

# **ABSCHLUSSBERICHT DES FORSCHUNGSPROJEKTES**

## **LASERFLUGZEITMASSENSPEKTROMETRIE ZUR CHARAKTERISIERUNG VON LIPIDEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON PFLANZENÖLTRIACYLGLYCEROLEN**

**PROJEKTNR. 1163**

**AO. UNIV. PROF. DR. MAG. GÜNTER ALLMAIER**  
Institut für Analytische Chemie der Universität Wien,  
Währinger Str. 38, A-1090 Wien

Unter Mitarbeit von  
**Mag. Gerald Stübiger**

# INHALT

<b>BEGRIFFE UND ABKÜRZUNGEN</b>	4
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	8
<b>SUMMARY</b>	10
<b>1. EINLEITUNG</b>	12
1.1 Fette und Öle	12
1.2 Chemische Strukturen wichtiger Lipidklassen	16
<b>2. ERGEBNISSE DER MATRIXUNTERSUCHUNGEN FÜR MALDI-MS VON LIPIDEN</b>	21
2.1 Triacylglycerole (TAG)	21
2.2 Andere Lipidklassen	23
<b>3. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN VON PFLANZENÖLEN</b>	31
3.1 „Ölscreening“ mittels MALDI-MS	31
3.2 Bestimmung der TAG-Zusammensetzung von Pflanzenölen mittels HPLC und MS	41
3.3 Quantitative Aspekte	51
<b>4. STRUKTURCHARAKTERISIERUNG VON LIPIDEN MITTELS MALDI-MS</b>	55
4.1 „Post Source Decay“ (PSD)-Fragmentationenanalyse von TAGs	55
4.2 PSD Fragmentationenanalyse von Phospho (PLs)- und Glykolipiden (GLs)	58
<b>5. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN VON LIPIDGEMISCHEN</b>	64
5.1 Untersuchung von Lipidmischungen (Bsp. Sojalecithin) mittels MALDI-MS und Dünnschichtchromatographie (DC)	64
5.2 Analyse von Humanlipidproben mittels DC/MALDI-MS und PSD-Fragmentationenanalyse	73
<b>6. LITERATUR</b>	81
<b>ANHANG (TABELLEN )</b>	

## **DANKSAGUNGEN**

Univ. Prof. Dr. Kurt Widhalm (Universitäts-Kinderklinik, Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien) danken wir für die kostenlose Bereitstellung der humanen Lipidproben und Dr. Walter Welz (Goreon, Wels) für die Fettsäuremethylesteranalysen.

# BEGRIFFE UND ABKÜRZUNGEN

**Atmospheric Pressure Chemical Ionization:** APCI. Sprayionisationstechnik, bei der die Ionisation der Analyten durch chemische Reaktion mit Reaktandgasen (meist aus dem gleichzeitig verdampften Lösungsmittel), die durch elektrische Entladung generiert werden, erfolgt.

**C-Anzahl:** Anzahl der Kohlenstoffatome in Fettsäuren.

**C-Kette:** Kette von Kohlenstoffatomen in Fettsäuren oder anderen Lipiden. Meist durch Einfach- oder Doppelbindungen miteinander verbunden.

**Collision Induced Dissociation:** CID. Fragmentierungsprozess, der durch Kollision der Analyten mit Gasmolekülen (z.B. Helium oder Argon) im Massenspektrometer eingeleitet wird.

**Curved-Field Reflektron:** Reflektron-Analysator mit einem nichtlinearen Spannungsverlauf. Ermöglicht die Fokussierung und simultane Detektion aller PSD-Fragmentationen in einem Messvorgang. (engl. Synonym dafür: seamless PSD)

**Dünnschichtchromatographie:** DC. Planare chromatographische Trenntechnik bei der eine polare Stationäre Phase eingesetzt wird.

**Electrospray Ionization:** ESI. Sprayionisationstechnik, bei der die in Lösung ionisierten Analyten durch Verdampfung der neutralen Lösungsmittelmoleküle in die Gasphase transferiert werden.

**Grenzenergie:** Energiemenge die für die Fragmentierung eines Ions in der Gasphase notwendig ist

**In-Source Fragmente:** Fragmentationen, die aus einem Zerfall bereits in der Ionenquelle resultieren. Sie stammen aus nur sehr kurzlebigen Molekülionenspezies.

**Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization:** MALDI. Sekundärionenmassenspektrometrische Technik, bei der die Desorption und Ionisation der Analyten durch Beschuss, der in einer Matrix eingelagerten Analyten, mittels eines Laserstrahls erfolgt.

**Metastabiler Zerfall:** siehe PSD

**MS/MS Experiment:** Ein Mutterion (Vorläuferion; kann ein Molekülion oder Fragmention) wird mit Hilfe eines massenspektrometrischen Analysators selektiert, einer CID Fragmentierung unterworfen und die entstehenden Tochterionen (Produktion; Fragmentionen) mittels eines weiteren Analysators aufgetrennt. Benötigt wird dafür grundsätzlich die Kombination von zwei (oder mehr) Analysatoren (Synonym: Tandem MS). Im Fall von „in-source“ Fragmentation, können die gebildeten Produktionen mittels eines einzelnen Analysatoranteiles aufgetrennt werden.

