällige Fehler konnten aufgrund der geringen Streuung der Analysenwerte auch ausgeschlossen werden. Die Bestimmung von systematischen Fehlern erfolgt mittels der Wiederfindungsrate. Dabei werden die Probenvorbereitung und die Analyseverfahren auf Verluste des Analyten überprüft. In Tabelle 10 sind die ermittelten Wiederfindungsraten aufgeführt.

**Tabelle 10: Wiederfindungsraten der verschiedenen Lipidklassen, n=3.**

| Lipidklasse | Wiederfindung [%] |
|-------------|-------------------|
| Chol        | $73 \pm 4$        |
| GalCer      | $82 \pm 8$        |
| PE          | $76 \pm 5$        |
| PC          | $96 \pm 12$       |
| SPH         | $86 \pm 5$        |

Mit der entwickelten SPE-Methode konnten reproduzierbare Ergebnisse mit guten Wiederfindungsraten zwischen 73-96 % erzielt werden. Für PC war die Streuung größer, da die Werte aus zwei Fraktionen (siehe Kapitel 2.2.9) berücksichtigt wurden. Die vergleichsweise höhere Wiederfindung für PC kann damit erklärt werden, dass der pH-Wert des Eluenten niedriger ist. Dadurch sind die Silanolgruppen im Kieselgel vollständig protoniert und ionische Wechselwirkungen werden unterbunden, so dass die Retardierung nur auf schwächeren van der Waals-Kräften beruht. Die Wiederfindung für saure Phospholipide konnte nicht bestimmt werden, weil diese Phospholipide keine auswertbare  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermöglichten. Die entscheidenden Kopfgruppensignale waren verbreitert und nicht hinreichend aufgelöst und ließen keine Zuordnung und Quantifizierung zu. Es ist anzunehmen, dass die amphiphatischen Lipide im lipophilen Lösungsmittel ( $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  2:1) inverse Micellen ausbilden, so dass die Kopfgruppen intramicellär partiell immobilisiert sind und anisotrope Wechselwirkungen nicht mehr gemittelt werden, was eine Signalverbreiterung zur Folge hat. Auch Walde *et al.* 1990 beschrieben die Bildung inverser Micellen der Phospholipide in apolaren Lösungsmitteln. In der Lipidanalytik wird aus Gründen der Vergleichbarkeit häufig Chloroform/Methanol als Standard-Lösungsmittelgemisch für  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren verwendet. Um solche Aggregationen zu verhindern und die Signalauflösung zu verbessern werden bestimmte Detergenzien wie z.B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zugegeben [Metz *et al.* 1996, Pearce *et al.* 2000]. Nach Zusatz von EDTA wurden zwar schmalere Signale beobachtet, jedoch war aufgrund der Zugaben anschließend keine Quantifizierung mehr möglich. Die Analyse mit  $^{31}\text{P-NMR}$  wurde ebenfalls durchgeführt (A-3). Die chemische Verschiebung in  $^{31}\text{P}$ -Spektren hängt jedoch von vielen Faktoren, wie Lipidzusammensetzung, Lösungsmittelzusammensetzung, pH-Wert, Gegenionen und Wassergehalt ab [Culeddu *et al.* 1998, Larijani *et al.* 2000].

Der Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die chemische Verschiebung konnte belegt werden (Anhang A-3). Auch hier konnte eine bessere Signalauflösung nach Zugabe von EDTA, welches jedoch die Signale verschob, festgestellt werden. Aufgrund dieser Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung in den  $^{31}\text{P}$ -Spektren wurde auf deren Verwendung verzichtet.

### 2.3 Anwendung der optimierten SPE-Methode auf Lipidextrakte anderer Gewebearten

SPE-Methoden sind im Allgemeinen nicht uneingeschränkt übertragbar, da die Lipidzusammensetzung verschiedener Gewebe variieren. Vielmehr ist eine Anpassung auf das Lipidprofil des Probenmaterials für eine erfolgreiche Trennung erforderlich. Um die Übertragbarkeit der entwickelten SPE-Methode zu testen, wurde sie mit Lipidextrakten aus Schweineleber, -niere und -herz durchgeführt. Die jeweiligen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren sind im Anhang (A-4) aufgeführt.

Die Abbildung 2-19 gibt einen Überblick über die prozentuale Lipidzusammensetzung der quantifizierten Lipide aus den verschiedenen Gewebearten. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt und miteinander verglichen.

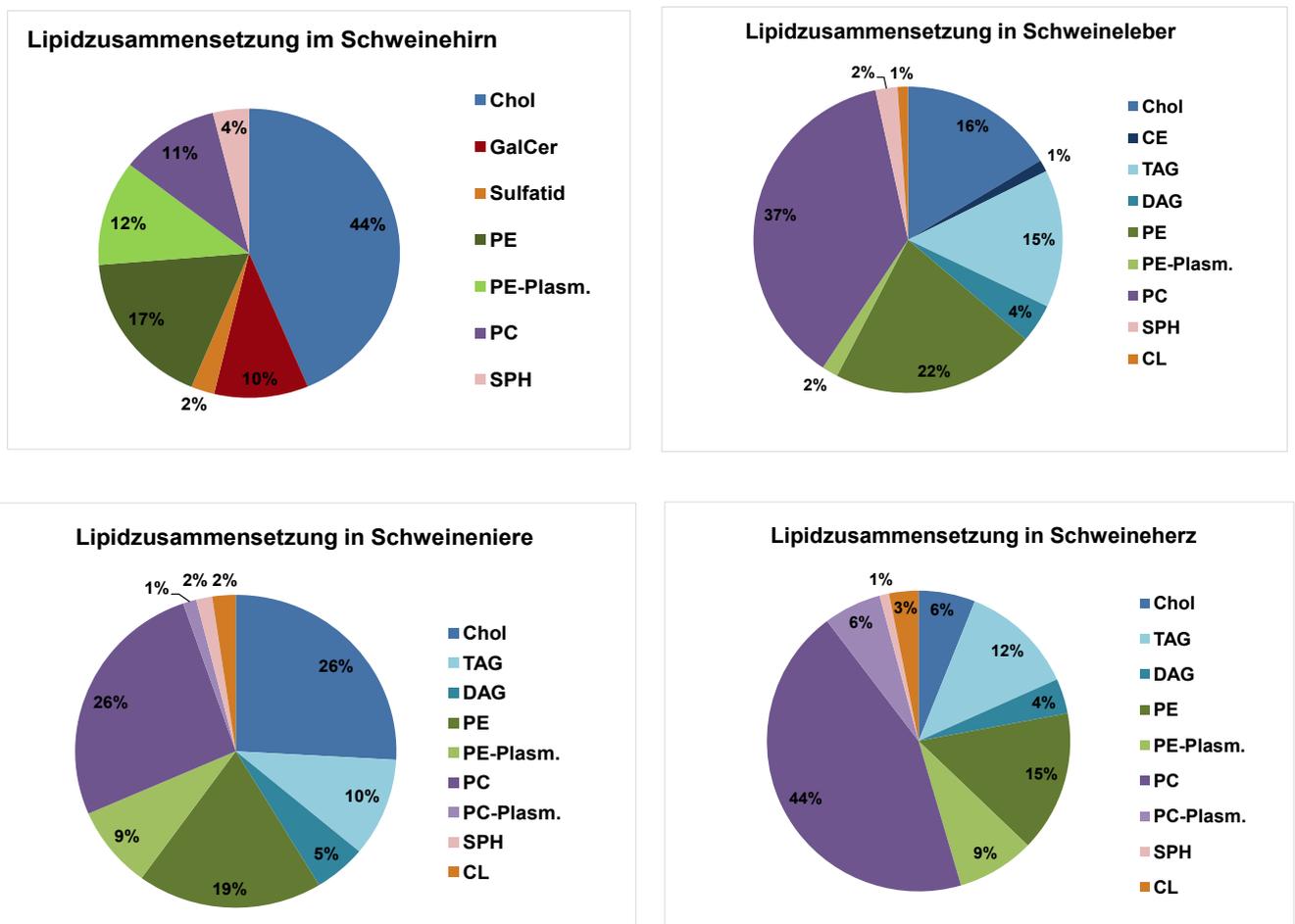


Abb. 2-19: Prozentuale Lipidzusammensetzung in Schweinehirn, -leber, -niere und -herz.

Im Schweinehirn stellt Chol die Hauptkomponente mit 44 % dar. PE und die PE-Plasm.-Komponenten machen gemeinsam 29 % aus, wobei die PE-Komponenten mit 17 % vertreten sind. Die Plasmalogen-Konzentration im Hirn ist altersabhängig. Sie steigt während der Entwicklungsphase der Myelinisierung und erreicht Maximalwerte bei etwa 30 Jahren. In zunehmendem Alter sinkt die Plasmalogen-Konzentration wieder ab [Nagan *et al.* 2001, Farooqui *et al.* 2001]. Der GalCer-Anteil im Schweinehirn liegt bei 10 %. SPH (4 %) und S-GalCer (2 %) sind nur gering konzentriert im Schweinehirn zu finden. Außerdem wurden in einer sehr kleinen Mengen TAG und DAG nachgewiesen (<0,5 %).

Anders als im neuronalen Gewebe stellt in der Schweineleber PC mit 37 % die Hauptkomponente dar. Auch die neutralen Lipide machen gemeinsam 36 % aus. Während der Anteil an Chol (16 %) und TAG (15 %) ähnlich sind, sind die geringer konzentrierten Lipide DAG (4 %) und CE (1 %) unterschiedlich verteilt. PE ist mit 22 % in der Schweineleber zu finden. Seine Plasmalogen-Komponente ist mit lediglich 2% im Vergleich zu 12 % im Hirn kaum vertreten. Die SPH-Konzentration ist jedoch vergleichbar zum Schweinehirn, die hier bei 2 % liegt. In geringer Menge sind auch Cardiolipine (CL) vorhanden, die etwa 1 % ausmachen. Diese eluieren in der zweiten Fraktion. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Patton *et al.* (1982), die Lipide aus der Rattenleber untersuchten.

Die Zusammensetzung der neutralen Lipide in der Schweineniere ist ähnlich wie die in der Schweineleber, wobei die Gesamtkonzentration hier mit 41 % geringfügig höher ist. Der Unterschied liegt darin, dass in der Niere weniger TAG (10 %) und mehr Chol (26 %) vorhanden ist. Der Anteil an DAG ist 5 %. Der PE-Anteil (19 %) ähnelt dem von Hirn und Leber. Der PE-Plasm.-Gehalt ist mit 9 % höher als in der Leber und somit vergleichbar mit dem im Hirn. Der PC-Anteil in der Schweineniere ist mit 26 % höher als im Hirn, jedoch geringer als in der Leber. In der Niere wurden zudem in geringer Menge PC-Plasmalogen-Spezies (1 %) detektiert, die weder im Hirn noch in der Leber beobachtet wurden. SPH und CL weisen beide einen 2 %-Anteil auf.

Im Schweineherzen wurden die Lipide Chol, TAG, DAG, CL, PE, PE-Plasm., PC, PC-Plasm. und SPH nachgewiesen. Bei der quantitativen Analyse (Tabelle 11) ist ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu den Lipidzusammensetzungen der anderen Organe festzustellen. Im Schweineherzen sind die neutralen Lipide mit

nur 22 % wesentlich geringer konzentriert. Der Chol-Anteil macht dabei mit 6 % nur etwa ein Drittel der neutralen Lipide aus. Die Anteile von TAG mit 12 % und von DAG mit 4 % sind vergleichbar mit Leber und Niere. Ebenso ähneln sowohl das Verhältnis von PE und PE-Plasm. (15 % zu 9 %) als auch ihre Gesamtkonzentration der Zusammensetzung in der Niere. Im Gegensatz dazu ist im Schweineherzen ein extrem hoher Anteil an PC vorhanden, welcher 50 % des Gesamtlipidextrakts ausmacht. 44 % davon sind PC-Komponenten und 6 % sind PC-Plasm.-Komponenten. Somit sind im Schweineherz insgesamt 15 % Plasmalogene vorhanden. CL sind mit 3 % und SPH mit 1 % vertreten.

In nachstehender Tabelle sind die ermittelten Konzentrationen der Lipidkomponenten aus den vier verschiedenen Gewebearten aufgeführt.

**Tabelle 11: Quantifizierung der Lipidkomponenten in Schweinehirn, -leber, -niere und -herz**

|                  | <b>Schweinehirn</b>   | <b>Schweineleber</b>  | <b>Schweineniere</b>  | <b>Schweineherz</b>   |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                  | <b>Konz. [mmol/L]</b> | <b>Konz. [mmol/L]</b> | <b>Konz. [mmol/L]</b> | <b>Konz. [mmol/L]</b> |
| <b>Chol</b>      | 12,2                  | 3,8                   | 8,4                   | 2,8                   |
| <b>CE</b>        | -                     | 0,3                   | -                     | -                     |
| <b>TAG</b>       | 0,2                   | 3,3                   | 3,3                   | 5,6                   |
| <b>DAG</b>       | 0,1                   | 0,9                   | 1,7                   | 1,7                   |
| <b>GalCer</b>    | 2,8                   | -                     | -                     | -                     |
| <b>S-GalCer</b>  | 0,7                   | -                     | -                     | -                     |
| <b>CL</b>        | -                     | 0,3                   | 0,8                   | 1,4                   |
| <b>PE</b>        | 4,9                   | 4,9                   | 6,1                   | 7,0                   |
| <b>PE-Plasm.</b> | 3,3                   | 0,4                   | 2,8                   | 3,8                   |
| <b>PC</b>        | 3,0                   | 8,6                   | 8,6                   | 20,3                  |
| <b>PC-Plasm</b>  | -                     | -                     | 0,4                   | 2,8                   |
| <b>SPH</b>       | 1,1                   | 0,5                   | 0,5                   | 0,5                   |

Die verschiedene Lipidverteilung der Organe spiegelt auch ihre unterschiedlichen Funktionen wieder. Auch membranabhängige Unterschiede sind bekannt, wobei je nach Kopfgruppe bzw. Aufgabe die Lipide entweder an der Innen- oder Außenseite vorkommen. CL und SPH sind z. B. wesentlich häufiger in Mitochondrien und Plasmamembranen als in anderen Zellkompartimenten zu

finden [Colbeau *et al.* 1971]. Die Aufgabe des CL ist die Erhaltung der Struktur von membrangebunden Proteinen (Cytochrom C), die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind [Morita *et al.* 2010]. Dies erklärt die im Vergleich höhere Konzentration im Herzen (1,4 mmol/L). Die Biosynthese der CL erfolgt in den Mitochondrien. CL ist neben Herz auch in Leber (0,3 mmol/L) und Niere (0,8 mmol/L) zu finden, während sie im Hirn nicht vorhanden sind. CE werden nur in der Leber (0,3 mmol/L) nachgewiesen, weil sie hier metabolisiert werden [Christie 1985]. Chol ist eines der Hauptbestandteile von Membranen und es erhöht die Stabilität, indem es die Membranfluidität vermindert. Die Biosynthese findet in der Leber, im Darm und im Gehirn statt. Das Herz weist einen sehr geringen Anteil an neutralen Lipiden auf. Es hat jedoch eine hohe Konzentration an PC (20,3 mmol/L), welches die Hauptkomponente biologischer Membranen darstellt. Plasmalogene haben eine besondere Rolle im Gehirn. Aufgrund ihres hohen Gehalts an Arachidonsäure (AA) und Docosahexaensäure (DHA) dienen sie als Reservoir für diese  $\omega$ -6-Fettsäuren und  $\omega$ -3-Fettsäuren [Braverman *et al.* 2012]. Obwohl die Plasmalogene in der Leber synthetisiert werden, ist deren Konzentration in Leber (0,4 mmol/L) relativ niedrig. Dies kann damit erklärt werden, dass sie unmittelbar nach ihrer Synthese durch Lipoproteine in andere Gewebe transportiert werden [Vance *et al.* 1990]. Auch Braverman *et al.* 2012 berichten, dass der Plasmalogen-Gehalt in der Leber sehr gering ist. PC-Plasm.-Komponenten kommen vor allem im Herzen, aber auch gering in der Niere vor [Christie 1985]. Als Antioxidantien bei oxidativem Stress nehmen die Plasmalogene besonders im Hirn und im Herzen eine weitere zentrale Rolle ein. Sie schützen die Zellen indem sie freie Radikale abfangen, wobei die Vinyl ether-Bindung angegriffen wird [Nagan *et al.* 2001].

### Zusammenfassung und Bewertung

Bei allen vier Lipidextrakten aus unterschiedlichen Geweben wurde exakt die gleiche Extraktion sowie SPE-Methode durchgeführt. Dadurch sind die Ergebnisse direkt miteinander vergleichbar. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diese SPE-Methode auch ohne weitere Anpassung auf die Lipidzusammensetzung der untersuchten Gewebe, übertragbar ist. Vor allem die Elution von CL, welches außer im Hirn in den anderen drei Geweben vorkommt,

wird ohne weitere Angleichung des Eluenten in der zweiten Fraktion eluiert. Lediglich eine sehr geringe Verschleppung von 7 % in die dritte Fraktion ist zu beobachten. Eine gemeinsame Elution mit GalCer und S-GalCer ist ausgeschlossen, denn weder Niere, Leber noch Herz enthalten GalCer oder S-GalCer. Somit beeinträchtigt CL nicht die Trennung. Auch die quantitative Analyse zeigt, dass die unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Lipide keinen Einfluss auf deren Trennung haben. Am Beispiel von PE- und PC-Komponenten wird dies sehr gut deutlich. Während der PE-Anteil im Hirn bei 8,2 mmol/L liegt, ist er im Herzen bei 10,8 mmol/L und dennoch ist keine Verschleppung der PE-Komponenten in die folgende PC-Fraktion zu beobachten. Insofern bedarf es bei den untersuchten Gewebeextrakten keiner Anpassung der Eluentenvolumina.