**Neutral Loss:** Abspaltung eines nicht geladenen (neutralen) Fragments (Teilchens), das im Massenspektrometer nicht detektiert wird.

**Online-Kopplung:** Direkte Verbindung zwischen einem Trennsystem (z.B. HPLC) und einem Massenspektrometer. Optimale Kopplungseigenschaften sind bei den Sprayionisationsmethoden (ESI und APCI) gegeben.

**Produktion:** Fragmention, welches einem definierten (selektierten) Vorläufer- oder Mutterion (z.B. Molekülion) zugeordnet werden kann.

**Post Source Decay:** PSD. Bildung von Fragmentionen außerhalb der Ionenquelle. Sie stammen aus metastabilen Ionen, die in der feldfreien Flugstrecke des TOF-Analysators ohne zusätzliche Energiezufuhr zerfallen.

**$R_{FWHM}$ :** Dimensionsloser Wert, der die Auflösung (Resolution, R) für ein Einzelsignal auf halber Peakhöhe (Full Width at Half Maximum) angibt. Typische Angabe der Auflösung eines TOF-Analysators.

**Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography:** RP-HPLC. Flüssigchromatographische Trenntechnik bei der eine apolare Stationäre Phase (C<sub>18</sub>-Säulen) mit einem polaren Eluens eingesetzt wird.

**Threshold Energie:** Die Laserenergiemenge in der MALDI Massenspektrometrie die benötigt wird um intakte Molekülonen im Hochvakuum zu bilden.

**Sprayionisationstechniken:** siehe ESI und APCI

**Vorläuferion** siehe Produktion

**Weiche Ionisierungsmethoden:** Gruppe von Desorption/Ionisationstechniken in der Massenspektrometrie, die sich dadurch auszeichnen, dass intakte Molekülonen von polaren, thermolabilen und hochmolekularen Probenmolekülen generiert werden können. Dazu zählen vor allem ESI, APCI und MALDI.

**CHCA:**  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylzimtsäure

**Co-UFP:** Ultrafeine Kobaltpartikel (Teilchendurchmesser 20nm)

**CMBT:** 5-Chloro-2-Mercaptobenzothiazol

**DHAP:** 2,6-Dihydroxyacetophenon

**DHB:** 2,5-Dihydroxybenzoesäure

**DMPE:** Dimethylphosphatidylethanolamin

**FA:** Fettsäure (Fatty acid)

**MMPE:** Monomethylphosphatidylethanolamin

**MS:** Massenspektrometrie

**PC:** Phosphatidylcholin

**PDMS:** Plasma-Desorption Massenspektrometrie

**PE:** Phosphatidylethanolamin

**PG:** Phosphatidylglycerin

**S/N:** Signal zu Rausch Verhältnis

**TAG:** Triacylglycerol oder Triglycerid

**THAP:** 2,4,6-Trihydroxyacetophenon

**TiN:** Titannitridpartikel (Teilchendurchmesser 35nm)

# ZUSAMMENFASSUNG

Lipide erfüllen viele, wichtige Zellfunktionen wie z.B. als Energiespeicher (Triglyceride), Strukturkomponenten (Glycerophospho- und Glykolipide) und Signaltransduktoren (Diglyceride, Sphingosine und Ceramide). Biologische Proben enthalten meist eine komplexe Mischung aus strukturell sehr unterschiedlichen Lipiden. Die Zusammensetzung dieser Moleküle spielt eine entscheidende Rolle in normalen Zellfunktionen und wird von verschiedensten Faktoren beeinflusst. Fette und Öle aus der pflanzlicher Nahrung stellen eine wesentliche Quelle von Lipiden in der menschlichen Ernährung dar.

Das Ziel dieser Studie war die strukturelle Charakterisierung verschiedenster Lipidklassen, einerseits aus pflanzlichen fetten Ölen (die zur humanen Ernährung dienen) und andererseits aus humanen Plasmaproben, mittels ESI- sowie APCI-Massenspektrometrie (MS) und insbesondere MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie als zentrale Analysenmethode. Aufgrund der einfachen Anwendbarkeit, können diese massenspektrometrischen Techniken als universelle Analysentechniken für Lipide eingesetzt werden. Ein wesentlicher Teil dieser Studie befasste sich mit der Ausarbeitung einer für Lipide geeigneten MALDI-MS Probenpräparation. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden dabei verschiedenste Matrixsysteme für ihre Anwendbarkeit in der Lipidanalyse evaluiert. In der Analyse von Triacylglycerolen (TAGs) aus pflanzlichen Ölen wurde erstmals ein flüssiges, binäres Matrixsystem bestehend aus Natriumhexacyanoferrat(II)/Glycerin erfolgreich eingesetzt. Ein entscheidender Vorteil gegenüber allen anderen untersuchten Matrices war dabei die exklusive Generierung von  $[M+Na]^+$  Molekülionen, was vorallem die Analyse von komplexen TAG Mischungen sehr vereinfacht. In der Analyse von unaufgetrennten pflanzlichen Ölen konnten ölspezifische TAG Muster eindeutig nachgewiesen werden. Es wurden dabei folgende, ernährungsrelevanten Öle untersucht und deren charakteristisches TAG Muster, schnell und hochempfindlich, bestimmt: Rapsöl, Kürbiskernöl, drei Sorten von Sonnenblumenkernöl, Haselnußöl, Olivenöl, Sojaöl und Macadamianußöl. Die PSD Fragmentationanalyse von selektierten TAG Molekülionen ermöglichte dabei die eindeutige Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung aufgrund spezifischer Fragmentationen. Diese lieferten Informationen sowohl über die Kettenlänge, als auch den Sättigungsgrad der Fettsäurereste. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der MALDI Massenspektren, war nicht nur ein qualitativer sondern auch ein semiquantitativer Nachweis der TAGs



in den verschiedenen Pflanzenölen möglich. Eine online Analyse, basierend auf einer Auftrennung der TAGs mittels RP-HPLC und anschließender Sprayionisation, ermöglichte den Nachweis der einzelnen TAGs (einschließlich zahlreicher Nebenkomponenten) in allen untersuchten Pflanzenölen. Dabei zeigte sich, dass die eingesetzten „weichen“ Ionisierungsmethoden, Sprayionisation (ESI und APCI) und MALDI, komplementäre Informationen liefern und unterschiedliche Qualitäten aufweisen. MALDI zeigte die höchste absolute Nachweisempfindlichkeit, wohingegen die Sprayionisationstechniken die meisten Strukturinformationen liefern konnten. Der quantitative Vergleich der TAG Zusammensetzung von unaufgetrennten pflanzlichen Ölen zwischen ESI und MALDI Technik ergab übereinstimmende Daten.

Bei der MALDI-MS Untersuchung der anderen unterschiedlichen Lipidklassen zeigte sich, dass 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) als eine universelle Matrix im Lipidbereich eingesetzt werden kann. Dabei konnten besonders Glycerophospho- (GPLs), Sphingo- (SLs) und Glycolipide (GLs) mit höchster Sensitivität nachgewiesen werden. Weiters konnte gezeigt werden, dass THAP besonders gut für Alkalisalzdotierungsexperimente geeignet ist, wodurch die Komplexität der MALDI Massenspektren im Detektionsmodus für positive Ionen wesentlich verringert werden konnte. Dies ist besonders ein Vorteil bei der Untersuchung von komplexen Lipidmischungen (z.B. humane Plasmalipidproben). Mittels PSD-Fragmentationsanalyse dieser Alkaliaddukte konnte eine Bestimmung der Klassenzugehörigkeit der verschiedenen Phospholipide durchgeführt werden. Zusätzlich konnte die Stellung der Acylsubstituenten (sn-1( $\gamma$ ) und sn-2( $\beta$ ) Position) am Glycerin aufgrund von Intensitätsunterschieden der entsprechenden Fragmentationen bestimmt werden. Dabei konnte eine bevorzugte Abspaltung der Fettsäuren aus sn-1 Position beobachtet werden, was eine Identifizierung von stellungsisomeren Molekülen möglich macht. In der Analyse von komplexen Lipidfraktionen aus humanem Serum ist die chromatographische Auftrennung der unterschiedlichen Lipidklassen eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Charakterisierung der Einzelkomponenten der jeweiligen Klassen. Dabei stellte sich als ideale Strategie, die Lipidklassentrennung mittels Dünnschichtchromatographie, die anschließende Mikroextraktion und die nachfolgende MALDI-MS Analyse heraus. Sowohl qualitative als auch semiquantitative Aussagen über die einzelnen Lipidklassen (isoliert aus Humanblut) konnte gemacht werden. etabliert werden. Somit konnte eine wenig aufwendige, hochsensitive und rasche Methode zur Untersuchung von komplexen Lipidmischungen in Humanblut etabliert werden.

## SUMMARY

Lipids play a major role as energy reservoir and storage molecules (triacylglycerols) as well as important structural components (glycerophospho- and glycolipids) and second messengers (1,2-diacylglycerol, inositol-1,4,5-trisphosphate, sphingosine and ceramide) in eucaryotic cells. Biological samples usually contain a complex mixture of lipids exhibiting a wide range of structural characteristics. The structure and composition of these molecules plays an essential role in normal cell functions and is mainly influenced by environmental and endogenous factors. Particularly, dietary fats and oils serve as the main source of lipids in human nutrition. The aim of this study was the structural characterization of different lipid classes using spray ionization mass spectrometric techniques (ESI and APCI) and particularly MALDI mass spectrometry as central technique. Especially the simplicity and speed are one of the main advantages of these analytical techniques, which can therefore be considered as universal tools in lipid analysis.