## 2.4 Anwendung der optimierten SPE-Methode auf Lipidextrakte aus Körperflüssigkeiten

Um die Anwendbarkeit der optimierten SPE-Methode auch auf Lipidextrakte anderer Zusammensetzung zu prüfen, wurde ein Lipidextrakt eine Körperflüssigkeit aufgetrennt. Als Probenmaterial diente humanes, lyophilisiertes Blutplasma (0,25 g), wobei zur Aufkonzentrierung vier Proben gepoolt wurden. Körperflüssigkeiten, vor allem Blutplasma, sind im Gegensatz zu invasiv gewonnenen Gewebeproben leichter zugänglich. Aus diesem Grund ist die Blutplasma-Analyse von besonderer Bedeutung. Es gibt viele Studien, die einen Zusammenhang zwischen veränderten Lipidkonzentrationen im Blutplasma und Krankheiten wie Diabetes [Krauss 2004], Brustkrebs [Shah *et al.* 2008] und Alzheimer [Sato *et al.* 2012] zeigen. Große Aufmerksamkeit wird dabei dem Chol im Blutplasma geschenkt, weil es als Biomarker für diese Krankheiten diskutiert wird.

In Blutplasma wurden die neutralen Lipide Chol, CE, TAG und DAG nachgewiesen. Außerdem wurden die Phospholipide PE, PE-Plasm., PC, SPH und PI identifiziert. Die prozentuale Lipidzusammensetzung in Blutplasma ist in Abb. 2-20 dargestellt. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der erhaltenen Fraktionen aus der SPE sind im Anhang (A-4) abgebildet.

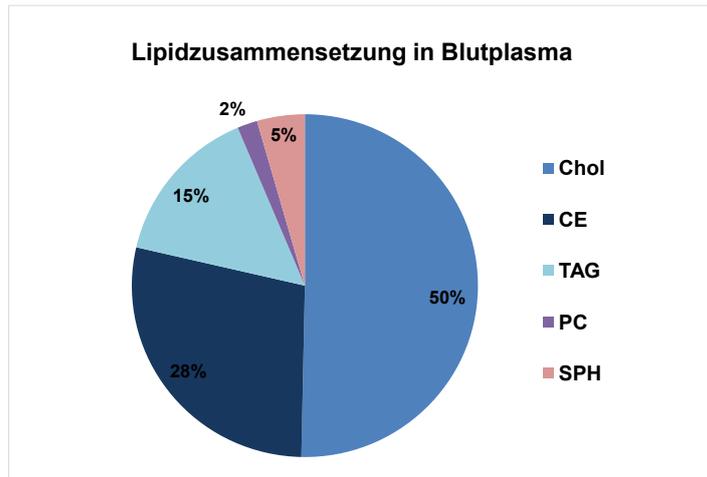


Abb. 2-20: Prozentuale Lipidzusammensetzung in Blutplasma.

Blutplasma besteht zu 90 % aus Wasser und 10 % aus gelösten oder suspendierten Stoffen, wie z.B. Proteine, Lipoproteine, Nährstoffe, Metabolite und Hormone [Nelson *et al.* 2005]. Deshalb unterscheidet sich das Blutplasma-Lipidextrakt deutlich von den Gewebe-Lipidextrakten, die aufgrund der Zellmembranen eine höhere Konzentration an Phospholipiden aufweisen.

Die Hauptkomponenten im Blutplasma stellen folglich die neutralen Lipide Chol (50 %), CE (28 %) und TAG (15 %) dar. Auch DAG wurde in sehr geringen Mengen nachgewiesen. SPH ist mit 5 % und PC mit lediglich 2 % vertreten. PE und PE-Plasm. sind nur in Spuren vorhanden.

Die hohe Konzentration an Chol und CE im Blutplasma ist darauf zurückzuführen, dass Chol im Körper in Form von Lipoproteinen transportiert wird. Für den Transport wird Chol durch das Enzym *Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase* acyliert. Das gebildete CE ist nicht mehr amphipatisch und kann im Kern der Lipoproteine transportiert werden [Nelson *et al.* 2005]. Auch das durch die Nahrung aufgenommene oder auch in der Leber synthetisierte TAG wird in Lipoproteinen an die Zielorgane befördert.

Die im Blutplasma detektierten Lipide stimmen mit bereits veröffentlichten Arbeiten überein [Cunnane *et al.* 1989, Suchoka *et al.* 2003, Schwalbe-Herrmann 2013].

## Zusammenfassung und Bewertung

Auch für die Auftrennung von Blutplasmalipidextrakten wurden mit der entwickelten Methode reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Trotz des relativ hohen Anteils der neutralen Lipide, Chol, CE und TAG ist keine Verschleppung zu beobachten. Vor allem CE, welches im Hirn nicht vorhanden ist und somit bei der SPE-Methodenentwicklung nicht mitberücksichtigt werden konnte, stört die Trennung nicht. Auch die Phospholipide PE, PC und SPH werden in den erwarteten Fraktionen beobachtet. Jedoch ist deren Konzentration so gering, dass für eine NMR-spektroskopische Analyse eine gepoolte Probe verwendet wurde. Dies wiederum hat den Nachteil, dass keine spezifische Bewertung der Lipidzusammensetzung einzelner Proben erfolgen kann. Mit der erreichten Trennung aus der SPE-Methode können jedoch die einzelnen Fraktionen mit einer empfindlicheren Analyseverfahren quantifiziert werden. Mit einer der SPE anschließenden HPLC-MS-Methode können gleichzeitig die Einzelkomponenten aufgetrennt sowie quantifiziert werden.

## 2.5 Trennung von Phospholipideinzelkomponenten mittels RP-HPLC

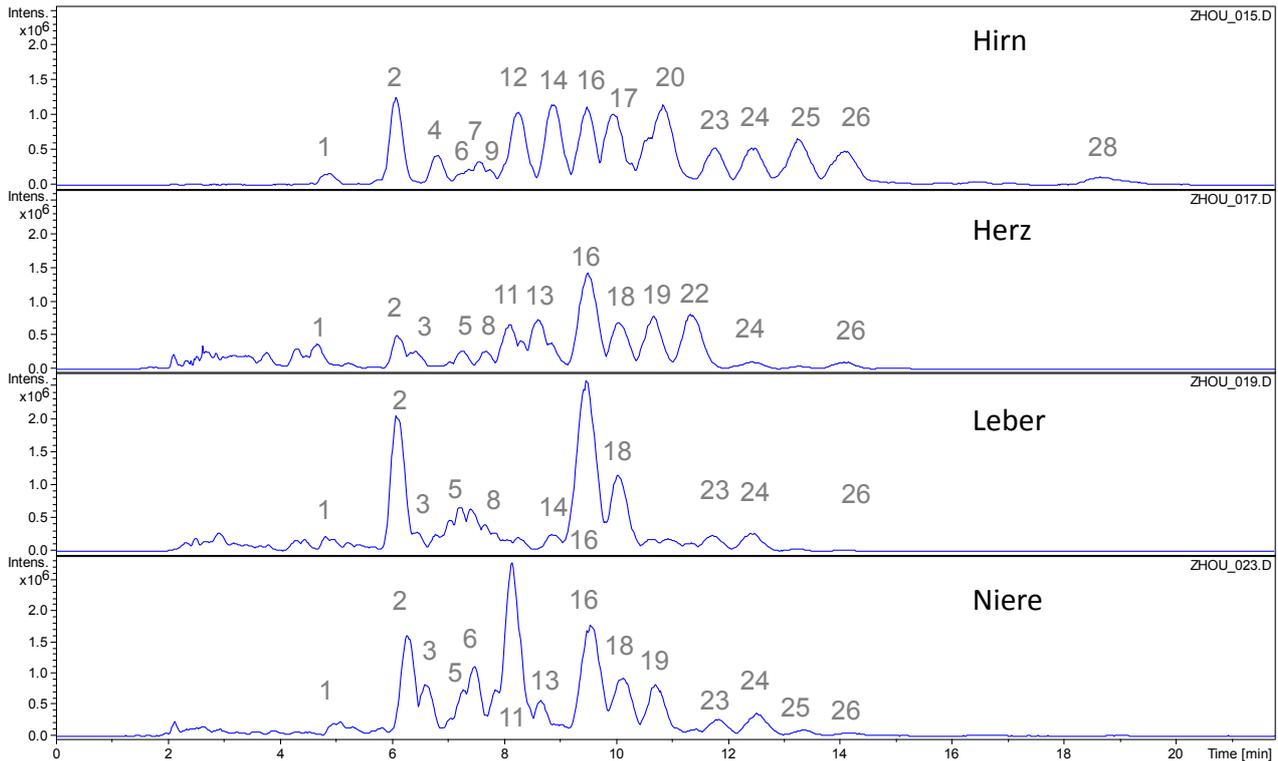
Nach der erfolgreichen kopfgruppenspezifischen Trennung der Phospholipidklassen mittels SPE wurde das Ziel verfolgt, mit einer geeigneten HPLC-Methode aus der Literatur die Trennung der Einzelkomponenten innerhalb einer Phospholipidklasse zu erreichen. Eine Übersicht passender Literaturmethoden ist bereits in Kapitel 1.4.2 (Tabelle 2) zusammenfassend dargestellt. Die Auswahl der Methode erfolgte in erster Linie nach Kriterien wie z.B. Eluent und Detektor. Eine möglichst einfache Lösungsmittelzusammensetzung, die mit ESI-MS kompatibel ist, war zunächst die einzige Anforderung an die Methode. Übereinstimmend mit diesem Kriterium wurde die RP-HPLC-Trennung nach Zhou *et al.* (2012) ausgewählt und durchgeführt. Abweichend von der Literatur, in der eine Nucleodur® C18 HTec Säule verwendet wurde, wurde hier eine Nucleodur® C18 Gravity verwendet. Beide Säulen bestehen aus einer hochreinen octadecyl-modifizierten Kieselgelphase mit hoher Dichte und Multi-Endcapping und haben damit vergleichbare Eigenschaften.

Aufgrund der gleichen Phospholipid-Kopfgruppe wird die Trennung der Phospholipideinzelkomponenten nur abhängig von der Länge und Sättigung der gebundenen Fettsäureketten sein, wobei die effektive Kohlenstoffzahl (ECN) eine Abschätzung der Elutionsreihenfolge ermöglicht. Die ECN berechnet sich aus der Anzahl der Kohlenstoffatome und der Doppelbindungen in den Fettsäureresten. Vereinfacht berechnet wird die Doppelbindungsanzahl mit zwei multipliziert und von der Kohlenstoffanzahl subtrahiert [Smith 1981, Podlaha 1982]. Da die Position der jeweiligen Fettsäure am Molekül-Rückgrat nicht für jede Einzelkomponente bestimmt wurde, wird im Folgenden die Summe der Kohlenstoffatome und der Doppelbindungen aufgeführt (z. B. PE 18:0/18:1 → PE 36:2).

### 2.5.1 HPLC-Trennung der PE-Einzelkomponenten

PE ist das zweithäufigste Phospholipid in biologischen Membranen und kommt somit in allen Geweben vor. Vor diesem Hintergrund eignet es sich besonders für eine Einzelkomponententrennung und ermöglicht einen Vergleich zwischen den untersuchten Organen.

Die RP-HPLC-Trennung wurde jeweils mit der PE-Fraktion der SPE aus Schweinehirn, -herz, -leber und -niere durchgeführt. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der PE-Zusammensetzung der verschiedenen Organe werden im Folgenden verglichen und diskutiert. In Abb. 2-21 sind die Basispeak-Chromatogramme der einzelnen HPLC-Trennungen dargestellt.



**Abb. 2-21: Basispeak-Chromatogramme der Auftrennung von PE-Spezies verschiedener Schweineorgane; TM 800, CS 50, Fluss 1mL/min, T 30°C, Inj. Volumen 10 µL, Detektion im negativen Ionenmodus. Peak-Nr. vgl. Tabelle 12.**

Ein Vergleich der vier Chromatogramme zeigt, dass im Hirn eine relativ hohe PE-Konzentration vorliegt, während es im Herzen geringer konzentriert ist. Insgesamt wurden jeweils 17 PE-Einzelkomponenten im Hirn und 16 Einzelkomponenten in der Leber bzw. jeweils 15 PE-Einzelkomponenten im Herzen und in der Niere identifiziert (siehe Tabelle 12). Bei den Komponenten handelt es sich um Diacyl(a)- bzw. Plasmalogen(p)-Spezies, die nach steigender ECN eluierten. Das Verhältnis zwischen beiden ist im Hirn fünf Diacyl- und 12 Plasmalogen-Komponenten, im Herzen fünf Diacyl- und zehn Plasmalogen-Komponenten, in der Leber elf Diacyl- und fünf Plasmalogen-Komponenten, in der Niere acht Diacyl- und sieben Plasmalogen-Komponenten (vgl. Tabelle 12). Sowohl im Hirn als auch im Herzen dominieren die Plasmalogene, während in der Niere der Anteil beider Komponenten ungefähr gleich ist. Auffällig ist die Verteilung in der Leber, denn hier sind überwiegend Diacyl-Komponenten vertreten.

Einige Komponenten sind möglicherweise charakteristisch für das jeweilige Gewebe, denn ausschließlich im Hirn wurden 38:6p, 40:7p, 40:6p und 36:2p ermittelt, wohingegen nur im Herzen 36:3p nachgewiesen werden konnte. Für die Leber und die Niere konnte keine kennzeichnende Komponente festgestellt werden. Im Gegensatz dazu gibt es auch PE-Komponenten, die in allen Organen vertreten sind. Diese sind 38:4a, 34:1p, 38:4p, 36:1a, 40:4p und 36:1p. Vor allem PE 18:0/20:4 (Peak-Nr. 16) ist eine dominierende Einzelkomponente in allen Geweben. Auch Hicks *et al.* (2006) fanden in verschiedenen Mäuseorganen diese Einzelkomponente am häufigsten vor.

In allen Chromatogrammen wurden auch PI-Spezies nachgewiesen (Peak-Nr. 1-3). Diese Koelution wurde in der NMR-spektroskopischen Analyse nicht nachgewiesen. Vermutlich lag deren Konzentration unter der Nachweisgrenze.

In den positiven ESI-Massenspektren war eine Besonderheit der Diacyl-Komponenten zu erkennen. Nur bei ihnen erfolgte eine Kopfgruppenabspaltung und es resultierte ein  $[M+H-141]^+$ -Fragmentation, welches für die Zuordnung hilfreich war. Bei den Plasmalogen-Komponenten entstand dieses Fragment nicht; das lässt vermuten, dass diese stabiler sind.

Aufgrund der fehlenden HPLC-MS-Studien von Schweineorganen in der Literatur werden an dieser Stelle die Ergebnisse mit Untersuchungen von entsprechenden Organen anderer Spezies verglichen. Kerwin *et al.* (1994) berichteten von über 50 PE-Einzelkomponenten in Rinderhirn, die sie mit ESI-MS detektierten. Hicks *et al.* (2006) untersuchten PE-Einzelkomponenten aus zehn verschiedenen Rattenorganen. Sie nutzten die Neutralverlust-Analyse (141 Da) um die PE-Einzelkomponenten zu identifizieren. In der Leber fanden sie 8, in der Niere 10, im Hirn 6 und im Herzen 7 Einzelkomponenten. Die Neutralverlust-Analyse von 141 Da eignet sich nicht für die Analyse von Plasmalogenen [Berry und Murphy 2004], sodass Hicks *et al.* diesbezüglich keine Aussagen machen konnten. Patton *et al.* (1982) trennten die PE-Einzelkomponenten aus Rattenleber und ermittelten folgende Hauptkomponenten: 16:0/22:6, 16:0/20:4, 18:1/18:2, 18:0/22:6, 18:0/20:4 und 18:0/18:2. Diese stimmen ebenfalls mit den hier identifizierten Hauptkomponenten in der Schweineleber überein. Brouwers *et*

*al.* (1999) analysierten die PE-Komponenten aus Rinderherz und wiesen 23 Einzelkomponenten (17 Plasmalogen- und 6 Diacylkomponenten) nach.

**Tabelle 12: Zusammenfassung der detektierten PE-Einzelkomponenten in verschiedenen Organen. Hauptkomponenten sind hervorgehoben.**

| Peak Nr. | Retentionszeit [min] | [M+H] <sup>+</sup><br>[M+H-141] <sup>+</sup> | [M-H] <sup>-</sup> | Zuordnung                | ECN      | Vorkommen in |        |        |        |
|----------|----------------------|--|--------------------|--------------------------|----------|--------------|--------|--------|--------|
|          |                      |  |                    |                          |          | Hirn         | Herz   | Leber  | Niere  |
| 1        | 4,9                  | 599, 625                                     | 857,<br>885        | PI (36:4)<br>PI (38:5)   | 28<br>28 | X            | X      | X      | X      |
| 2        | 6,0                  | 627  | 885                | PI (38:5)                | 28       | X            | X      | X      | X      |
| 3        | 6,5                  | 603, 740                                     | 861                | PI (36:2)                | 32       |              | X      | X      | X      |
| 4        | 6,8                  | 764<br>623                                   | 762                | PE (38:6)a               | 26       | X            |        | X      |        |
| 5        | 7,3                  | 740<br>599                                   | 738                | PE (36:4)a               | 28       |              | X      | X      | X      |
| 6        | 7,4                  | 766<br>625                                   | 764                | PE (38:5)a               | 28       |              |        | X      | X      |
| 7        | 7,5                  | 748  | 746                | PE (38:6)p               | 26       | X            |        |        |        |
| 8        | 7,6                  | 716<br>575                                   | 714                | PE (34:2)a               | 30       |              | X      | X      |        |
| 9        | 7,7                  | 774  | 772                | PE (40:7)p               | 26       | X            |        |        |        |
| 10       | 7,8                  | 742<br>601                                   | 740                | PE (36:3)a               | 30       |              |        | X      | X      |
| 11       | 8,1                  | 724  | 722                | PE (36:4)p               | 28       |              | X      |        | X      |
| 12       | 8,3                  | 750  | 748                | PE (38:5)p               | 28       | X            | X      |        |        |
| 13       | 8,6                  | 700  | 698                | PE (34:2)p               | 30       |              | X      |        | X      |
| 14       | 8,8                  | 792<br>651                                   | 790                | PE (40:6)a               | 28       | X            |        | X      |        |
| 15       | 8,9                  | 726  | 724                | PE (36:3)p               | 30       |              | X      |        |        |
| 16       | 9,5                  | 768<br>627                                   | 766                | PE (38:4)a               | 30       | X            | X      | X      | X      |
| 17       | 9,9                  | 776  | 774                | PE (40:6)p               | 28       | X            |        |        |        |
| 18       | 10,0                 | 744<br>603                                   | 742                | PE (36:2)a               | 32       |              | X      | X      | X      |
| 19       | 10,5                 | 702,<br>752                                  | 700,<br>750        | PE (34:1)p<br>PE (38:4)p | 32<br>30 | X<br>X       | X<br>X | X<br>X | X<br>X |
| 20       | 10,8                 | 728  | 726                | PE (36:2)p               | 32       | X            |        |        |        |
| 21       | 11,1                 | 770<br>629                                   | 768                | PE (38:3)a               | 32       |              |        | X      | X      |
| 22       | 11,3                 | 728  | 726                | PE (36:2)p               | 32       |              | X      | X      | X      |
| 23       | 11,7                 | 796<br>655                                   | 794                | PE (40:4)a               | 32       | X            |        | X      | X      |
| 24       | 12,4                 | 746<br>605                                   | 744                | PE (36:1)a               | 34       | X            | X      | X      | X      |
| 25       | 13,2                 | 780  | 778                | PE (40:4)p               | 32       | X            | X      | X      | X      |
| 26       | 14,0                 | 730  | 728                | PE (36:1)p               | 34       | X            | X      | X      | X      |
| 27       | 14,3                 | 756  | 754                | PE (38:2)p               | 34       | X            | X      |        |        |
| 28       | 18,6                 | 758,<br>784                                  | 756,<br>782        | PE (38:1)p<br>PE (40:2)p | 36<br>36 | X<br>X       |        |        |        |

## Zusammenfassung und Bewertung

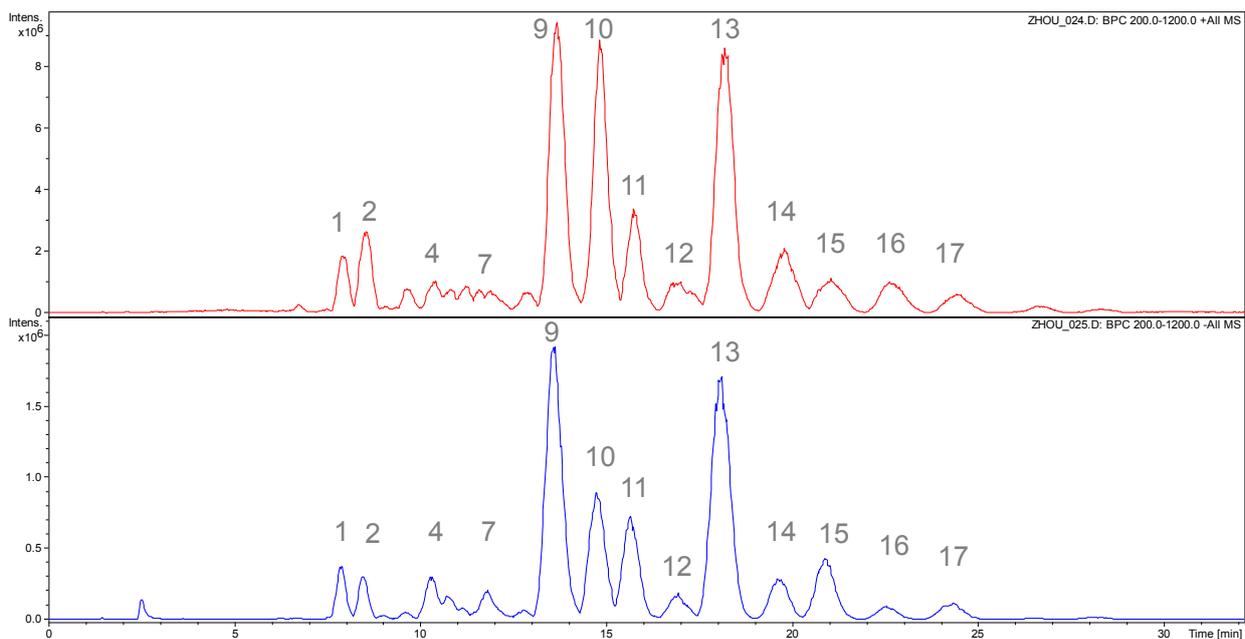
Zhou *et al.* (2012) analysierten mit dieser Methode die PE-Komponenten aus Soja, Eigelb, Ochsenleber und Krill-Öl. Zunächst entfernten sie die neutralen Lipide aus dem Gesamtlipidextrakt durch eine Festphasenextraktion mit Kieselgel. Anschließend trennten sie die PL-Klassen mit Hilfe einer semi-preparativen HPLC und konnten somit PE isolieren. Zur Analyse der Ergebnisse aus Schweineleber können die Ergebnisse aus Ochsenleber herangezogen werden. Beim Vergleich der Ergebnisse fällt auf, dass bei Zhou *et al.* die Komponenten später eluieren (10,6 min bis 26,7 min). Die etwas kürzeren Retentionszeiten in dieser Arbeit (6,8 min - 18,6 min) können mit der Verwendung Nucleodur® C18 Gravity Säule erklärt werden. Zudem war im Vergleich zu Zhou *et al.* eine bessere Peaksymmetrie sowie eine höhere Auflösung zu beobachten, wodurch eine bessere Basislinientrennung für komplexere Matrices erzielt wurde. Die hier verwendete Nucleodur® C18 Gravity ist somit der Nucleodur® C18 HTec vorzuziehen. Denn Zhou *et al.* erreichten eine Basislinientrennung nur bei Soja und Eigelb, die eine deutlich geringere Anzahl an PE-Komponenten enthielten.

Auffällig ist die Anwesenheit von PI in allen Chromatogrammen (Peak-Nr. 1-3). Dies weist darauf hin, dass diese Phospholipidklasse zusammen mit PE bereits in der PE-Fraktion der SPE eluierte (vgl. Kap. 2.2.9). Diese Koelution konnte bisher weder mittels NMR-spektroskopischer Analyse (aufgrund der geringen Konzentration) noch in der ESI-massenspektrometrischen Analyse (wahrscheinlich aufgrund von Unterdrückungseffekten) nachgewiesen werden.

Zhou *et al.* berichten von elf Komponenten in der Ochsenleber, wobei es sich dabei ausschließlich um Diacyl-Komponenten handelt. In der Schweineleber wurden hingegen 16 Komponenten identifiziert; fünf davon waren Plasmalogen-Komponenten. Als Hauptkomponenten beschrieben Zhou *et al.* PE 18:0/18:1, PE 18:0/18:2 und PE 18:0/20:4. Hauptkomponenten in der Schweineleber waren PE 38:4a, PE 36:2a und PE 36:4a. Die in dieser Arbeit ermittelte, für die Leber charakteristische Spezies 38:3a (18:0/20:3) wurde auch von Zhou *et al.* nur in der Ochsenleber detektiert und bestärkt somit die Annahme, dass es sich dabei um eine kennzeichnende Spezies der Leber handelt.

## 2.5.2 HPLC-Trennung der GalCer-Einzelkomponenten aus Schweinehirn

Nach der erfolgreichen Trennung der PE-Einzelkomponenten wurde die Methode auch mit der GalCer-Fraktion aus Schweinehirn durchgeführt. In Abbildung 2-22 sind die Basispeak-Chromatogramme im positiven und im negativen Ionenmodus gezeigt. Es ist jedoch eine Besonderheit im positiven Ionenmodus zu erkennen. Eine Wasserstoffanlagerung induziert eine gleichzeitige Wasserabspaltung, so dass ein  $[M+H]^+$  nicht entstehen kann. Bei den beobachteten Ionen handelt es sich um  $[M+H-H_2O]^+$ -Ionen. Im negativen Ionenmodus werden die GalCer als  $[M-H]^-$ -Ionen detektiert (siehe Tabelle 13). Als Hauptkomponenten wurden GalCer (22:0-OH), GalCer (24:1-OH), GalCer (24:0-OH) und GalCer (24:0) nachgewiesen. Diese Ergebnisse stimmen mit der Analyse des Rinderhirn-Standards überein (vgl. Kapitel 2.2.6).



**Abb. 2-22: Basispeak-Chromatogramm der Auftrennung von GalCer-Spezies aus Schweinehirn; TM 800, CS 50, Fluss 1mL/min, T 30°C, Inj. Volumen 10 µL, Detektion oben im positiven unten im negativen Ionenmodus.**

Han *et al.* (2005) untersuchten die GalCer-Spezies aus Rinderhirn und Rattenhirn mit ESI-MS. Als Hauptkomponenten identifizierten sie GalCer (24:1), GalCer (24:1-OH), GalCer (24:0) und GalCer (24:0-OH). Diese Ergebnisse stimmen somit mit denen aus dieser Arbeit überein. Ebenso sind die ermittelten geringer

konzentrierten Komponenten GalCer (26:0), GalCer (26:1), GalCer (23:0), GalCer (22:1) und GalCer (20:0) identisch. Die Hauptkomponenten in Rinderhirn, Rattenhirn und Schweinehirn stellen überwiegend Hydroxy-Komponenten dar. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stellten Hejazi *et al.* (2011) fest, dass im menschlichen Gehirn die Hauptkomponenten aus den nichthydroxylierten Komponenten GalCer (24:1), GalCer (24:0), GalCer (26:1), GalCer (25:1) und GalCer (18:0) bestehen. Im Vergleich zu den anderen Hydroxy-Komponenten kommt nur die GalCer (24:1-OH)-Komponente in höheren Konzentrationen vor. Maldonado *et al.* (2008) untersuchten im Mäusehirn das Enzym *fatty acid 2-hydroxylase (FA2H)* und stellten fest, dass der Anteil an GalCer-OH innerhalb der ersten beiden Lebensmonate von 5 % auf 60 % steigt. Dabei ermitteln sie auch einen Anstieg der Fettsäurekettenlänge während der Myelinisierung. Während bei Neugeborenen überwiegend C16-C20-Fettsäuren beobachtet werden, dominieren bei ausgewachsenen Mäusen eher die C22-C26-Fettsäuren. Außerdem berichten die Autoren, dass einfach ungesättigte Fettsäuren eine generell geringere Konzentration aufweisen als gesättigte Fettsäuren.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der detektierten GalCer-Einzelkomponenten in Schweinehirn.**  
 rot: Hauptkomponente, grün: Nebenkompente, blau: Spurenkomponente

| Peak Nr. | Retentionszeit [min] | [M+H-18] <sup>+</sup> | [M-H] <sup>-</sup>     | Zuordnung        | ECN |
|----------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------|-----|
| 1        | 7,9                  | 726                   | 742                    | GalCer (18:0-OH) | 18  |
| 2        | 8,5                  | 710                   | 726                    | GalCer (18:0)    | 18  |
| 3        | 9,6                  | 752                   | 728                    | *                |     |
| 4        | 10,3                 | 754                   | 770                    | GalCer (20:0-OH) | 20  |
|          |                      | 780                   | 796                    | GalCer (22:1-OH) | 20  |
| 5        | 10,8                 | 806                   | 822                    | *                |     |
| 6        | 11,2                 | 738                   | 754                    | GalCer (20:0)    | 20  |
|          |                      | 764                   | 780                    | GalCer (22:1)    | 20  |
| 7        | 11,9                 | 794                   | 810                    | *                |     |
| 8        | 12,8                 | 780, 818              | 794, 830               | *                |     |
| 9        | 13,6                 | 782                   | 798                    | GalCer (22:0-OH) | 22  |
|          |                      | 808                   | 824                    | GalCer (24:1-OH) | 22  |
| 10       | 14,8                 | 792                   | 808                    | GalCer (24:1)    | 22  |
| 11       | 15,7                 | 796                   | 812                    | *                |     |
| 12       | 16,8                 | 650, 780,<br>834, 808 | 784, 796,<br>810, 822, | *                |     |
| 13       | 18,1                 | 810                   | 826                    | GalCer (24:0-OH) | 24  |
| 14       | 19,7                 | 794                   | 810                    | GalCer (24:0)    | 24  |
| 15       | 21,0                 | 824                   | 840                    | *                |     |
| 16       | 22,6                 | 652, 814,<br>838      | 812, 848,<br>858       | *                |     |
| 17       | 24,4                 | 838                   | 854                    | GalCer (26:0-OH) | 26  |
| 18       | 26,7                 | 862                   | 838                    | GalCer (26:0)    | 26  |
| 19       | 28,1                 | 846, 880              | 856, 892               | *                |     |

\* Komponente nicht analysiert, da keine monoisotopische Isolierung möglich war.

### Zusammenfassung und Bewertung

Die GalCer-Einzelkomponenten wurden erfolgreich mit einer Basislinientrennung voneinander getrennt. Die erste Komponente eluierte bei 7,9 min, während der letzte Peak bei 28,1 min zu beobachten war. Die Elution erfolgte erwartungsgemäß nach steigender ECN. Mehrere Komponenten, von denen die meisten nur in geringer Konzentration vorlagen, konnten nicht eindeutig zugeordnet werden (Peak-Nr.: 3, 5, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 18, 19). Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Komponenten 3, 8, 16 und 19 um GalCer-Spezies handelte. Demnach muss auch bei dieser SPE-Fraktion eine Koelution einer hier unbekanntes Spezies erfolgt sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in dieser Arbeit verwendete RP-HPLC-Methode nach Zhou *et al.* sich sehr gut für die Trennung der Lipidspezies aus verschiedenen Matrices eignet. Sowohl bei den PE-Komponenten als auch bei den GalCer-Komponenten wurde eine Basislinientrennung erzielt. Durch die Komponententrennung wurden zusätzliche aufschlussreiche Informationen zu den vorliegenden Hauptkomponenten und Nebenkomponten sowie vorher nicht detektierten Komponenten (PI) gewonnen. Daraus lässt sich schließen, dass dieses Verfahren als eine Standardmethode für die Routine etabliert werden kann.

### 3 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Auftrennung von Lipidklassen sowie der Identifizierung von Einzelkomponenten innerhalb der Lipidklassen aus Gewebe sowie Bioflüssigkeit. Dazu wurden zunächst Lipidextrakte dreier Extraktionsverfahren (CMB-Extraktion, MTBE-Extraktion, Isopropanol-Extraktion) mit der NMR-Spektroskopie untersucht und miteinander verglichen. Mit der besten qualitativen und quantitativen Ausbeute stellte sich die CMB-Extraktion für eine Lipidextraktion aus Gewebe als geeignet heraus.

Ausgehend von zwei SPE-Literaturmethoden mit unterschiedlichen Festphasen (Kaluzny *et al.* 1985 / Aminopropylphase und Schweisguth *et al.* 1989 / Kieselgelphase) wurden an einem Lipidextrakt aus Schweinehirn SPE-Trennverfahren getestet und mit höherer Trenneffizienz weiterentwickelt. Zwar werden in der Literatur viele Methoden beschrieben, die basische oder saure Eluenten verwenden (vgl. Kapitel 1.4.1.1), um jedoch die Hydrolyse der Lipide zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit nur Methoden ausgewählt, die Eluenten mit physiologischem pH-Wert verwenden.

Bei der Verwendung der Aminopropylkartuschen lagen die Wiederfindungsraten für die Lipide Chol, TAG, PC und SPH zwischen 70 % bis 88 %, wobei die Wiederfindung für PE mit < 40 % sehr gering ausfiel. Für die Kieselgelphase wurden hingegen für alle genannten Lipide gute Wiederfindungen > 75% festgestellt. Aus diesem Grund wurde die SPE-Methodenentwicklung mit unmodifiziertem Kieselgel als stationäre Phase weiterentwickelt und verbessert.

Die Methodenentwicklung bestand aus mehreren Schritten, deren Effizienz NMR-spektroskopisch quantifiziert und verglichen wurde. Die hier entwickelte SPE-Methode zur Phospholipid-Klassentrennung ermöglicht die Trennung von NL, GalCer, S-GalCer, PE und PE-Plasm, sowie die ansatzweise Trennung von PC und SPH. Die entwickelte und optimierte Methode erwies sich als reproduzierbar und wies Wiederfindungsraten >73% auf. Die Elution der sauren Phospholipide bedarf noch weiterer Untersuchungen. An den aufgetrennten Fraktionen wurden zahlreiche 1D – und 2D-NMR-Experimente bei 14,1 T durchgeführt. Vor allem in den stark überlappenden Signalbereichen, wie z. B. im Methylenbereich, wurde eine bessere Signaltrennung bei den 2D-Experimenten erreicht.

Anschließend wurde die Anwendbarkeit der Methode auf Lipidextrakte anderen Gewebeerstammes (Schweineleber, -niere, -herz) untersucht. Dabei wurden zudem die Unterschiede der Lipidkomponenten der verschiedenen Organe im Zusammenhang zu ihren Funktionen analysiert und diskutiert. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass die CL, welche im Gehirngewebe nicht enthalten sind, in den anderen Geweben nachgewiesen und in der zweiten Fraktion abgetrennt wurden. Eine Koelution mit GalCer, die bei neuronalen Gewebeerstammes ebenfalls in der 2. Fraktion eluierten, wurde nicht beobachtet, da in den Lipidextrakten von Schweineleber, -niere und -herz kein GalCer enthalten ist im Gegensatz zum Gehirn.

Ferner wurde bei der SPE-Methodenentwicklung zunächst eine unbekannte Phospholipid-Komponente nachgewiesen, bei der es sich um ein GalCer-Derivat handelte. Zur Strukturaufklärung dieses Phospholipids wurde ein bekannter GalCer-Standard umfassend mit 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie sowie mit ESI-Massenspektrometrie untersucht, um die daraus gewonnenen Erkenntnisse zur Analyse der unbekannt Komponente einsetzen zu können. Dabei konnte die Komponente als S-GalCer identifiziert werden. Bisher ist keine SPE-Methode bekannt, die die GalCer und S-GalCer auftrennt.

Des Weiteren wurde die neu entwickelte SPE-Methode auf ein Lipidextrakt aus Blutplasma, stellvertretend für Bioflüssigkeiten, erfolgreich angewendet. Dies bestätigt das Potential der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur detaillierten Charakterisierung heterogener Lipidzusammensetzungen. Somit wurde eine schnelle, reproduzierbare und kostengünstige SPE-Methode zur Auftrennung der Phospholipidklassen entwickelt.

Schließlich wurden eine Einzelkomponententrennung mittels RP-HPLC-MS noch die Einzelkomponenten der PE-Fraktion aus den jeweils untersuchten Proben (Schweinehirn, -leber, -niere, -herz und Blutplasma) aufgetrennt. Es wurden insgesamt 25 PE-Komponenten in einer Laufzeit von 20 min (Elution 6,8 min – 18,6 min) basisliniengetrennt. Mit der gleichen Methode wurde auch die GalCer-Fraktion aus Schweinehirn behandelt. Die Auftrennung von 19 GalCer-Komponenten aus Schweinehirn wurde nach steigender ECN zwischen 7,9 min – 28,1 min erreicht.