A main part of this study was concerned with the development of MALDI sample preparation procedures for lipids. During the investigations several matrix systems were evaluated for their usefulness in the analysis of various lipid classes. For the analysis of triacylglycerols (TAGs) from complex plant oils a binary, liquid matrix system consisting of sodiumhexacyanoferrat(II)/glycerol turned out to be the MALDI matrix of choice in any respect (sensitivity, simplicity of handling etc.). This matrix system generated predominantly  $[M+Na]^+$  ions and furthermore a high reproducibility of the mass spectra was observed. Characteristic TAG profiles of different oils could be obtained and a comparison with the pattern of other plant oils was easily feasible. The following nutrition-relevant plant oils were analyzed and compared: rapeseed oil, Styrian pumpkin seed oil, three varieties of sunflower oil, hazelnut oil, olive oil, soya oil und macadamianut oil. PSD fragment ion analysis of selected sodiated molecular ions exhibit characteristic fragment ions resulting mainly from the loss of the acyl groups. The PSD data could be used to determine the fatty acid chain length and the degree of unsaturation. The good reproducibility of the MALDI MS data made a relative quantitation of TAGs from different plant oils possible. The online combination of RP-HPLC separation and spray ionization techniques made a characterization of the complex TAGs mixtures (including minor components) from plant oils possible. Our investigations showed, that the "soft" ionization techniques, generate complementary information. MALDI MS provided the highest sensitivity, whereas spray ionization MS (APCI and ESI) provided the highest amount of

structural information. The relative TAG distribution within the unseparated plant oils was consistent for the ESI and MALDI MS analysis.

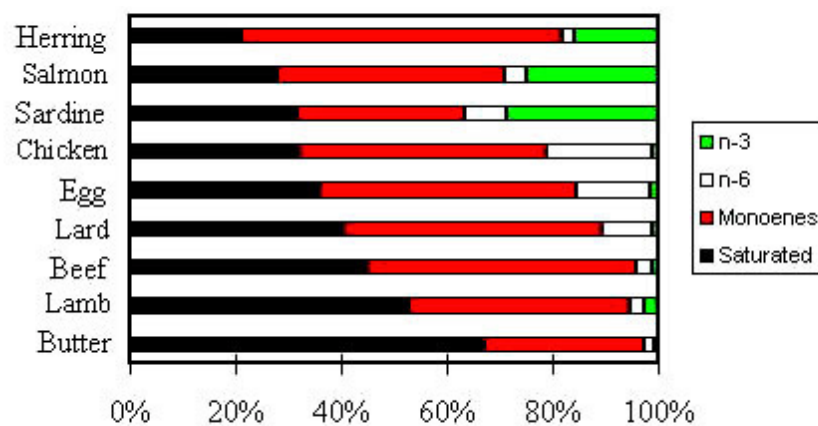
For the MALDI MS analysis of the other lipid classes, in contrast to TAGs, the solid organic MALDI matrix 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) turned out to be generally applicable. Particularly, glycerophospholipids (GPLs), sphingolipids (SLs) and glycolipids (GLs) could be recorded on THAP matrix with high sensitivity. Furthermore the neutral chemical nature of THAP favours its use for doping experiments with different alkali salts. Thereby predominant molecular ions (mainly di- or trisodiated molecules) could be generated from different lipid classes, leading to MALDI mass spectra with considerably reduced complexity. This is advantageous especially in the analysis of complex lipid mixtures (e.g. human plasma lipid fraction). By means of PSD fragment ion analysis it was possible to characterize all phospholipid classes based on the generation of informative fragment ions. Members of the different phospholipid classes could be distinguished due to characteristic fragments from the polar head groups. Additionally, information about the position of fatty acids (FAs) on the glycerol backbone (sn-1( $\gamma$ ) and sn-2( $\beta$ ) position) was obtained. Due to the preferred cleavage of FAs in sn-1 position, a differentiation between positional isomers was possible.

For the analysis of complex human serum lipid mixtures, a chromatographic separation step for the different lipid classes turned out to be a requirement for a successful characterization of the individual species of the different lipid classes. Our investigations showed, that the separation by means of thin layer chromatography, followed by microextraction of the particular lipid class and subsequent MALDI-MS analysis can serve as a fast and sensitive method (qualitative and semi-quantitative analysis) in the analysis of all lipid classes present in human plasma.

# 1. EINLEITUNG

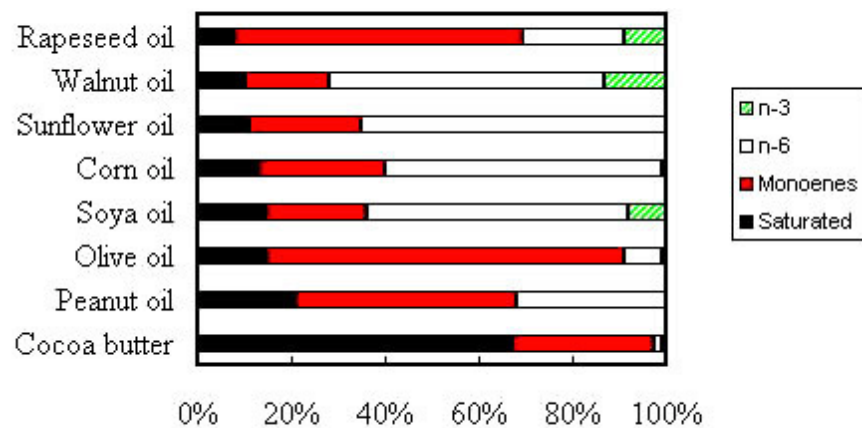
## 1.1 Fette und Öle

Fette und Öle stellen neben Proteinen und Kohlenhydraten, eine Hauptgruppe von Nährstoffen in der menschlichen Ernährung dar. Lipide werden hauptsächlich in Fleisch, Milchprodukten und pflanzlichen Fetten und Ölen gefunden. Die Hauptquellen in Pflanzen stellen dabei Samen und Nüsse dar (z.B. Sojabohnen, Oliven, Erdnüsse, Sonnenblumensamen, usw.). Fette sind essentielle Komponenten unserer Ernährung und erfüllen verschiedenste Aufgaben im menschlichen Stoffwechsel. Sie dienen primär als Energiereservoir, transportieren andere Nährstoffe (z.B. Vitamine und andere fettlösliche Substanzen), schützen die inneren Organe, helfen die Körpertemperatur zu regeln und sind die universellen Bestandteile der Zellmembranen. Trotzdem sind viele Probleme wie, Übergewicht, Gefässerkrankungen und Arteriosklerose oder bestimmte Formen von Krebs mit einer übermäßigen Zufuhr von Nahrungsfetten verbunden (1 - 3). Gesättigte Fette können hauptsächlich in tierischen Geweben gefunden werden und enthalten TAGs mit überwiegend gesättigten FAs (Abb.1).



**Abb.1** Fettsäurezusammensetzung tierischer Triglyceride (Quelle: Cyberlipid, [www.cyberlipid.org/](http://www.cyberlipid.org/).) Schwarz: gesättigt, Rot: einfach-ungesättigt, Grün und Weiss: mehrfach-ungesättigt ( $\omega$ -3 und  $\omega$ -6).

In Gegensatz zu Pflanzen können hier hauptsächlich gesättigte oder einfach-ungesättigte FAs, sowie auch FAs mit ungerader C-Anzahl oder verzweigten C-Ketten gefunden werden. Pflanzliche Fette enthalten im Gegensatz dazu meistens ungesättigte Fette (Ausnahmen: Kokos- und Palmöl), die eine flüssige Konsistenz bei Zimmertemperatur aufweisen (Öl) und empfindlich gegen Licht-, Hitze-, und Sauerstoffeinwirkung reagieren. Sie enthalten meistens TAGs mit ein- oder mehrfach-ungesättigten FAs (Abb.2). Olivenöl ist ein Beispiel für ein einfach-ungesättigtes Öl, das hauptsächlich Ölsäure enthält. Mehrfach ungesättigte FAs, wie z.B. Linol- und Linolensäure können in höherer Konzentration in Distel- (Saflor), Soja-, Erdnuss-, oder Baumwollsaamenöl gefunden werden (4, 5).



**Abb.2** Fettsäurezusammensetzung pflanzlicher Triglyceride (Quelle: Cyberlipid, [www.cyberlipid.org/](http://www.cyberlipid.org/)) Schwarz: gesättigt, Rot: einfach-ungesättigt, Grün und Weiss: mehrfach-ungesättigt ( $\omega$ -3 und  $\omega$ -6).

Die entscheidenden Strukturkomponenten von Lipiden stellen die FAs dar (Tab.1). Besonders die in pflanzlichen Ölen enthaltenen essentiellen FAs (EFAs) können im menschlichen Körper nicht synthetisiert werden und somit nur aus der Nahrung aufgenommen werden. Es handelt sich dabei um mehrfach-ungesättigten FAs, wie z.B. Linol (18:2 n-6)-, Linolen (18:3 n-3)-, und Arachidonsäure (20:4 n-6). Linol- und Linolensäure stellen auch die Vorläufer für die Synthese von Prostaglandinen dar. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von hormonähnlichen Substanzen, die eine wichtige Rolle bei

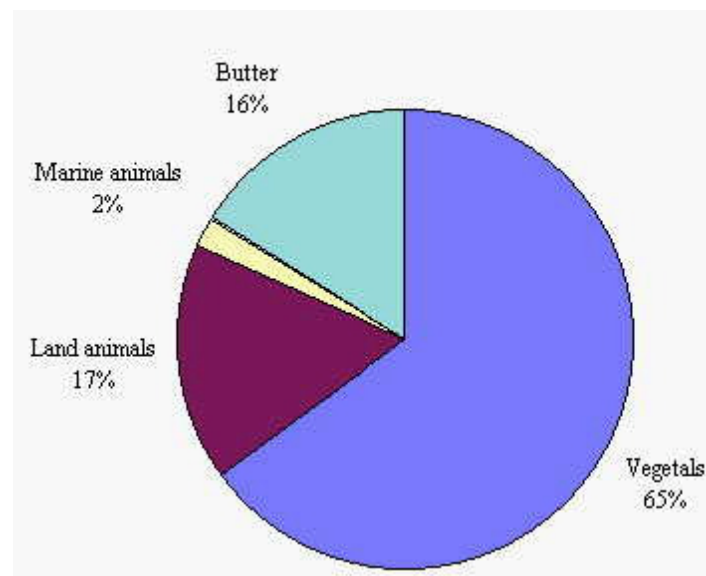
der Regulation von inflammatorischen Prozessen spielen. Erdnuss-, Oliven- und Rapsöl sind wichtige Quellen von einfach-ungesättigten (n-9) FAs, wie z.B. Ölsäure (18:1 n-9). Soja-, Sonnenblumensamen-, oder Walnussöl enthalten hohe Mengen an Linolsäure, während Raps-, Flachs-, Kürbiskern- oder Sojaöl höhere Anteile an Linolensäure enthalten (6). Rapsöl enthielt ursprünglich hohe Mengen (bis 50%) an Erucasäure (22:1 n-9) und wurde hauptsächlich in der Ölchemie benutzt. Untersuchungen zeigten, dass Erucasäure gefäßschädigende Wirkungen hat und daher konnten erst Rapszüchtungen, wie sie heute im Handel sind, mit niedriger Erucasäurekonzentration im Öl für Nahrungszwecke verwendet werden.