Zusammenfassend wird deutlich, dass für eine erfolgreiche Lipidanalytik sinnvollerweise mehrere chromatographische und analytische Methoden kombiniert werden müssen. Zum einen ist ohne eine Trennung der Phospholipidklassen mittels SPE die NMR-Quantifizierung aufgrund von Signalüberlagerungen nicht möglich. Zum anderen ermöglicht ESI-MS die Analyse von geringer konzentrierten Komponenten. Am Beispiel von S-GalCer wird dieses deutlich. S-GalCer sind im Gemisch mit den PE-Komponenten wegen der Unterdrückungseffekte bei ESI-MS Detektion nicht zu ermitteln. Im NMR-Spektrum konnten sie jedoch neben den PE-Signalen nachgewiesen und auch quantifiziert werden. Außerdem ermöglicht die Massenspektrometrie eine Einzelkomponentenanalyse, bei der u. a. die Fettsäurepositionen im Glycerolrest bestimmt werden können.

## 4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte SPE-Methode zur Trennung von Phospholipidklassen kann für zukünftige Analysen weiter optimiert und ausgebaut werden. Vor allem ist eine detaillierte Untersuchung der sauren Phospholipide PA, PI und PS erstrebenswert, da diese eine zentrale Rolle in metabolischen Prozessen (z.B. in der Signaltransduktion) einnehmen. Hierbei bedarf es zunächst weiterer NMR-spektroskopischer Untersuchungen, denn durch die Signalverbreiterung im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aufgrund von Clusterbildung verhindert eine Quantifizierung. Andererseits kann eine Quantifizierung bei Verwendung von isotopenmarkierten internen Standards auch über die Massenspektrometrie erfolgen. Die Problematik hierbei ist jedoch, dass es keine definierte Beziehung zwischen der Intensität eines Ionensignals und der Konzentration des Analyten gibt. Die Signalintensität der Lipidkomponenten hängt von Faktoren wie z.B. Lipidgesamtkonzentration, Lösungsmittelzusammensetzung, instrumentelle Parameter, Kettenlänge der Fettsäuren und der polaren Kopfgruppen bei Phospholipiden ab [Koivusalo 2001]. Daher besteht noch weiterer Forschungsbedarf um eine präzise, schnelle, kostengünstige und zuverlässige Quantifizierung mittels Massenspektrometrie zu gewährleisten.

Die hier entwickelte SPE-Methode ist sowohl unabhängig von der Lipidzusammensetzung als auch von der Konzentration einzelner Komponenten. Dadurch ist sie sehr vielversprechend und kann nach weiteren Untersuchungen standardmäßig in die Routineanalytik eingeführt werden.

Vor allem die Entwicklung von schnellen, zuverlässigen und nichtinvasiven Methoden für die Untersuchung von Lipiden ist erstrebenswert. Hier kann die Analyse der Lipide im Blutplasma zukünftig einen wertvollen Ansatz zur Diagnose, Überwachung und Therapie von Krankheiten darstellen. Voraussetzung hierfür ist die Ermittlung von Biomarkern, die durch eine Studie mit pathologisch veränderten Proben aufgeklärt werden können. In diesem Zusammenhang kann der umfangreiche Informationsgehalt der Spektren durch den Einsatz von Mustererkennungsverfahren einfacher analysiert und verglichen werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 CMB-Gewebeextraktion

#### 5.1.1 Geräte

|                  |                     |                     |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Analysenwaage    | <i>AE 200</i>       | Mettler, Giessen    |
| Lyophilisator    | Beta I              | Christ, Osterode    |
| pH-Meter         | digital pH-Meter    | Knick, Berlin       |
| Potter           | <i>Potter S</i>     | B.Braun, Melsungen  |
| Vortex Schüttler | <i>Reax top</i>     | Heidolph, Schwabach |
| Waage            | <i>L310</i>         | Satorius, Göttingen |
| Zentrifuge       | <i>Univeral 16R</i> | Hettich, Tuttlingen |

#### 5.1.2 Chemikalien

|            |                  |                        |
|------------|------------------|------------------------|
| Chloroform | AnalaR Normarpur | VWR, Darmstadt         |
| Methanol   | LC-MS Chromasolv | Fluka, Buchs (Schweiz) |

Bidestilliertes Wasser wurde der hauseigenen Anlage entnommen.

#### 5.1.3 Durchführung

1 g tiefgefrorenes Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in einen mit Eis gekühlten Potter überführt. 3 mL gekühltes Methanol wurden hinzu gegeben und mit 20 Hüben homogenisiert. Dieser Vorgang wurde mit 3 mL gekühltem Chloroform wiederholt. Nach der Zugabe von 3 mL gekühltem bidestilliertem Wasser wurde erneut mit 20 Hüben gepottert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit je 800 µL Methanol und Chloroform wurde nachgespült. Das Extrakt wurde nochmals intensiv mit einem Vortex-Schüttler durchmischt und anschließend 40 min (20 min) bei +4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Es bildeten sich 3 Phasen: Oben eine wässrig/methanolische Phase, in der Mitte die nichtlöslichen Gewebestandteile und ausgefallenen Proteine (Pellet) und unten die Chloroformphase mit den Lipiden. Die Phasen wurden getrennt und das Pellet wurde nochmals mit je 2 mL Chloroform/Methanol extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und anschließend zweimal mit 1 ml bidestilliertem Wasser extrahiert. Es wurde jeweils 20 min bei +4°C zentrifugiert. Danach wurde die organische Phase im N<sub>2</sub>-Strom eingedampft. Die wässrige Phase und das Pellet wurden verworfen. Die extrahierten Lipide wurden in

600  $\mu\text{L}$  Chloroform aufgenommen und 50  $\mu\text{L}$  davon wurden eingedampft und mit 600  $\mu\text{L}$   $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (2:1) NMR-spektroskopisch analysiert.

## 5.2 Isopropanol-Gewebeextraktion

### 5.2.1 Geräte

Siehe Abschnitt 5.1.1

### 5.2.2 Chemikalien

|             |                  |                 |
|-------------|------------------|-----------------|
| Chloroform  | AnalaR Normarpur | VWR, Darmstadt  |
| Isopropanol | LC-MS Chromasolv | Roth, Karlsruhe |

### 5.2.3 Durchführung

1 g tiefgefrorenes Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in einen mit Eis gekühlten Potter überführt. 3 mL gekühltes Isopropanol wurden hinzu gegeben und mit 20 Hüben homogenisiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal mit 3 mL gekühltem Isopropanol wiederholt und erneut mit je 20 Hüben gepottert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 800  $\mu\text{L}$  Isopropanol wurde nachgespült. Das Extrakt wurde nochmals intensiv mit einem Vortex-Schüttler durchmischt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur equilibriert und dann 5 min bei  $+4^\circ\text{C}$  und 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Lipidphase vorsichtig abpipettiert, so dass das Pellet am Boden zurückblieb. Das Pellet wurde nochmals mit 2 mL Isopropanol extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im  $\text{N}_2$ -Strom eingedampft. Das Pellet wurden verworfen. Die extrahierten Lipide wurden in 600  $\mu\text{L}$  Chloroform aufgenommen und 50  $\mu\text{L}$  davon wurden eingedampft und mit 600  $\mu\text{L}$   $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (2:1) NMR-spektroskopisch analysiert.

## 5.3 MTBE-Gewebeextraktion

### 5.3.1 Geräte

Siehe Abschnitt 5.1.1

### 5.3.2 Chemikalien

|                            |                  |                        |
|----------------------------|------------------|------------------------|
| Methyl-tertiär-buthylether | p.a. (GC)        | Sigma Aldrich, München |
| Chloroform                 | AnalaR Normarpur | VWR, Darmstadt         |
| Methanol                   | LC-MS Chromasolv | Fluka, Buchs (Schweiz) |

Bidestilliertes Wasser wurde der hauseigenen Anlage entnommen.

### 5.3.3 Durchführung

1 g tiefgefrorenes Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in einen mit Eis gekühlten Potter überführt. 5 mL gekühltes MTBE wurden hinzu gegeben und mit 20 Hüben homogenisiert. Dieser Vorgang wurde mit 2 mL gekühltem Methanol wiederholt. Nach der Zugabe von 1,5 mL gekühltem bidestilliertem Wasser wurde erneut mit 20 Hüben gepottert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit je 800  $\mu$ L Methanol und MTBE wurde nachgespült. Das Extrakt wurde nochmals intensiv mit einem Vortex-Schüttler durchmischt und anschließend 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 10 min bei +4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Es bildeten sich 3 Phasen: Oben die Lipidphase, in der Mitte die wässrig/methanolische Phase und unten das Pellet. Die Phasen wurden vorsichtig getrennt und das Pellet wurde nochmals mit je 1 mL MTBE/Methanol extrahiert. Danach wurde die organische Phase im N<sub>2</sub>-Strom eingedampft. Die wässrige Phase und das Pellet wurden verworfen. Die extrahierten Lipide wurden in 600  $\mu$ L Chloroform aufgenommen und 50  $\mu$ L davon wurden eingedampft und mit 600  $\mu$ L CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1) NMR-spektroskopisch analysiert.

## 5.4 SPE-Methode nach Kaluzny

### 5.4.1 Material

SPE-Kartusche: Chromabond<sup>®</sup>, NH<sub>2</sub>, 6 mL/1000 mg, Macherey-Nagel, Düren

Chromabond<sup>®</sup>, SiOH, 6mL/500mg, Macherey-Nagel, Düren  
(selbstgepackt)

### 5.4.2 Chemikalien

|               |                      |                        |
|---------------|----------------------|------------------------|
| n-Hexan       | Rotisolv, HPLC grade | VWR, Darmstadt         |
| Chloroform    | AnalaR Normarpur     | VWR, Darmstadt         |
| Methanol      | LC-MS Chromasolv     | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| 2-Propanol    | LC-MS Chromasolv     | Riedel-de-Haën, Seelze |
| Diethylether  | p.a.                 | Riedel-de-Haën, Seelze |
| Dichlormethan | Rotisolv, HPLC       | Roth, Karlsruhe        |
| Essigsäure    | p.a. konz.           | Sigma-Aldrich, München |
| Ethylacetat   | p.a.                 | Lab Scan               |

### 5.4.3 Durchführung

Bei der Festphasen-Extraktion nach der Methode von M. A. Kaluzny et al. (1985) wurde eine Aminopropyl-Festphasen-Kartusche (1000 mg) mit 12 mL Hexan konditioniert und die in Chloroform gelösten Lipide wurden aufgetragen. Anschließend wurde mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen fraktionierend eluiert. Im ersten Elutionsschritt wurden die neutralen Lipide mit 10 mL Chloroform/2-Propanol (2:1) von den freien FA und den PL getrennt. Die Fraktion wurde im N<sub>2</sub>-Strom eingedampft und in 0,5 mL Hexan aufgenommen (1. Fraktion). Mit 8 mL Diethylether, welcher 2% Essigsäure enthielt, wurden die freien Fettsäuren eluiert und danach mit 8 mL Methanol die Phospholipide. Die 1. Fraktion wurde wiederum auf eine neue Aminopropyl-Kartusche aufgetragen, die ebenfalls zuvor mit 12 mL Hexan konditioniert wurde. Anschließend wurden die Cholesterolester mit 8 mL Hexan von der Säule eluiert. Daraufhin wurde eine dritte vorkonditionierte Kartusche unter die zweite gesteckt und mit 16 mL eines Lösungsmittelgemisches aus 1% Diethylether und 10% Dichlormethan in Hexan sollten die Triacylglycerole abgetrennt werden. Die zusammengesteckten Kartuschen wurden anschließend getrennt und mit insgesamt 40 mL Hexan - versetzt mit 5% Ethylacetat - wurde

Cholesterol herausgelöst. Für die weiteren Elutionsschritte wurde nur die obere Kartusche weiterverwendet. Mit 8 mL Hexan, welches 15% Ethylacetat enthielt, wurden die Diacylglycerole von den Monoacylglycerolen getrennt. Als letzte Fraktion wurden die Monoacylglycerole mit 8 mL Chloroform/Methanol (2:1) eluiert. Alle Fraktionen wurden im Stickstoffstrom eingedampft und in 500 µL Chloroform aufgenommen und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Für die NMR-Messungen wurden die Lösungen nochmals eingedampft und die Lipide in 600µL deuteriertem Lösungsmittel (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 2:1) aufgenommen.

## 5.5 SPE-Methode nach Schweisguth

### 5.5.1 Material

SPE-Kartusche: Chromabond<sup>®</sup>, NH<sub>2</sub>, 6 mL/1000 mg, Macherey-Nagel, Düren

### 5.5.2 Chemikalien

|            |                      |                        |
|------------|----------------------|------------------------|
| n-Hexan    | Rotisolv, HPLC grade | VWR, Darmstadt         |
| Chloroform | AnalaR Normapur      | VWR, Darmstadt         |
| Methanol   | LC-MS Chromasolv     | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Essigsäure | p.a. konz.           | Sigma-Aldrich, München |

### 5.5.3 Durchführung

Bei der Methode nach Schweisguth et al. 1989 wird ein lipophiles Rinderhirnextrakt mit einer Silikagelkartusche, die mit 12 mL n-Hexan konditioniert wird, in vier Schritten aufgetrennt und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass nur eine SPE-Kartusche benötigt wird. Auch die einfache Lösungsmittelzusammensetzung und die geringe Lösungsmittelmenge sind attraktiv.

Zunächst werden die neutralen Lipide (NL) mit 5% Methanol in Chloroform eluiert. In den nächsten Schritten wird der Methanol-Anteil gesteigert, so dass mit 10% Methanol in Chloroform Cerebroside (Cer) und mit 30% Methanol in Chloroform Phosphatidylglycerin (PG) bzw. Phosphatidylethanolamin (PE) eluiert werden. Für die Elution von Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPH),

Phosphatidylserin(PS) und Phosphatidylinositol (PI) wird 40% Methanol in Chloroform verwendet, wobei diese Lösung zusätzlich mit 1% Essigsäure versetzt wird.

## 5.6 Entwickelte und optimierte SPE-Methode (Optimierung III)

### 5.6.1 Material

SPE-Kartusche: Chromabond<sup>®</sup>, SiOH, 6mL/500mg, Macherey-Nagel, Düren (selbstgepackt)

### 5.6.2 Chemikalien

|            |                      |                        |
|------------|----------------------|------------------------|
| n-Hexan    | Rotisolv, HPLC grade | VWR, Darmstadt         |
| Chloroform | AnalaR Normapur      | VWR, Darmstadt         |
| Methanol   | LC-MS Chromasolv     | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Essigsäure | p.a. konz.           | Sigma-Aldrich, München |

### 5.6.3 Durchführung

Eine Silikagelkartusche (500 mg) wurde mit 12 mL Hexan konditioniert und die in Chloroform gelösten Lipide wurden aufgetragen. Anschließend wurde mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen fraktionierend eluiert. Im ersten Elutionsschritt wurden die neutralen Lipide mit 10 mL Chloroform/Methanol (97/3) und im zweiten Schritt die GalCer mit 10 mL Chloroform/Methanol (90/10) eluiert. Anschließend erfolgte mit 10 mL Chloroform/Methanol (87/13) die Elution von S-Galcer. In der vierten Fraktion wurde mit 10 mL Chloroform/Methanol (70/30) PE und PE-Plasm. eluiert. Anschließend wird mit Chloroform/Methanol/Essigsäure (60/40/4) PC von der Kartusche eluiert. Mit 10 mL Methanol wird restliches PC und SPH eluiert. Zuletzt wird mit Chloroform/Methanol/0,8 M NaAc (20/10/1,5) PI eluiert. Alle Fraktionen wurden im Stickstoffstrom eingedampft und in 500 µL Chloroform aufgenommen und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Für die NMR-Messungen wurden die Lösungen nochmals eingedampft und die Lipide in 600µL deuteriertem Lösungsmittel (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 2:1) aufgenommen.

## 5.7 Probenmaterial

### Blutplasma (human)

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutplasmaproben wurden von Prof. Lison, Nephrologie St. Jürgenstraße, Bremen zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um Proben von Patienten mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen. Die bereits lyophilisierten Proben wurden gepoolt und in Portionen von 0,25 g unterteilt. Dies entspricht ca. 3 mL unlyophilisiertem Plasma.

### Lipidstandards

|  |                              |
|--|------------------------------|
| 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidsäure                            | Larodan, Malmö<br>(Schweden) |
| 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin            | Lipoid, Ludwigshafen         |
| 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin               | Lipoid, Ludwigshafen         |
| 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac(glycerol)-Na-Salz | Sigma Aldrich,<br>München    |
| Phosphatidylinositol (Sojaextrakt)                         | Larodan, Malmö<br>(Schweden) |
| Phosphatidylserin<br>(Rückenmarkextrakt)                   | Larodan, Malmö<br>(Schweden) |
| Sphingomyelin (Rinderhirnextrakt)                          | Sigma Aldrich,<br>München    |
| Cardiolipin (Rinderherz)                                   | Sigma Aldrich,<br>München    |
| Galactosylcerebrosid (Rinderhirn)                          | Sigma Aldrich,<br>München    |

### 5.7.1 Lagerung der Proben

Sowohl die Lipidstandards als auch die verschiedenen Gewebearten wurden bei -80 °C gelagert. Bereits aufbereitete Proben wurden ebenfalls bei -80 °C in Chloroform und unter Stickstoff in Glasgefäßen mit Teflondeckeln bis zur Analyse aufbewahrt.

## 5.8 NMR-Analyse

|                                     |                       |                               |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| NMR-Spektrometer:                   | Bruker Avance DRX-600 | Bruker BioSpin, Karlsruhe     |
| Chloroform-d1 99,8%                 | $CDCl_3$              | Deutero GmbH, Kastellaun      |
| Methanol-d4 99,8%                   | $CD_3OD$              | <i>Sigma</i> Aldrich, München |
| Natrium-Trimethylsilylpropionat 98% | <i>TSP</i>            | <i>Sigma</i> Aldrich, München |

Alle Spektren wurden mit einem HCN-(5 mm) Inversprobenkopf (x,y,z-Gradient) und einer Feldstärke von 14,1 T aufgenommen. Die Temperatur lag bei allen Messungen bei 300 K. Die Lipidproben wurden in 600  $\mu$ L  $CDCl_3/CD_3OD$  2:1 gelöst. Für die Verarbeitung der Daten wurde Mestrec 4.9.9.9 (Mestrelab) eingesetzt. Die Spektrenparameter wurden für die verschiedenen Fragestellungen optimiert und an die Proben angepasst.