<b>Systematischer Name*</b>	<b>Trivialname</b>	<b>Kode</b>	<b>Kurzbezeichnung*</b>	<b>Molekulargewicht (durchschnittl.)</b>
Tetradecansäure	<b>Myristin-säure</b>	<b>M</b>	<b>14:0</b>	228.4
Hexadecansäure	<b>Palmitin-</b>	<b>P</b>	<b>16:0</b>	256.4
cis-9-Hexadecensäure	<b>Palmitolein-</b>	<b>Po</b>	<b>16:1(n-7)</b>	254.4
Heptadecansäure	<b>Margarin-</b>	<b>Ma</b>	<b>17:0</b>	270.4
Octadecansäure	<b>Stearin-</b>	<b>S</b>	<b>18:0</b>	284.4
cis-9-Octadecensäure	<b>Öl-</b>	<b>O</b>	<b>18:1(n-9)</b>	282.4
9,12-Octadecadiensäure	<b>Linol-</b>	<b>L</b>	<b>18:2(n-6)</b>	280.4
9,12,15-Octadecatriensäure	<b>α-Linol-</b>	<b>α-L</b>	<b>18:3(n-3)</b>	278.4
6,9,12-Octadecatriensäure	<b>γ-Linolen-</b>	<b>γ-Ln</b>	<b>18:3(n-6)</b>	278.4
Eicosansäure	<b>Arachin-</b>	<b>A</b>	<b>20:0</b>	312.5
cis-9-Eicosensäure	<b>Gadolin-</b>	<b>G</b>	<b>20:1(n-11)</b>	310.5
5,8,11,14-Eicosatetraensäure	<b>Arachidon-</b>	<b>Ar</b>	<b>20:4(n-6)</b>	304.5
Docosansäure	<b>Behen-</b>	<b>B</b>	<b>22:0</b>	340.5
Tetracosansäure	<b>Lignocerin-</b>	<b>L</b>	<b>24:0</b>	368.6

cis-15-Tetracosensäure	<b>Nervon-</b>	<b>N</b>	<b>24:1(n-9)</b>	366.6
4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	<b>DHS</b>		<b>22:6(n-3)</b>	328.6

**Tab.1** Häufig in pflanzlichen und tierischen Fetten vorkommende Fettsäuren.  
\*Nomenklatur siehe IUPAC ([www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/](http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/))

Die globale Ölsamenproduktion erreichte im Jahr 2001 einen Rekord von 319 Millionen Tonnen. Der meiste Teil davon wird dabei für die Extraktion von Speiseölen benutzt. Dabei hat sich der Verbrauch an Pflanzenölen in den Jahren 1980 bis 2000 mehr als verdoppelt und erreichte 76 Millionen Tonnen. In der EU wurden im Jahr 1995 ca. 9 Millionen Tonnen an Fetten und Ölen für Nahrungszwecke verwendet (Abb.3).



**Abb.3** Fettverbrauch in der EU im Jahr 1995 (Quelle: Eurostat, [europa.eu.int/comm/eurostat/](http://europa.eu.int/comm/eurostat/))

Der meiste Teil (ca. 95%) an Fetten und Ölen in der menschlichen Ernährung besteht aus TAGs (siehe 1.2.1.1). Einen wesentlich geringeren Anteil der Nahrungslipide machen dabei Phospholipide (z.B. Lecithin, in hoher Konzentration im Nervengewebe und Gehirn) oder Cholesterin (ein Vertreter

der Sterole) aus. Diese Lipide sind wichtige Bestandteile der Zellmembranen und erfüllen verschiedenste Körperfunktionen. Sie stammen aus dem Sekundärstoffwechsel und leiten sich primär aus den mit der Nahrung aufgenommenen Lipiden ab. Ihre Zusammensetzung wird daher auch stark von unseren Ernährungsgewohnheiten beeinflusst. Eine übermäßige Zufuhr von Fetten (insbesondere TAGs und Cholesterin) ist mit der Zunahme von Körperfett, Übergewicht und der Entstehung von Herz- und Kreislauferkrankungen verbunden. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Reduktion von gesättigten Fetten zugunsten von ein- und mehrfach-ungesättigten FAs in unserer Ernährung, wie sie vor allem in Pflanzenölen zu finden sind, zu einem verminderten Risiko in der Entstehung von Gefäßerkrankungen und Artherosklerose beitragen kann (7 - 9). In der Agrarindustrie werden daher viele Anstrengungen in der Züchtung neuer Ölpflanzen, die den Ansprüchen einer gesünderen Ernährung entsprechen können, unternommen. Änderungen in der Fettsäurezusammensetzung werden dabei primär durch klassische Kreuzungsexperimente und Hybridisierung, aber auch in zunehmendem Mass durch den Einsatz der Gentechnik zu erreichen versucht (10, 11).

## **1.2 Chemische Strukturen wichtiger Lipidklassen**

### **1.2.1 Neutrallipide**

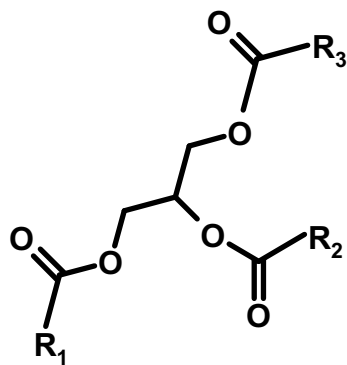
Sie bestehen grundsätzlich aus zwei chemischen funktionellen Gruppen, die beide einen apolaren Charakter aufweisen. Eine der wichtigsten Gruppen von Neutrallipiden sind die Acylglycerole (auch: Glyceride oder Neutralglyceride). Sie stellen Ester von FAs mit Glycerin dar, wobei man je nach dem Veresterungsgrad zwischen Mono-, Di- und Triacylglycerolen unterscheiden kann. Die TAGs stellen dabei die wichtigsten Vertreter der Acylglycerole dar.

#### **1.2.1.1 Triacylglycerole (TAGs)**

TAGs sind Triester von FAs mit Glycerin (Abb.4). Ein Molekül kann dabei entweder einen ( $R_1=R_2=R_3$ ), zwei ( $R_1=R_2, R_3$ ) oder drei ( $R_1, R_2, R_3$ ) unterschiedliche Acylsubstituenten (=Fettsäurereste) enthalten. Diese



bestehen dabei hauptsächlich aus Ketten von 16 bis 24 C-Atomen mit einer unterschiedlichen Anzahl an Doppelbindungen (siehe Tab.1).



$R_1, R_2, R_3 =$   
**Acylreste**

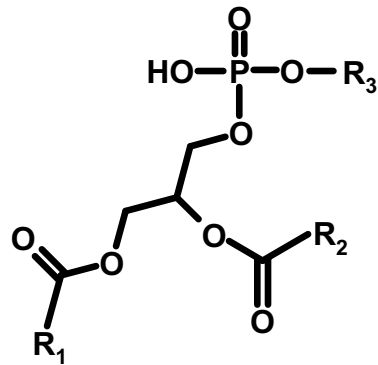
**Abb.4** Chemische Struktur eines Triacylglycerols.

## 1.2.2 Struktur lipide (komplexe Lipide)

Diese enthalten meistens drei oder mehr unterschiedliche chemische funktionelle Gruppen (z.B. Glycerin, FAs, Phosphat, Zucker, eine langkettige Base) und zeigen meist sowohl einen polaren als auch apolaren Charakter. Die drei Hauptgruppen stellen dabei die Glycerophospho-, Sphingo- und Glykolipide dar.

### 1.2.2.1 Glycerophospholipide (GPLs)

GPLs sind Derivate von sn-Glycero-3-phosphorsäure die zumindest eine O-acyl, O-alkyl oder O-alk-1'-enyl-Gruppe am Glycerin tragen, welche den apolaren Teil (die sogenannte Schwanzgruppe) der Moleküle darstellt. An der Phosphatgruppe kann eine stickstoffhaltige Base (Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin), ein zusätzliches Glycerin (Phosphatidylglycerin, Cardiolipin) oder ein Zuckeralkohol (Phosphatidylinositol) verestert vorliegen. Diese stellen den polaren Teil (die sogenannte Kopfgruppe) der Moleküle dar und definieren die einzelnen GPL Klassen (Abb.5)



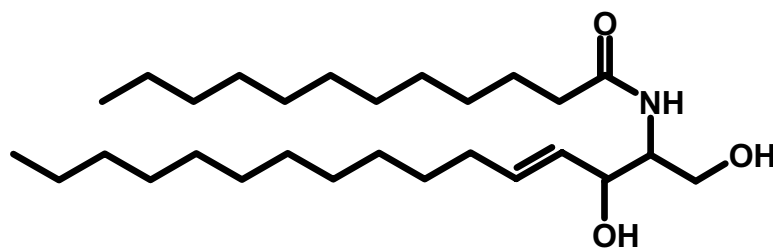
$R_1, R_2 = \text{Acylreste}$

$R_3 = \text{Kopfgruppe Kopfgruppen}$

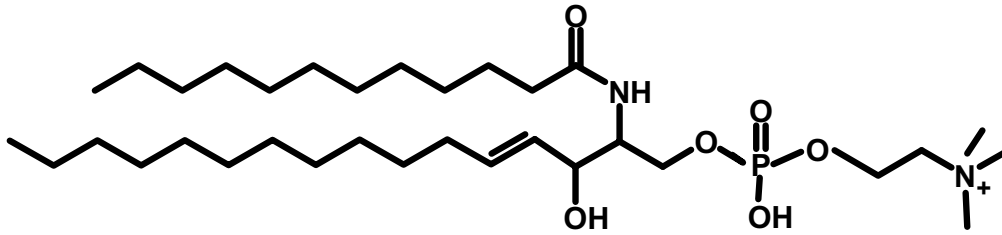
**Abb.5** Chemische Struktur eines Glycerophospholipids.