**Tabelle 14: Eingestellte NMR Parameter für 1D-Experimente**

| Parameter              | Abkürzung | $^1H$ -Experiment  |
|------------------------|-----------|--------------------|
| Spektrenbreite         | SW        | 3592,0 Hz/9,97 ppm |
| Mitte des Spektrums    | O1        | 1440,5 Hz/4 ppm    |
| Anzahl der Datenpunkte | TD        | 32768              |
| Pulsleistung           | PL1       | 2,0 dB             |
| Akquisitionszeit       | AQ        | 3,43 sec           |
| Wartezeit vor dem Puls | D1        | 20                 |
| Dummyscans             | DS        | 8                  |
| Anzahl der Scans       | NS        | 64                 |
| Empfängerleistung      | RG        | 256                |

**Tabelle 15: Eingestellte NMR Parameter für 2D-Experimente**

| Parameter              | Abkürzung | HSQC   | HSQC-TOCSY | HMBC   |
|------------------------|-----------|--------|------------|--------|
| Spektrenbreite         | SW (F1)   | 150.00 | 150.00     | 150.00 |
|                        | SW (F2)   | 8.01   | 8.01       | 8.01   |
| Mitte des Spektrums    | O1 (F1)   | 75.00  | 75.00      | 75.00  |
|                        | O1 (F2)   | 4.00   | 4.00       | 4.00   |
| Anzahl der Datenpunkte | TD (F1)   | 1024   | 1024       | 1024   |
|                        | TD (F2)   | 4096   | 4096       | 4096   |
| Pulsleistung           | PL1       | 4.0    | 4.0        | 4.0    |
| Dummyscans             | DS        | 256    | 256        | 256    |
| Anzahl der Scans       | NS        | 32     | 144        | 192    |
| Empfängerleistung      | RG        | 64 k   | 64 k       | 64 k   |

### 5.8.1 Spektrenprozessierung

Die aufgenommenen FIDs (*free induction decay*) (32k Datenpunkte) wurden mittels einer *linear prediction* auf 64k aufgefüllt und mit einer Exponentialfunktion (Linienbreite 0.1) apodisiert. Die Phasenkorrektur erfolgte manuell, während für die Basislinienkorrektur der *Witthaker Smoother* verwendet wurde.

### 5.8.2 Signalzuordnungen

Die Signalzuordnung in den Spektren erfolgte anhand verschiedener 2D NMR-Experimente, durch den Vergleich mit aufgenommenen Referenzspektren von Standardsubstanzen und durch einen Abgleich mit Literaturwerten.

### 5.8.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte mittels externem NMR-Standard Trimethylsilylpropionat- Natriumsalz (TSP), auf den auch kalibriert wurde (0,00 ppm). Die Konzentrationsbestimmung der Standardkapillaren wurde mit den Substanzen Nicotinamid, N-Hydroxysuccinimid und Maleinsäure in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die somit ermittelte Konzentration der TSP-Kapillare lag bei  $0,64 \pm 0,03$  mmol/L.

**Tabelle 16: Integrationsbereich einzelner Signale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum für die Quantifizierung**

| Integrierte Fläche [ppm] | Zuordnung             |
|--------------------------|-----------------------|
| -0,05 bis 0,05           | TSP                   |
| 0,61 bis 0,77            | C18                   |
| 3,08 bis 3,17            | PE-KG                 |
| 3,18 bis 3,29            | Cholin-KG             |
| 5,14 bis 5,22            | PE-Plasm GR-2         |
| 5,22 bis 5,29            | PE-GR-2, PC-GR-2      |
| 5,65 bis 5,80            | GalCer, S-GalCer, SPH |
| 5,88 bis 5,99            | PE-Plasm Δ-1          |

## 5.9 ESI-MS Analyse

Massenspektrometer: Bruker-Esquire-LC Bruker Daltonic, Bremen

Spritzenpumpe 74900 Cole-Parmer

Die analysierten Fraktionen, welche in CHCl<sub>3</sub> gelöst waren, wurden jeweils mit Methanol 1:100 verdünnt. Zur Durchführung der ESI-Experimente über eine Direktinjektion wurde die low-flow-Methode mit folgenden Parametern verwendet:

**Tabelle 17: Eingestellte ESI-MS Parameter**

|                                      |                           |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Kapillarspannung (Capillary voltage) | ± 3800 V (polaritätsabh.) |
| End plate offset                     | ± 500 V (polaritätsabh.)  |
| Vernebelungsgas (Nebulizer gas)      | 5 psi                     |
| Trockengas (Dry gas)                 | 5 L/min                   |
| Trockengastemperatur (Dry heat)      | 300 °C                    |

Die Parameter „*target mass*“ (TM) und „*compound stability*“ (CS) wurden abhängig von der untersuchten Lipidklasse sowie der Stabilität des Mutterions variiert.

Zur Analyse der erhaltenen Spektren wurde das Programm DataAnalysis 4.0 verwendet.

## 5.10 HPLC-Analyse

|                          |                        |                       |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| HPLC-System<br>Waldbronn | <i>Agilent 1100</i>    | Agilent Technologies, |
| Säulenofen               | <i>Jetstream II</i>    | Knauer, Berlin        |
| Säule                    | Nucleodur® C18 Gravity | Macherey-Nagel, Düren |

### RP-HPLC-Methode nach Zhou *et al.* 2012

Die isokratische RP-HPLC-Methode zur Trennung von PE-Einzelkomponenten wurde nach Zhou *et al.* mit einigen Anpassungen durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine RP-18-Phase (Nucleodur® C18 Gravity) und als mobile Phase wurde 100% Methanol versetzt mit 5 mmol/L Ammoniumformiat verwendet. Die Flußrate betrug 1 mL/min und das Injektionsvolumen lag bei 10 µL. Die Temperatur des Säulenofens wurde auf 30°C gestellt.

Die Detektion erfolgte sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus unter folgenden Bedingungen:

Kapillarspannung 2800 V, endplate offset -500 V, Vernebelungsgas 30 psi, Trockengas 10 L/min, Trockengastemperatur 300 °C.

Die untersuchten PE-Komponenten und die GalCer-Komponenten waren in CHCl<sub>3</sub> gelöst. Für Beide Trennungen wurde eine Laufzeit von 40 min eingestellt, wobei die tatsächliche Laufzeit für die PE-Einzelkomponententrennung unter 20 min und die für die GalCer-Einzelkomponententrennung unter 30 min lag. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt und dabei wurden relativ stabile Retentionszeiten beobachtet.

## Literaturverzeichnis

- Abidi, S. L.:** Separation procedures for phosphatidylserines. *Journal of Chromatography B*, **717**, 279-293, 1998.
- Abidi, S. L.; Mounts, T. L.:** Separations of molecular species of phosphatidic acid by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **694**, 365-373, 1995.
- Alvarez, J. G.; Touchstone, J. C.:** Separation of acidic and neutral lipids by aminopropyl-bonded silica gel column chromatography. *Journal of Chromatography*, **577**, 142-145, 1992.
- Becart, J.; Chevalier, C.; Biesse, J.P.:** Quantitative Analysis of Phospholipids by HPLC with a Light Scattering Evaporating Detector-Application to Raw Materials for Cosmetic Use. *Journal of High Resolution Chromatography*, **13**, 126-129, 1990.
- Beckonert, O.; Monnerjahn, J.; Bonk, U.; Leibfritz, D.:** Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and self-organizing maps. *NMR in Biomedicine*, **16**, 1-11, 2003.
- Beier, U. H.; Görögh, T.:** Implications of galactocerebrosidase and galactosylcerebroside metabolism in cancer cells. *International Journal of Cancer*, **115**, 6-10, 2005.
- Berry, K. A. Z.; Murphy, R. C.:** Electrospray ionization tandem mass spectrometry of Glycerophosphoethanolamine plasmalogen phospholipids. *American Society for Mass Spectrometry*, **15**, 1499-1508, 2004.
- Bjerve, K. S.; Daae, L. N. W.; Bremer, J.:** The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures. *Analytical Biochemistry*, **58**, 228-245, 1974.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J.:** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917, 1959.
- Braverman, N. E.; Moser, A. B.:** Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1822**, 1442-1452, 2012.
- Brouwers, J. F. H. M.; Vernooij, E. A. M.; Tielens, A. G. M.; van Golde, L. M. G.:** Rapid separation and identification of phosphatidylethanolamine molecular species. *Journal of Lipid Research*, **40**, 164-169, 1999.
- Brügger, B.; Erben, G.; Sandhoff, R.; Wieland, F. T.; Lehmann, W. D.:** Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **94**, 2339-2344, 1997.
- Cheng, H.; Xu, J.; Mckeel, D.W.; Han, X.:** Specificity and Potential Mechanism of Sulfatide Deficiency in Alzheimer's Disease: An Electrospray Ionization Mass Spectrometric Study. *Cellular and Molecular Biology*, **49**, 809-818, 2003.

- Chicco, A. J.; Sparagna, G. C.:** Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **292**, 33-44, 2007.
- Christiansen, K.:** Lipid extraction procedure for in vitro studies of glyceride synthesis with labeled fatty acids. *Analytical Biochemistry*, **66**, 93-99, 1975.
- Christie, W. W.:** Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. *Journal of Lipid Research*, **26**, 507-512, 1985.
- Christie, W. W.; Han, X.:** Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis, Fourth Edition, *The Oily Press*, Bridgwater England, 2010.
- Colbeau, A.; Nachbaur, J.; Vignais, P.M.:** Enzymatic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **249**, 462-492, 1971.
- Culeddu, N.; Bosco, M.; Toffanin, R., Pollesello, P.:** <sup>31</sup>P NMR analysis of phospholipids in crude extracts from different sources: improved efficiency of the solvent system. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **36**, 907-912, 1998.
- Cunnane, S. T.; Ho, S.-Y.; Dore-Duffy, P.; Ells, K. R.; Horrobin, D. F.:** Essential fatty acid and lipid profiles in plasma and erythrocytes in patients with multiple sclerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **50**, 801-806, 1989.
- Daae, L. N. W.; Bremer, J.:** The acylation of glycerophosphate in rat liver. A new assay procedure for glycerophosphate acylation, studies on its subcellular and submitochondrial localization and determination of the reaction products. *Biochimica et Biophysica Acta*, **210**, 92-104, 1970.
- Detopoulou, P.; Nomikos, T.; Fragopoulou, E.; Antonopoulou, S.; Kotroyiannis, I.; Vassiliadou, C.; Panagiotakos, D. B.; Chrysohoou, C.; Pitsavos, C.; Stefanadis, C.:** Platelet activating factor (PAF) and activity of its biosynthetic and catabolic enzymes in blood and leukocytes of male patients with newly diagnosed heart failure. *Clinical Biochemistry*, **42**, 44-49, 2009.
- Egberts, J.; Buiskool, R.:** Isolation of the Acidic Phospholipid Phosphatidylglycerol from Pulmonary Surfactant by Sorbent Extraction Chromatography, *Clinical Chemistry*, **34**, 163-164, 1988.
- Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R.C.; Nishijima, M.; Raetz, C.R.H.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M.J.O.; Dennis, E.A.:** Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *Journal of Lipid Research*, **50**, 9-14, 2009.
- Farooqui, A.A.; Horrocks, L.A.:** Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia, *Neuroscientist*, **7**, 232-245, 2001.
- Farooqui, A. A; Horrocks, L. A.; Farooqui, T.:** Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions and involvement in neurological disorders, *Chemistry and Physics of Lipids*, **106**, 1-29, 2000.

- Fauland, A.; Trötz Müller, M.; Eberl, A.; Afiuni-Zadeh, S.; Köfeler, H.; Guo, X.; Lankmayr, E.:** An improved SPE method for fractionation and identification of phospholipids. *Journal of Separation Science*, **36**, 744-751, 2013.
- Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C. M.:** Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, **246**, 64-71, 1989.
- Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S.:** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509, 1957.
- Ford, D. A.; Han, X.; Horner, C. C.; Gross, R. W.:** Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. *Biochemistry*, **35**, 7903-7909, 1996.
- Ganong, B. R.; Loomis, C. R.; Bell, R. M.:** Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **83**, 1184-1188, 1986.
- Gattaz, W. F.; Brunner, L.:** Phospholipase A2 and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **55**, 109-113, 1996.
- Gebert, N.; Joshi, A. S.; Kutik, S.; Becker, T.; McKenzie, M.; Guan, X. L.; Mooga, V. P.; Stroud, D. A.; Kulkarni, G.; Wenk, M. R.; Rehling, P.; Meisinger, C.; Ryan, M. T.; Wiedemann, N.; Greenberg, M. L.; Pfanner, N.:** Mitochondrial Cardiolipin involved in outer-membrane Protein Biogenesis: Implications for Barth Syndrome. *Current Biology*, **19**, 2133-2139, 2009.
- Gluck, L.; Kulovich, M. V.; Brody, S. J.:** Rapid quantitative measurement of lung tissue phospholipids. *Journal of Lipid Research*, **7**, 570-574, 1966.
- Gottwald, W.:** RP-HPLC für Anwender. Die Praxis der instrumentellen Analytik. VCH Verlag, Weinheim, 1993.
- Grey, M. H.:** Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 2. überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008.
- Guan, Z.:** Discovering novel brain lipids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **877**, 2814-2821, 2009.
- Hamilton, J. G.; Comai, K.:** Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns. *Lipids*, **23**, 1146-1149, 1988.
- Han, X.; Cheng, H.:** Characterization and direct quantitation of cerebroside molecular species from lipid extracts by shotgun lipidomics, *Journal of Lipid Research*, **46**, 163-175, 2005.

- Han, X.; Holtzman, D. M.; McKeel, D. W.:** Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*, **77**, 1168–1180, 2001.
- Han, X.; Holtzman, M.; McKeel, D.W., Jr.; Kelley, J.; Morris, J.C.:** Substantial Sulfatide Deficiency and Ceramide Elevation in Very Early Alzheimer's Disease: Potential Role in Disease Pathogenesis. *Journal of Neurochemistry*, **82**, 809–818, 2002.
- Han, X.; Gubitosi-Klug, R. A.; Collins, B. J.; Gross, R. W.:** Alterations in individual molecular species of human platelet phospholipids during thrombin stimulation: electrospray ionization mass spectrometry-facilitated identification of the boundary conditions for the magnitude and selectivity of thrombin-induced platelet phospholipid hydrolysis. *Biochemistry*, **35**, 5822-5832, 1996.
- Hanahan, D.J.; Dittmer, J. C.; Warashina, E.:** A column chromatographic separation of classes of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, **228**, 685-700, 1957.
- Hara, A.; Radin. N. S.:** Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, **90**, 420-426, 1978.
- Hejazi, L.; Wong, J. W.H.; Cheng, D.; Proschogo, N.; Ebrahimi, D.; Garner, B.; Don, A. S.:** Mass and relative elution time profiling: two-dimensional analysis of sphingolipids in Alzheimer's disease brain. *Biochemical Journal*, **438**, 166-175, 2011.
- Helander, A.; Zheng, Y.:** Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clinical Chemistry* **55**, 1395-1405, 2009.
- Hennion, M.-C.:** Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **856**, 3-54, 1999.
- Hicks, A. M.; DeLong, C. J.; Thomas, M. J.; Samuel, M.; Cui, Z.:** Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**, 1022-1029, 2006.
- Hoffmann, E.; Stroobant, V.:** Mass Spectrometry. Principles and Applications. 3. Edition, *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester, England, 2007.
- Hoffmann, K.; Blaudszun, J.; Brunken, C.; Höpker, W. W.; Tauber, R.; Steinhart, H.:** Lipid Class Distribution of Fatty Acids Including Conjugated Linoleic Acids in Healthy and Cancerous Parts of Human Kidneys. *Lipids*, **40**, 1057-1062, 2005.

- Horrobin, D. F.:** The role of brain lipid metabolism in schizophrenia. In: Riemersma, R.A., Armstrong, R., Kelly, R.W., Wilson, R. (Eds.), *Essential Fatty Acids and Eicosanoids: Invited Papers from the Fourth International Congress*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 341–343, 1998.
- Hsu, F.-F.; Bohrer, A.; Turk, J.:** Electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sulfatide. Determination of fragmentation patterns and characterization of molecular species expressed in brain and in pancreatic islets. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1392**, 202-216, 1998.
- Hsu, F.-F.; Turk, J.:** Structural characterization of cardiolipin by Tandem Quadrupole and Multiple-Stage Quadrupole Ion-Trap Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, **16**, 491-504, 2004.
- Iida-Tanaka, N.; Ishizuka, I.:** Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignment of mono-sulfated galactosylceramides with four types of ceramides from human kidney. *Carbohydrate Research*, **324**, 218-222, 2000.
- Isaac, G.; Pernber, Z.; Gieselmann, V.; Hansson, E.; Bergquist, J.; Mansson, J.-E.:** Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons. *FEBS Journal*, **273**, 1782-1790, 2006.
- Kaluzny, M. A.; Duncan, L. A.; Merritt, M. V.; Epps, D. E.:** Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, **26**, 135-140, 1985.
- Kerwin, J. L.; Tuininga, A. R.; Ericsson, L. H.:** Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, **35**, 1102-1114, 1994.
- Keweloh, H.; Heipieper, H. J.:** Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids*, **31**, 129-137, 1996.
- Kicinski, H.-G.:** Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung und Clean-up. *CLB: Chemie in Labor und Biotechnik*, Jg. 47, Heft 12, 542-548, 1996.
- Kim, H.-Y.; Salem, N.:** Separation of lipid classes by solid phase extraction. *Journal of Lipid Research*, **31**, 2285-2289, 1990.
- Kolter, T.; Sandhoff, K.:** Sphingolipid metabolism diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 2057-2079, 2006.
- Koivusalo, M.; Haimi, P.; Heikinheimo, L.; Kostainen, R.; Somerharju, P.:** Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response, *Journal of Lipid Research*, **42**, 663–672, 2001.
- Krauss, R. M.:** Lipids and Lipoproteins in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, **27**, 1496-1504, 2004.
- Krishnan, T. R.; Ibrahim, I.:** Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **12**, 287-294, 1994.

- Kromidas, S.:** Validierung in der Analytik. 2. überarbeitete Auflage. *Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, 2011.
- Larijani, B.; Poccia, D.L.; Dickinson, L. C.:** Phospholipid identification and quantification of membrane vesicle subfractions by  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  two-dimensional nuclear magnetic resonance. *Lipids*, **35**, 1289-1297, 2000.
- Larsen, Å.; Mokastet, E.; Lundanes, E.; Hvattum, E.:** Separation and identification of phosphatidylserine molecular species using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*, **774**, 115-120, 2002.
- Liebisch, G.; Lieser, B.; Rathenber, J.; Drobnik, W.; Schmitz, G.:** High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1686**, 108–117, 2004.
- Liebisch, G.; Binder, M.; Schifferer, R.; Langmann, T.; Schulz, B.; Schmitz, G.:** High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**, 121–128, 2006.
- Lottspeich, F.; Engels, J. W.** (Hrsg.): Bioanalytik, *Elsevier GmbH*, München, 2006.
- Maldonado, E. N.; Alderson, N. L.; Monje, P. V.; Wood, P. M.; Hama, H.:** FA2H is responsible for the formation of 2-hydroxy galactolipids in peripheral nervous system myelin. *Journal of Lipid Research*, **49**, 153-161, 2008.
- Mannor, G.; Barletta, E.; Mugnai, G.; Ruggieri, S.:** Interaction of tumor cells with vascular endothelia: role of platelet-activating-factor. *Clinical & Experimental Metastasis*, **18**, 86-96, 2000.
- Marcus, J.; Popko, B.:** Galactolipids are molecular determinants of myelin development and axo-glia organization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1573**, 406-413, 2002.
- Martínez, M.; Mougán, I.:** Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development. *Journal of Neurochemistry*, **71**, 2528-2533, 1998.
- Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V.; Shevchenko, A.; Schwudke, D.:** Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, **49**, 1137-1146, 2008.
- Metz, K.; Dunphy, L. K.:** Absolute quantitation of tissue phospholipids using  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Journal of Lipid Research*, **37**, 2251-2265, 1996.
- Metzger, K.; Rehberger, P. A.; Erben, G.; Lehmann, W. D.:** Identification and Quantification of Lipid Sulfate Esters by Electrospray Ionization MS/MS Techniques: Cholesterol Sulfate. *Analytical Chemistry*, **67**, 4178-4183, 1995.
- Mills, G. B.; Moolenaar, W. H.:** The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature*, **3**, 582-591, 2003.

- Moraitou, M.; Dimitriou, E.; Dekker, N.; Monopolis, I.; Aerts, J.; Michelakakis, H.:** Gaucher disease: Plasmalogen levels in relation to primary lipid abnormalities and oxidative stress. *Blood Cells, Molecules and Diseases, In Press. Corrected Proof*, 2014.
- Morita, S.-Y.; Takeuchi, A.; Kitagawa, S.:** Functional analysis of two isoforms of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, *Biochemical Journal*, **432**, 387-398, 2010.
- Mulvihill, M. M.; Nomura, D. K.:** Therapeutic potential of monoacylglycerol lipase inhibitors. *Life Sciences*, **92**, 492-497, 2013.
- Murphy, R.C.:** Mass Spectrometry of Phospholipids: Tables of Molecular and Product Ions. *Illuminati Press*, Denver, 2002.
- Murphy, R. C.; Leiker, T. J.; Barkley, R. M.:** Glycerolipid and Cholesterol Ester Analyses in Biological Samples by Mass Spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1811**, 776-783, 2011.
- Nagan, N.; Zoeller, R. A.:** Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research*, **40**, 199-229, 2001.
- Nehen, F.:** MR-spektroskopische Metabolitenanalyse von Biopsaten für die Tumordiagnose. Dissertation, Universität Bremen, 2011.
- Nelson, D.; Cox, M.:** Lehninger Biochemie, 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, *Springer Verlag*, Berlin Heidelberg, 2005.
- O'Brien, J. S.; Rouser, G.:** The fatty acid composition of brain sphingolipids: sphingomyelin, ceramide, cerebroside, and cerebroside sulfate, *Journal of Lipid Research*, **5**, 339-342, 1964.
- Palmer, F. B.:** Chromatography of acidic phospholipids on immobilized neomycin. *Journal of Lipid Research*, **22**, 1296-1300, 1981.
- Patton, G. M., Fasulo, J. M., Robins, S. J.:** Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, **23**, 190-196, 1982.
- Pearce, J. M.; Komorski, R. A.:** Analysis of phospholipid molecular species in brain by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **44**, 215-223, 2000.
- Pérez-Palacios, T.; Ruiz, J.; Antequera, T.:** Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes. *Food Chemistry*, **102**, 875-879, 2007.
- Peterson, L. B.; Cummings, S. B.:** A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography*, **20**, 227-243, 2006.
- Pietsch, A.; Lorenz, R.L.:** Rapid Separation of the Major Phospholipid Classes on a Single Aminopropyl Cartridge. *Lipids*, **28**, 945-947, 1993.

- Prasad, M.R.; Lovell, M.A.; Yatin, M.; Dhillon, H.; Markesbery, W.R.:** Regional Membrane Phospholipid Alterations in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, **23**, 81–88, 1998.
- Pulfer, M.; Murphy, R. C.:** Electrospray Mass Spectrometry of Phospholipids, *Mass Spectrometry Reviews*, **22**, 332-364, 2003.
- Ross, B. M.; Turenne, S.; Moszczynska, A.; Warsh, J. J.; Kish, S. J.:** Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Research*, **821**, 407–413, 1999.
- Sato, Y.; Suzuki, I.; Nakamura, T.; Bernier, F.; Aoshima, K.; Oda, Y.:** Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *Journal of Lipid Research*, **53**, 567-576, 2012.
- Schiller, J.; Suss, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Lessing, J.; Müller M.; Petkovic, M.; Spalteholz, H.; Zschornig, O.; Arnold, K.:** Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, **43**, 449-488, 2004.
- Shah, F. D.; Shukla, S. N.; Shah, P. M.; Patel, R. H.:** Significance of Anlateration in Plasma Lipid Profile Levels in Breast Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, **7**, 33-41, 2008.
- Slomiany, B. L.; Horowitz, M.:** Separation of polar lipids by column chromatography on hydroxylapatite. *Journal of Chromatography A*, **49**, 455-461, 1970.
- Schwalbe-Herrmann, M.:** Lipidanalyse von Bioflüssigkeiten durch kombinierte SPE/HPLC-, MS- und NMR-Techniken. Dissertation, Universität Bremen, 2013
- Schwedt, G.:** Chromatographische Trennmethoden. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. 3. erw. Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, 1994.
- Schweisguth, D. C.; Quelle, F. W.; Wachob, G.; Hammerstedt, R.:** Isolation and characterization of brain lipids by solid phase extraction and thin layer chromatography. *Biochemical Education*, **17**, 211-213, 1989.
- Styger, R.; Wiesmann, U. N.; Honegger, U. E.:** Plasmalogen content and beta-adrenoceptor signalling in fibroblasts from patients with Zellweger syndrome. Effects of hexadecylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1585**, 39–43, 2002.
- Suchoka, Z.; Gronostajska, D.; Suchocki, P.; Pachecka, J.:** New HPLC method for separation of blood plasma phospholipids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **32**, 859-865, 2003.
- Taki, T.; Kuroyanagi, M.; Yoshioka, H.; Handa, S.:** <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance of Glycosphingolipids. *The Journal of Biochemistry*, **111**, 614-619, 1992.

- Tamai, Y.; Araki, S.; Komai, Y.; Satake, M.:** Studies on Neuronal Lipid. *Journal of Neuroscience Research*, **1**, 162-182, 1975.
- Ternes, W.; Täufel, A.; Tunger, L.; Zobel, M.:** Lebensmittellexikon. *Behr's Verlag*, Hamburg, 2005.
- Tosi, M. R.; Tugnoli, V.:** Cholesteryl esters in malignancy. *Clinica Chimica Acta*, **359**, 27-45, 2005.
- Vance, J. E.:** Lipoproteins secreted by cultured rat hepatocytes contain the antioxidant 1-alk-1-enyl-2-acylglycerophosphoethanolamine, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1045**, 128-134, 1990.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. ; Beck-Sickinger, A.G. ; Hahn, U. (Hrsg.):** Lehrbuch der Biochemie, *Wiley-VCH*, Weinheim, 2002.
- Walde, P.; Giuliani, A. M.; Boicelli, A.; Luisi, P L.:** Phospholipid-based reverse micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, **53**, 265-288, 1990.
- Wang, C.; Kong, H.; Guan, Y.; Yang, J.; Gu, J.; Yang, S.; Xu, G.:** Plasma Phospholipid Metabolomic Profiling and Biomarkers of Type 2 Diabetes Mellitus Based on High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and Multivariate Statistical Analysis. *Analytical Chemistry*, **77**, 4108-4116, 2005.
- Willmann, J.:** Isolation und Identifikation von Lipiden in Körperflüssigkeiten. Dissertation. Universität Bremen, 2007.
- Wishart, D. S.:** Quantitative metabolomics using NMR. *Trends in Analytical Chemistry*, **27**, 228-237, 2008.
- Wolff, C.; Quin, P. J.:** Lipidomics: Practical aspects and applications. *Progress in Lipid Research*, **47**, 15-36, 2008
- Yano, M.; Kishida, E.; Muneyuki, Y.; Masuzawa, Y.:** Quantitative analysis of ceramide molecular species by high performance liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, **39**, 2091-2098, 1998.
- Zhao, Z.; Xiao, Y.; Elson, P.; Tan, H.; Plummer, S. J.; Berk, M.; Aung, P. P.; Lavery, I. C.; Achkar, J. P.; Li, L.; Casey, G.; Xu, Y.:** Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarker for colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*, **25**, 2696-2701, 2007.
- Zhao, Z. and Xu, Y.:** An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *Journal of Lipid Research*, **51**, 652-659, 2010.
- Zhou, L.; Zhao, M.; Ennahar, S.; Bindler, F.; Marchioni, E.:** Determination of phosphatidylethanolamine molecular species in various food matrices by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS<sup>2</sup>). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**, 291-300, 2012.

## Abkürzungsverzeichnis

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Abb.....              | Abbildung   |
| bzw.....              | beziehungsweise   |
| Chol.....             | Cholesterol   |
| CE.....               | Cholesterolester  |
| CL.....               | Cardiolipin   |
| CMB.....              | Chloroform-Methanol-Bidestilliertes Wasser                              |
| cs.....               | <i>compound stability</i>   |
| DAG.....              | Diacylglycerin  |
| d.h.....              | das heißt   |
| ECN.....              | <i>effective carbon number</i> , effektive Kohlenstoffzahl              |
| ESI.....              | Electrospray Ionization   |
| <i>et al.</i> .....   | <i>et alii</i> (lat.: und andere)                                       |
| evtl.....             | eventuell   |
| FAB.....              | Fast-Atom Bombardement  |
| FID.....              | Free Induction Decay  |
| FS.....               | Fettsäure   |
| GalCer.....           | Galactosylcerebrosid  |
| GR.....               | Glycerolrest  |
| HOAc.....             | Essigsäure  |
| HPLC.....             | High Performance Liquid Chromatography                                  |
| HSQC.....             | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>                           |
| Inj. Vol.....         | Injektionsvolumen   |
| IUPAC.....            | International Union of Pure and Applied Chemistry                       |
| Kap.....              | Kapitel   |
| KG.....               | Kopfgruppe  |
| Konz.....             | Konzentration   |
| min.....              | Minute  |
| MS.....               | Massenspektrometrie   |
| MTBE.....             | Methyl- <i>tert</i> -butylether   |
| MUFA.....             | <i>Mono Unsaturated Fatty Acid</i> , einfach ungesättigte<br>Fettsäuren |
| m/z.....              | Masse-zu-Ladung-Verhältnis  |
| NH <sub>2</sub> ..... | Aminopropyl   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| NL.....                 | neutrale Lipide  |
| NMR.....                | Nuclear Magnetic Resonance   |
| NP .....                | <i>normal-phase</i> , Normalphase  |
| PA .....                | Phosphatidsäure  |
| PC .....                | Phosphatidylcholin   |
| PE .....                | Phosphatidylethanolamin  |
| PG.....                 | Phosphatidylglycerol   |
| PI.....                 | Phosphatidylinositol   |
| PL.....                 | Phospholipid   |
| Plasm .....             | Plasmalogen  |
| ppm .....               | <i>Parts per million</i>   |
| PS .....                | Phosphatidylserin  |
| PUFA.....               | <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i> , mehrfach ungesättigte<br>Fettsäuren |
| RP .....                | <i>reversed-Phase</i> , Umkehrphase                                      |
| SD .....                | <i>standard deviation</i> , Standardabweichung                           |
| SD <sub>rel</sub> ..... | <i>relative standard deviation</i> , relative Standardabweichung         |
| S-GalCer .....          | Sulfatid   |
| SiOH.....               | Kieselgel  |
| SPE .....               | Solid Phase Extraction   |
| SPH.....                | Sphingomyelin  |
| Tab.....                | Tabelle  |
| TAG.....                | Triacylglycerol  |
| TLC .....               | <i>Thin Layer Chromatography</i>   |
| TM.....                 | <i>Target Mass</i>   |
| TSP .....               | Trimethylsilylpropionsäure   |
| u.a. ....               | unter anderem  |
| vgl.....                | vergleiche   |
| z.B.....                | zum Beispiel   |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1-1: Chemische Strukturen verschiedener Glycerophospholipidklassen. ....   | 6  |
| Abb. 1-2: Chemische Strukturen der Etherlipide und Enoetherlipide<br>(Plasmalogene). ....   | 7  |
| Abb. 1-3: Chemische Strukturen einiger Sphingolipide. ....  | 8  |
| Abb.: 2-1: Ausschnitte aus den 600 MHz <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der CMB-, Isopropanol-<br>und MTBE-Extrakte. ....                | 25 |
| Abb. 2-2: Schematische Darstellung des ersten Teils der SPE-Methode nach<br>Kaluzny <i>et al.</i> (1985) sowie der Erweiterung .... | 28 |
| Abb. 2-3: Trennansätze von PE, PC und SPH über eine Silikagelkartusche. ....  | 31 |
| Abb. 2-4: Übersicht der Festphasenextraktion nach Schweisguth <i>et al.</i> 1989.....   | 34 |
| Abb. 2-5: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der 1. Fraktion nach<br>Schweisguth. ....                          | 35 |
| Abb. 2-6: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der 2. Fraktion nach<br>Schweisguth. ....                          | 36 |
| Abb. 2-7: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der 3. Fraktion nach<br>Schweisguth. ....                          | 36 |
| Abb. 2-8: Ausschnitt aus dem 600 MHz <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der 4. Fraktion nach<br>Schweisguth. ....                          | 37 |
| Abb. 2-9: Ausschnitte aus dem 600 MHz HSQC-Spektrum des GalCer-Standards (A<br>bis C) und Darstellung der GalCer-Typen (D). ....    | 40 |
| Abb. 2-10: Ausschnitte aus den HSQC-Spektren des aufgetrennten GalCer-<br>Standards. A: 1. Fraktion, B: 2. Fraktion.....            | 41 |
| Abb. 2-11: ESI-Massenspektrum des GalCer-Standards im positiven Ionenmodus.<br>.....  | 41 |
| Abb. 2-12: ESI-Massenspektrum des GalCer-Standards im negativen Ionenmodus.<br>.....  | 42 |
| Abb. 2-13: ESI-MS/MS-Spektren von A: Typ 1, GalCer(18:0-OH) und B: Typ 2,<br>GalCer(18:0) im negativen Ionenmodus.....              | 43 |
| Abb. 2-14: ESI-Massenspektrum des Sulfatids im positiven Ionenmodus.....  | 44 |
| Abb. 2-15: ESI-Massenspektrum der als Sulfatid identifizierten GalCer-Spezies im<br>negativen Ionenmodus. ....                      | 45 |
| Abb.2-16: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum des Sulfatids (A) und dessen<br>chemische Struktur (B). ....                             | 46 |
| Abb. 2-17: MS/MS-Spektrum im negativen Ionenmodus des Moleküliions m/z 885.48   |    |

|  |     |
|--|-----|
| Abb. 2-18: Zweiter Optimierungsschritt der SPE-Methode (Optimierung II). .....                           | 50  |
| Abb. 2-19: Prozentuale Lipidzusammensetzung in Schweinehirn, -leber, -niere und -<br>herz. ....          | 56  |
| Abb. 2-20: Prozentuale Lipidzusammensetzung in Blutplasma.....   | 61  |
| Abb. 2-21: Basispeak-Chromatogramme der Auftrennung von PE-Spezies<br>verschiedener Schweineorgane ..... | 64  |
| Abb. 2-22: Basispeak-Chromatogramm der Auftrennung von GalCer-Spezies aus<br>Schweinehirn.....           | 69  |
| Abb. A-1: Bezeichnungen der Positionen einer Fettsäure.....  | 102 |
| Abb. A-2: <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineherz.....                        | 113 |
| Abb. A-3: <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineherz.....                        | 114 |
| Abb. A-4: <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineleber.....                       | 115 |
| Abb. A-5: <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineniere.....                       | 115 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Lipiden und Krankheiten.....  | 10 |
| Tabelle 2: Ausgewählte HPLC-Methoden aus der Literatur zur<br>PL-Einzelkomponententrennung .....   | 17 |
| Tabelle 3: Zusammenfassung der drei Extraktionsmethoden .....  | 26 |
| Tabelle 4: Ergebnisse aus der SPE-Auftrennung der PL aus Schweinehirn über eine<br>Kieselgelkartusche .....                              | 32 |
| Tabelle 5: Vergleich der Ergebnisse mit denen von Schweisguth <i>et al.</i> ....   | 38 |
| Tabelle 6: Fragmentierungsverhalten der GalCer-Ionen im positiven Ionenmodus.  | 42 |
| Tabelle 7: Zuordnung der <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-Signale von Sulfatid .....  | 46 |
| Tabelle 8: Quantitativer Vergleich einzelner Optimierungsschritte .....  | 52 |
| Tabelle 9: Quantitative Auswertung der Varianz der Methode .....   | 54 |
| Tabelle 10: Wiederfindungsraten der verschiedenen Lipidklassen, n=3.....   | 54 |
| Tabelle 11: Quantifizierung der Lipidkomponenten in Schweinehirn, -leber, -niere<br>und -herz .....                                      | 58 |
| Tabelle 12: Zusammenfassung der detektierten PE-Einzelkomponenten in<br>verschiedenen Organen. Hauptkomponenten sind hervorgehoben. .... | 67 |
| Tabelle 13: Zusammenfassung der detektierten GalCer-Einzelkomponenten in<br>Schweinehirn.....  | 71 |
| Tabelle 14: Eingestellte NMR Parameter für 1D-Experimente .....  | 84 |
| Tabelle 15: Eingestellte NMR Parameter für 2D-Experimente .....  | 85 |
| Tabelle 16: Integrationsbereich einzelner Signale im <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum für die<br>Quantifizierung .....                        | 86 |
| Tabelle 17: Eingestellte ESI-MS Parameter .....  | 86 |

## Anhang

### A-1 Fettsäurenomenklatur

Als Bezeichnung für die Positionen in den Fettsäureketten werden die Buchstaben des griechischen Alphabets verwendet, beginnend mit dem C2-Atom, welches mit  $\alpha$  bezeichnet wird. Die terminale Methylgruppe erhält immer den Buchstaben  $\omega$ , die vorhergehenden Methylengruppen  $\omega-1$ ,  $\omega-2$  usw. (siehe Abb. A-1). Doppelbindungen werden durch ein  $\Delta$  gekennzeichnet und die benachbarten Methylengruppen durch Angabe ihrer Lage zur Doppelbindung. Dabei steht  $\Delta-1$  für direkt benachbarte Gruppen,  $\Delta-2$  für die folgende Gruppe in der Kette und  $\Delta-CH_2-\Delta$  für eine Methylengruppe zwischen zwei Doppelbindungen.

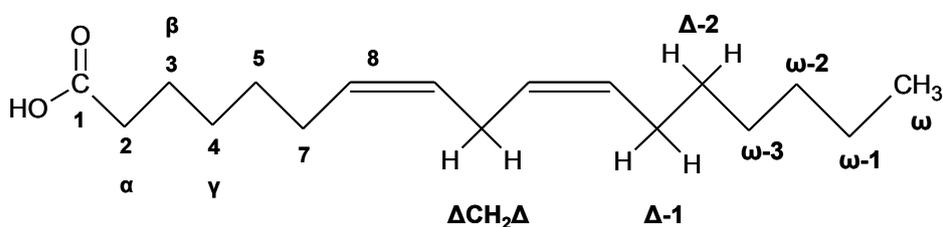
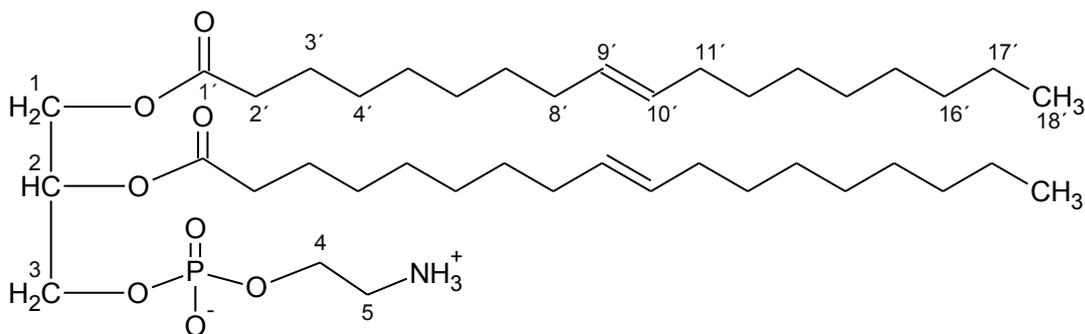


Abb. A-1: Bezeichnungen der Positionen einer Fettsäure.

## A-2 Chemische Verschiebungen

### 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (PE(36:2))

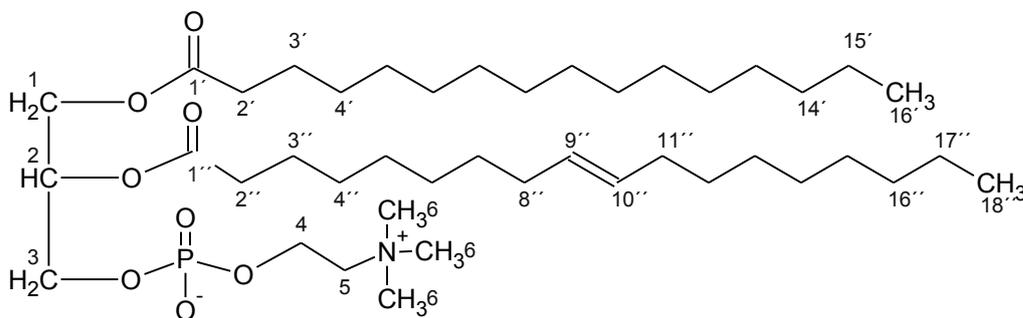
(kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                              | Position | $\delta^1\text{H}$ [ppm] |
|------------------------------|----------|--------------------------|
| <b>Glycerin</b>              | 1        | 4,31/4,07                |
|                              | 2        | 5,13                     |
|                              | 3        | 3,90/3,89                |
| <b>Phosphorylethanolamin</b> | 4        | 3,96/3,94                |
|                              | 5        | 3,01                     |
| <b>Ölsäure</b>               | 2'       | 2,22                     |
|                              | 3'       | 1,51                     |
|                              | 4'       | 1,16                     |
|                              | 8'       | 1,92                     |
|                              | 9'       | 5,24                     |
|                              | 10'      | 5,24                     |
|                              | 11'      | 1,91                     |
|                              | 16'      | 1,16                     |
|                              | 17'      | 1,16                     |
|                              | 18'      | 0,78                     |

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (PC(34:1))

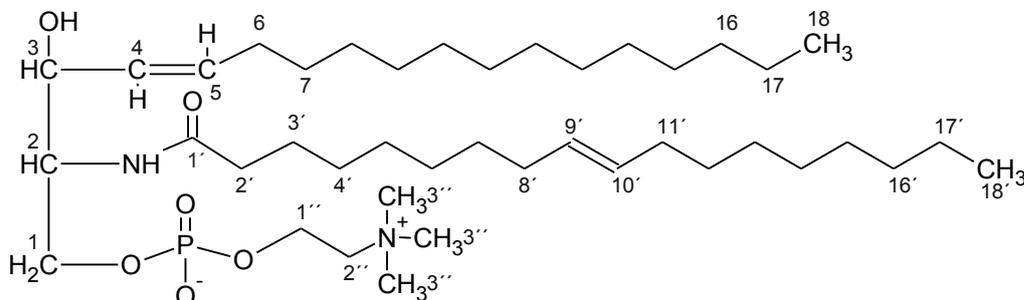
(kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                         | Position | $\delta^1\text{H}$ [ppm] |
|-------------------------|----------|--------------------------|
| <b>Glycerin</b>         | 1        | 4,31/4,05                |
|                         | 2        | 5,13                     |
|                         | 3        | 3,90                     |
| <b>Phosphorylcholin</b> | 4        | 4,14                     |
|                         | 5        | 3,49                     |
|                         | 6        | 3,12                     |
| <b>Palmitinsäure</b>    | 2'       | 2,22                     |
|                         | 3'       | 1,50                     |
|                         | 4'       | 1,20                     |
|                         | 14'      | 1,16                     |
|                         | 15'      | 1,16                     |
|                         | 16'      | 0,78                     |
| <b>Ölsäure</b>          | 2''      | 2,22                     |
|                         | 3''      | 1,51                     |
|                         | 4''      | 1,21                     |
|                         | 8''      | 1,92                     |
|                         | 9''      | 5,24                     |
|                         | 10''     | 5,24                     |
|                         | 11''     | 1,91                     |
|                         | 16''     | 1,16                     |
|                         | 17''     | 1,16                     |
| 18''                    | 0,78     |                          |

## Sphingomyelin (Rinderhirn Extrakt) (SPH)

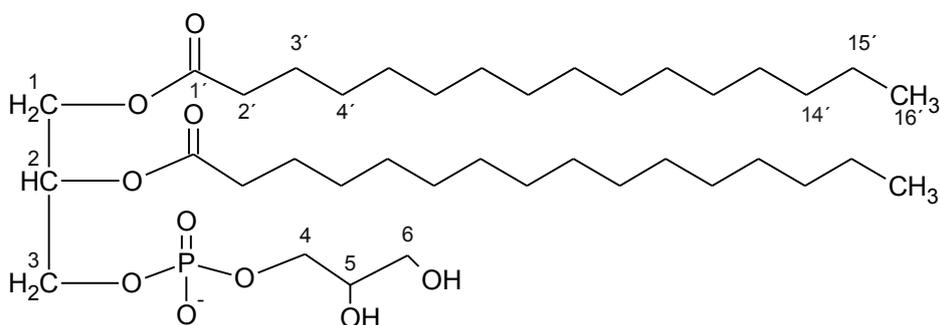
(Die chem. Verschiebung wird exemplarisch für Ölsäure angegeben. Kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                             | Position | $\delta^1\text{H}$ [ppm] |
|-----------------------------|----------|--------------------------|
| <b>D-erythro-Sphingosin</b> | 1        | 4,09/3,78                |
|                             | 2        | 3,82                     |
|                             | 3        | 3,97                     |
|                             | 4        | 5,35                     |
|                             | 5        | 5,61                     |
|                             | 6        | 1,91                     |
|                             | 7        | 1,49                     |
|                             | 16       | 1,16                     |
|                             | 17       | 1,16                     |
| 18                          | 0,78     |                          |
| <b>Phosphorylcholin</b>     | 1''      | 4,14                     |
|                             | 2''      | 3,48                     |
|                             | 3''      | 3,11                     |
| <b>Ölsäure</b>              | 2'       | 2,22                     |
|                             | 3'       | 1,47                     |
|                             | 4'       | 1,20                     |
|                             | 8'       | 1,91                     |
|                             | 9'       | 5,25                     |
|                             | 10'      | 5,25                     |
|                             | 11'      | 1,91                     |
|                             | 16'      | 1,16                     |
|                             | 17'      | 1,16                     |
| 18'                         | 0,78     |                          |

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-rac(1-glycerol) (PG(32:0))

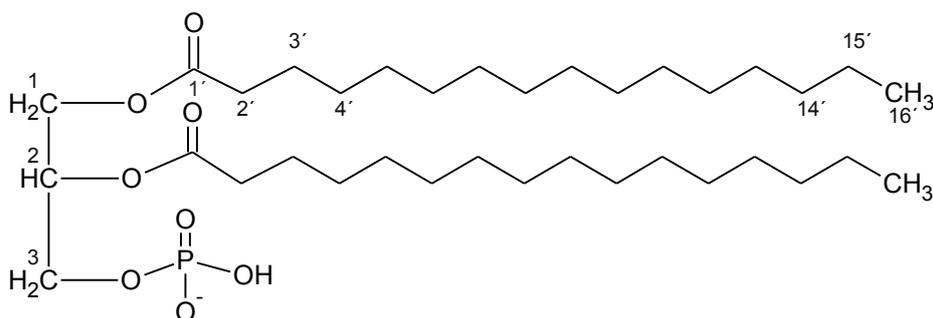
(kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                        | Position | $\delta$ $^1\text{H}$ [ppm] |
|------------------------|----------|-----------------------------|
| <b>Glycerin</b>        | 1        | 4,31/4,09                   |
|                        | 2        | 5,14                        |
|                        | 3        | 3,88                        |
| <b>Phosphoglycerol</b> | 4        | 3,80                        |
|                        | 5        | 3,67                        |
|                        | 6        | 3,51                        |
| <b>Palmitinsäure</b>   | 2'       | 2,21                        |
|                        | 3'       | 1,51                        |
|                        | 4'       | 1,16                        |
|                        | 14'      | 1,16                        |
|                        | 15'      | 1,16                        |
|                        | 16'      | 0,78                        |

### 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidsäure (PA(32:0))

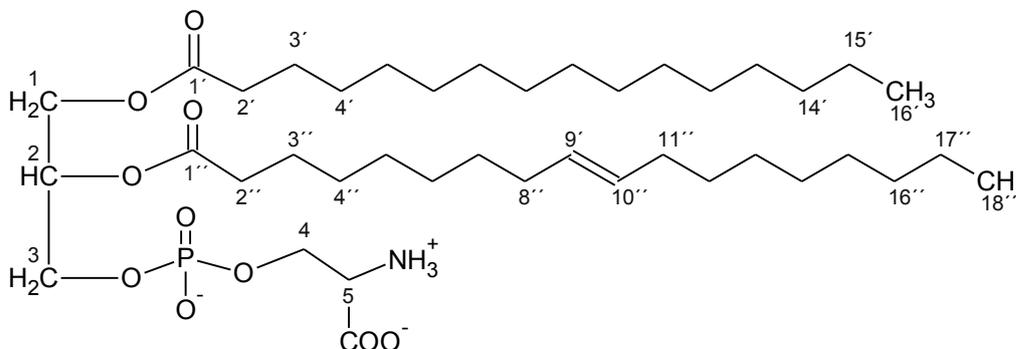
(gemessen in 400  $\mu\text{L}$   $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  (2:1) + 50 $\mu\text{L}$  DCl, kalibriert auf MeOD 3,25 ppm)



|                      | Position | $\delta$ $^1\text{H}$ [ppm] |
|----------------------|----------|-----------------------------|
| <b>Glycerin</b>      | 1        | 4,29/4,09                   |
|                      | 2        | 5,12                        |
|                      | 3        | 3,95                        |
| <b>Palmitinsäure</b> | 2'       | 2,22                        |
|                      | 3'       | 1,50                        |
|                      | 4'       | 1,16                        |
|                      | 14'      | 1,16                        |
|                      | 15'      | 1,16                        |
|                      | 16'      | 0,78                        |

## Phosphatidylserin (Rückenmark Extrakt) (PS)

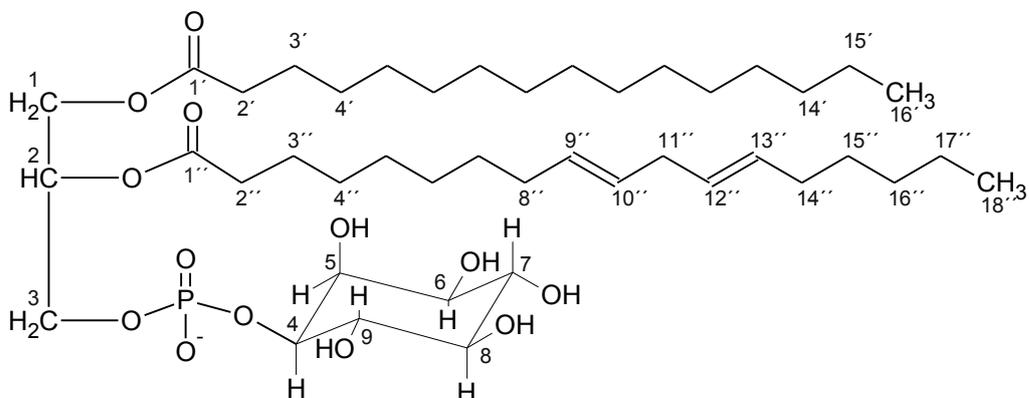
(gemessen in 400 $\mu$ L CDCl<sub>3</sub>/MeOD (2:1) + 30 $\mu$ L DCl, chem. Verschiebung wird exemplarisch für PS(16:0/18:1) angegeben, kalibriert auf MeOD 3,25 ppm)



|                        | Position | $\delta$ <sup>1</sup> H [ppm] |
|------------------------|----------|-------------------------------|
| <b>Glycerin</b>        | 1        | 4,38/4,18                     |
|                        | 2        | 5,15                          |
|                        | 3        | 4,05                          |
| <b>Phosphorylserin</b> | 4        | 4,29/4,26                     |
|                        | 5        | 4,02                          |
| <b>Palmitinsäure</b>   | 2'       | 2,23                          |
|                        | 3'       | 1,50                          |
|                        | 4'       | 1,20                          |
|                        | 14'      | 1,16                          |
|                        | 15'      | 1,16                          |
|                        | 16'      | 0,78                          |
| <b>Ölsäure</b>         | 2''      | 2,23                          |
|                        | 3''      | 1,50                          |
|                        | 4''      | 1,21                          |
|                        | 8''      | 1,90                          |
|                        | 9''      | 5,24                          |
|                        | 10''     | 5,24                          |
|                        | 11''     | 1,90                          |
|                        | 16''     | 1,16                          |
|                        | 17''     | 1,16                          |
|                        | 18''     | 0,78                          |

Phosphatidylinositol (Soja Extrakt) (PI)

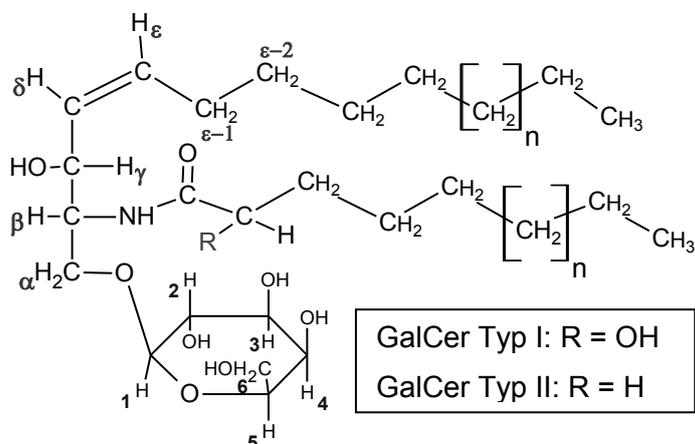
(kalibriert auf MeOD 3,31/49,2 ppm)



|                        | Position | $\delta$ <sup>1</sup> H [ppm] |
|------------------------|----------|-------------------------------|
| <b>Glycerin</b>        | 1        | 4,42/4,17                     |
|                        | 2        | 5,24                          |
|                        | 3        | 3,95                          |
| <b>Phosphoinositol</b> | 4        | 3,80                          |
|                        | 5        | 4,07                          |
|                        | 6        | 3,34                          |
|                        | 7        | 3,56                          |
|                        | 8        | 3,15                          |
|                        | 9        | 3,69                          |
| <b>Palmitinsäure</b>   | 2'       | 2,21                          |
|                        | 3'       | 1,50                          |
|                        | 4'       | 1,16                          |
|                        | 14'      | 1,16                          |
|                        | 15'      | 1,16                          |
|                        | 16'      | 0,79                          |
| <b>Linolsäure</b>      | 2''      | 2,21                          |
|                        | 3''      | 1,50                          |
|                        | 4''      | 1,16                          |
|                        | 8''      | 1,96                          |
|                        | 9''      | 5,25                          |
|                        | 10''     | 5,25                          |
|                        | 11''     | 2,67                          |
|                        | 12''     | 5,25                          |
|                        | 13''     | 5,25                          |
|                        | 14''     | 1,96                          |
|                        | 15''     | 1,16                          |
|                        | 16''     | 1,16                          |
|                        | 17''     | 1,16                          |
| 18''                   | 0,79     |                               |

## Galactosylcerebroside (Typ1 und 2) (GalCer)

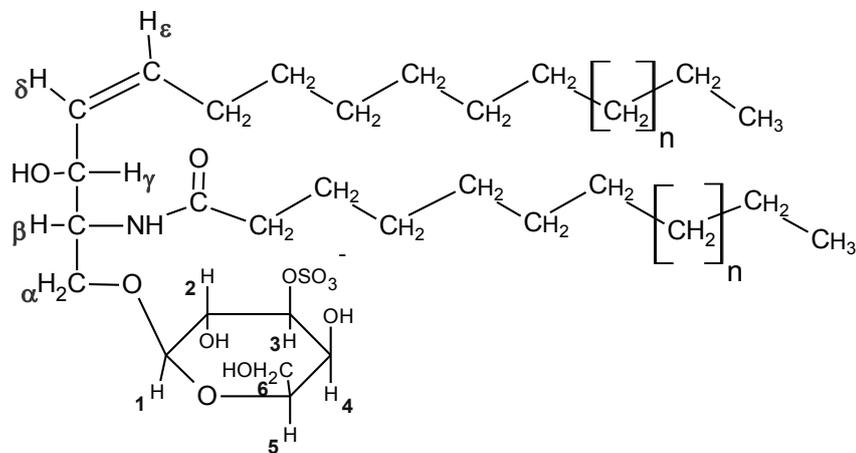
(kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                  | Position          | $\delta^1\text{H}$ [ppm] | $\delta^{13}\text{C}$ [ppm] |
|------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Galaktose</b> | 1                 | 4,20                     | 103,98                      |
|                  | 2                 | 3,51                     | 71,43                       |
|                  | 3                 | 3,86                     | 69,26                       |
|                  | 4                 | 3,48                     | 73,62                       |
|                  | 5                 | 3,50                     | 75,64                       |
|                  | 6                 | 3,72/3,82                | 61,86                       |
| <b>Ceramid</b>   | $\alpha$ (Typ I)  | 3,72/4,07                | 68,72                       |
|                  | $\alpha$ (Typ II) | 3,58/4,16                | 69,02                       |
|                  | $\beta$           | 3,99                     | 53,64                       |
|                  | $\gamma$          | 4,12                     | 72,15                       |
|                  | $\delta$ (Typ I)  | 5,44                     | 129,16                      |
|                  | $\delta$ (Typ II) | 5,44                     | 129,52                      |
|                  | $\epsilon$        | 5,71                     | 134,73                      |
|                  | $\epsilon-1$      | 2,01                     | 32,62                       |

Sulfatid (S-GalCer)

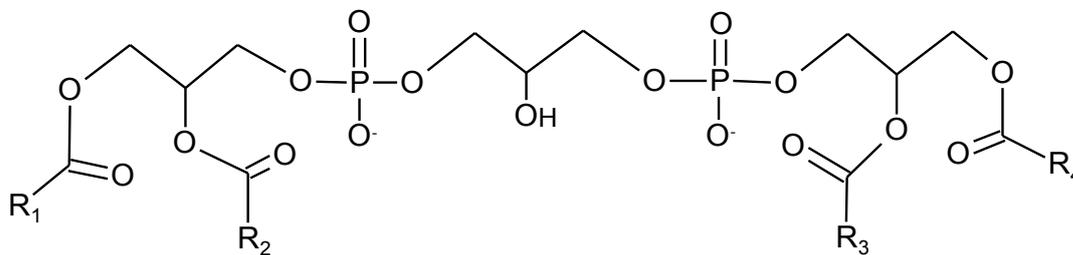
(kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                  | Position      | $\delta^1\text{H}$ [ppm] | $\delta^{13}\text{C}$ [ppm] |
|------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Galaktose</b> | 1             | 4,31                     | 103,81                      |
|                  | 2             | 3,73                     | 69,80                       |
|                  | 3             | 4,23                     | 80,85                       |
|                  | 4             | 4,24                     | 67,93                       |
|                  | 5             | 3,54                     | 75,20                       |
|                  | 6             | 3,82/3,74                | 61,94                       |
| <b>Ceramid</b>   | $\alpha$      | 4,21/3,57                | 69,16                       |
|                  | $\beta$       | 3,96                     | 53,65                       |
|                  | $\gamma$      | 4,12                     | 72,26                       |
|                  | $\delta$      | 5,44                     | 129,72                      |
|                  | $\epsilon$    | 5,68                     | 134,69                      |
|                  | $\epsilon$ -1 | 2,01                     | 32,65                       |

Cardiolipin (CL)

(kalibriert auf TSP 0,00 ppm)



|                             | Position | $\delta^1\text{H}$ [ppm] | $\delta^{13}\text{C}$ [ppm] |
|-----------------------------|----------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Phosphatidylglycerol</b> | 1        | 4,40/4,18                | 62,88                       |
|                             | 2        | 5,22                     | 70,91                       |
|                             | 3        | 3,96                     | 63,75                       |
|                             | 4        | 3,90                     | 66,66                       |
|                             | 5        | 3,90                     | 70,33                       |
| <b>Ölsäure</b>              | 2'       | 2,22                     | 37,02                       |
|                             | 3'       | 1,47                     | 26,65                       |
|                             | 4'       | 1,20                     | 30,34                       |
|                             | 8'       | 1,91                     | 27,42                       |
|                             | 9'       | 5,32                     | 128,33                      |
|                             | 10'      | 5,34                     | 130,36                      |
|                             | 11'      | 1,91                     | 27,42                       |
|                             | 16'      | 1,16                     | 31,75                       |
|                             | 17'      | 1,16                     | 22,81                       |
| 18'                         | 0,78     | 14,24                    |                             |

A-3  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren einiger Phospholipidgemische

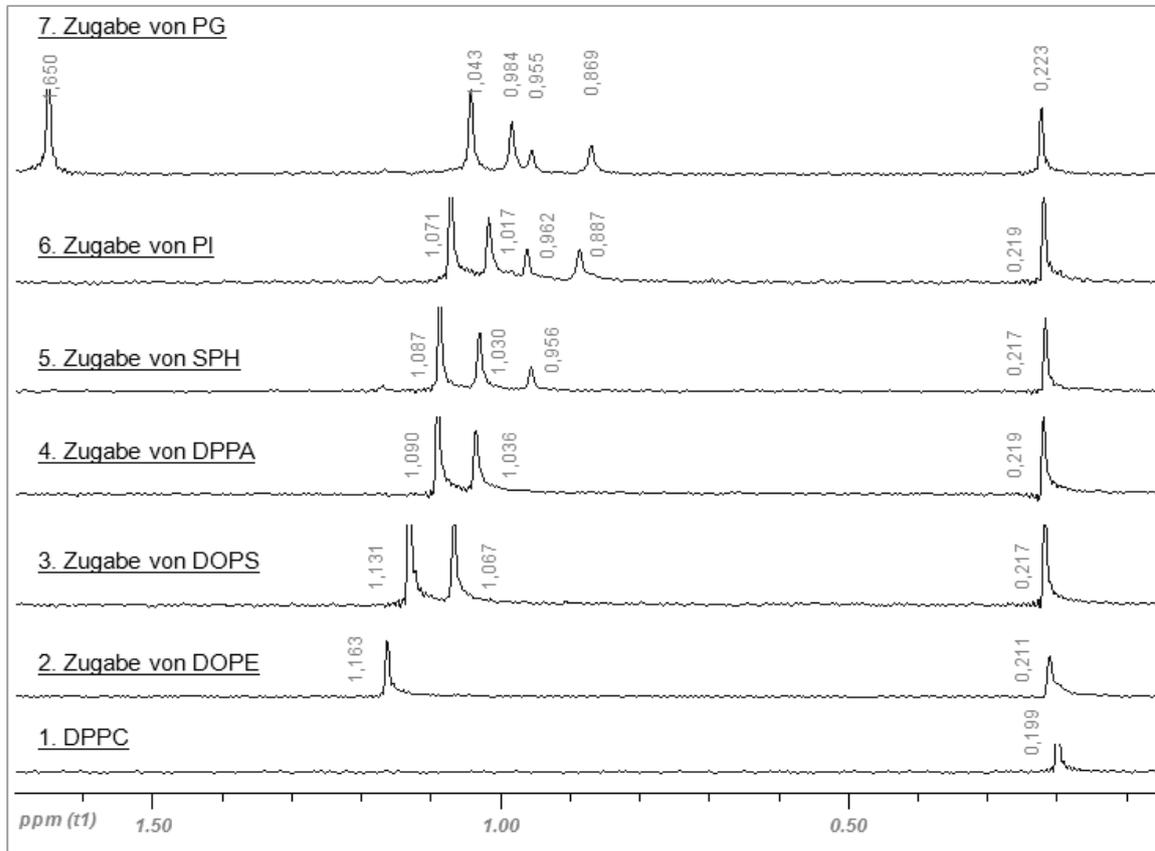


Abb. A-2:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineherz.

A-4  $^1\text{H-NMR}$  Spektren<sup>2</sup> der Fraktionen aus verschiedenen Gewebearten

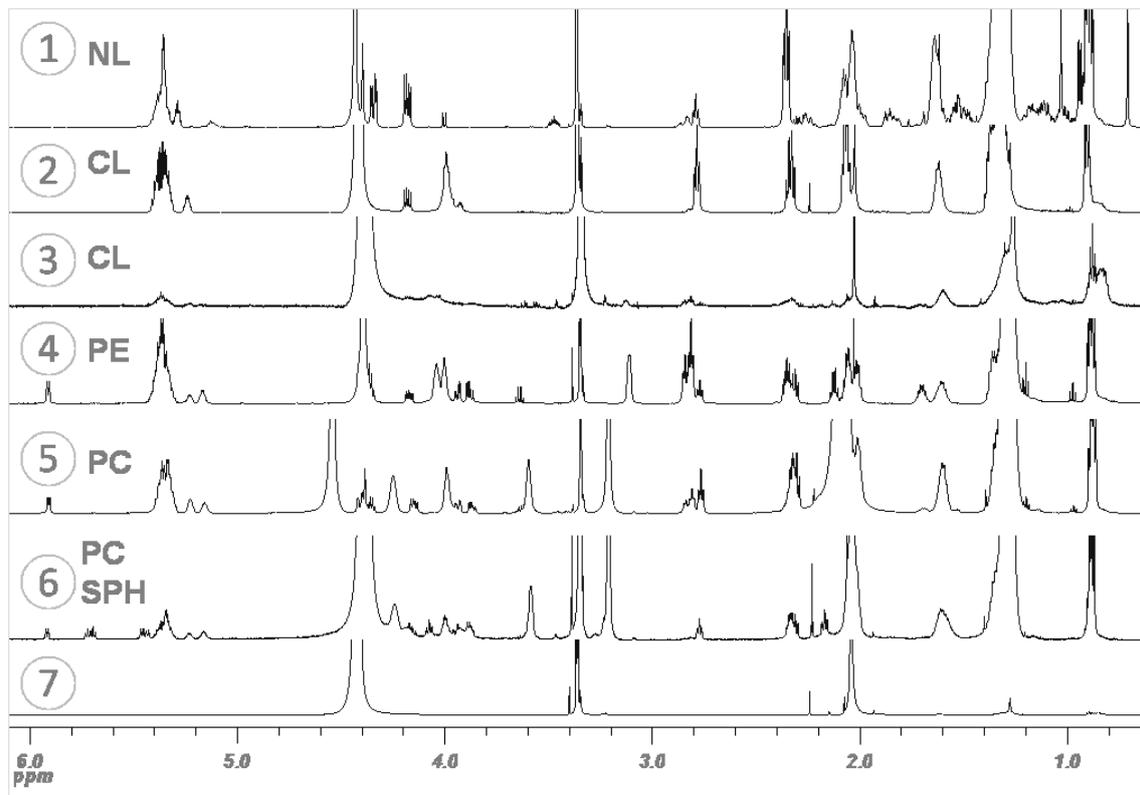


Abb. A-3:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineherz.

---

<sup>2</sup> Eine detaillierte Spektrensammlung ist der beigefügten Daten-CD (nach Kapiteln geordnet) zu entnehmen.

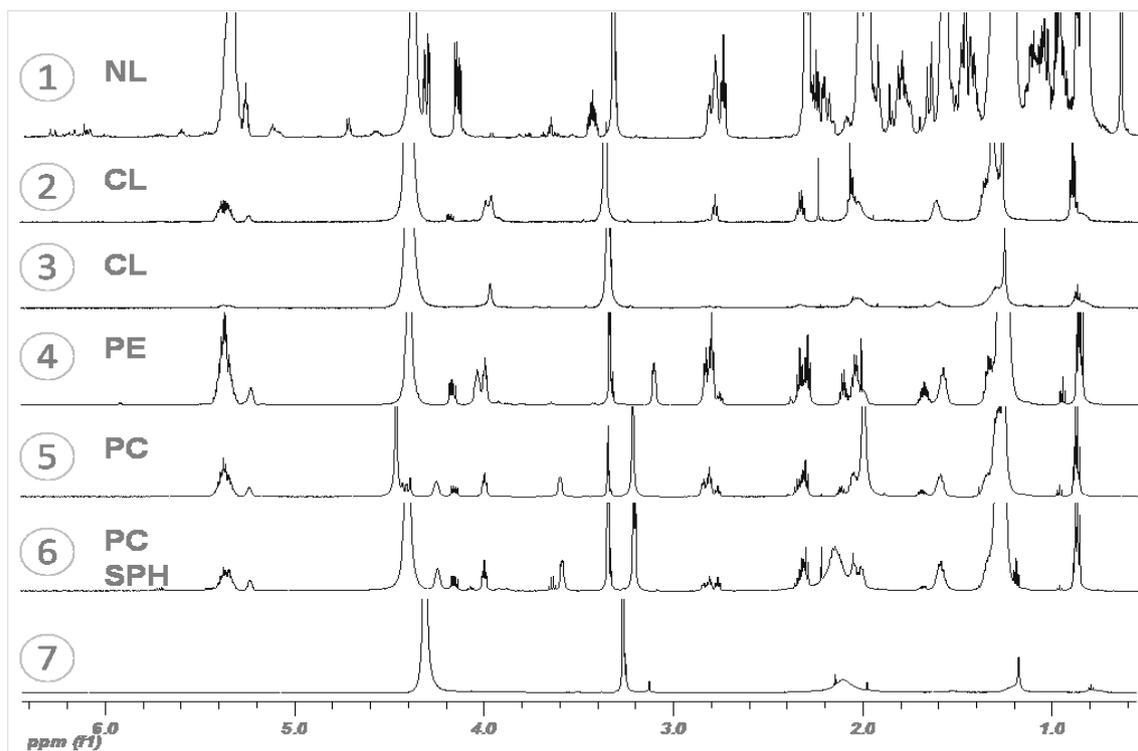


Abb. A-4:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineleber.

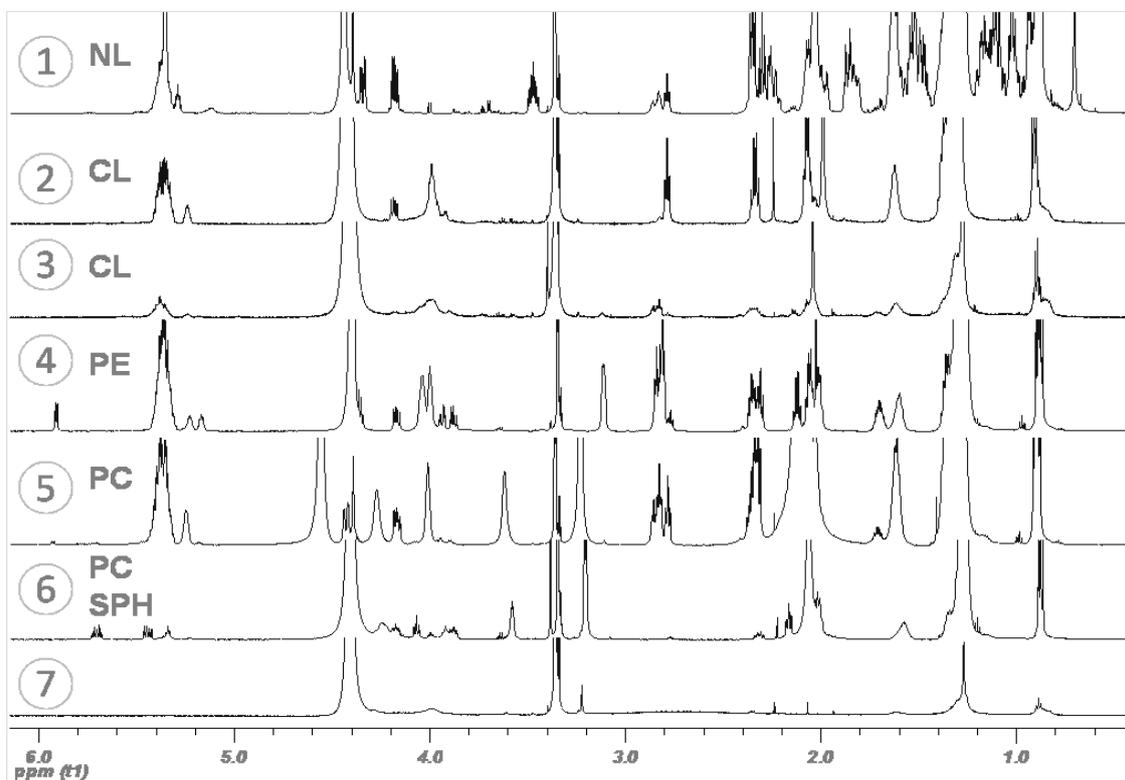


Abb. A-5:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der sieben Fraktionen aus Schweineniere.