### 1.2.2.2 Sphingolipide (SLs)

In Sphingolipiden ist ein langkettiger Aminoalkohol (z.B. Sphingosin) einerseits über die primäre Hydroxylgruppe mit Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol und andererseits über die Aminogruppe mit einer FA verbunden (N-acyl oder Amid). Die einfachsten Vertreter sind die Ceramide. Dabei ist der langkettige Aminoalkohol (langkettige Base) mit einer FA verbunden, hat aber eine freie primäre Hydroxylgruppe (Abb.6). Im Fall von Sphingomyelin (SM) besteht die langkettige Base aus Sphingosin, Dihydrosphingosin (bei Tieren) oder Phytosphingosin (in Pflanzen) und ist mit einer Phosphatidylcholingruppe verbunden (Abb.7).



**Abb.6** Chemische Struktur eines Ceramids.



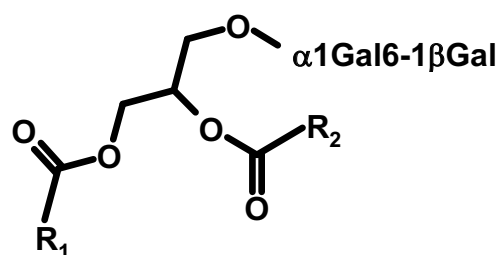
**Abb.7** Chemische Struktur eines Sphingomyelins.

### 1.2.2.3 Glykolipide (GLs)

Glykolipide stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, wobei Oligosaccharideinheiten entweder mit Glycerin (Diacylglycerol), Ceramiden, Sterolen oder in phosphorylierten Polysaccharid-Lipid Komplexen verbunden sind. Auch können Zucker direkt mit einer FA oder einem Fettalkohol verbunden sein. Sehr komplex aufgebaute Lipopolysaccharide finden sich auch in den Zellwänden von Bakterien. Zwei der wichtigsten Gruppen von GLs sind jene die Glycerin oder Ceramide enthalten.

(1) GLs basierend auf Glycerin:

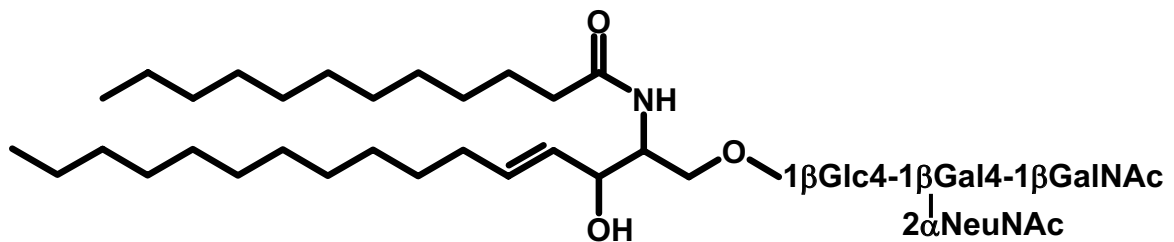
Diese enthalten meistens ein bis drei Zucker die glykosidisch mit Diacylglycerol verknüpft sind (Abb.8). Sie finden sich hauptsächlich in höheren Pflanzen, Algen und Bakterien und sind wesentliche Bestandteile der photosynthetischen Membranen (Chloroplasten). Zwei wichtige Vertreter sind Monogalaktosyl- und Digalaktosyldiacylglycerol (MGDG und DGDG).



**Abb.8** Chemische Struktur eines Digalactosyldiglycerids.

(2) GLs basierend auf Ceramiden:

Es handelt sich dabei um eine sehr variable Gruppe von Glykosphingolipiden. Im menschlichen Organismus sind mehr als 150 Varianten bekannt, wobei 50 davon zur sogenannten „Ganglio“ Gruppe zählen. Diese GLs finden sich hauptsächlich an Zelloberflächen und erfüllen wichtige Aufgaben in der Regulation von Zell-Zell Interaktionen und Kommunikation sowie im Wachstums- und Entwicklungsprozesse des Organismus. Sie können in neutrale und saure Glykosphingolipide (Ganglioside, Sulfatide) unterteilt werden. Ganglioside zeigen dabei die stärksten strukturellen Variationen. Diese Gruppe von Molekülen besteht aus einem Ceramid, welches mit einem Oligosaccharid, bestehend aus Hexosen und einer variierenden Anzahl aus N-Acetylneuraminsäuren (NANA, Sialinsäure), verbunden ist (Abb.9).

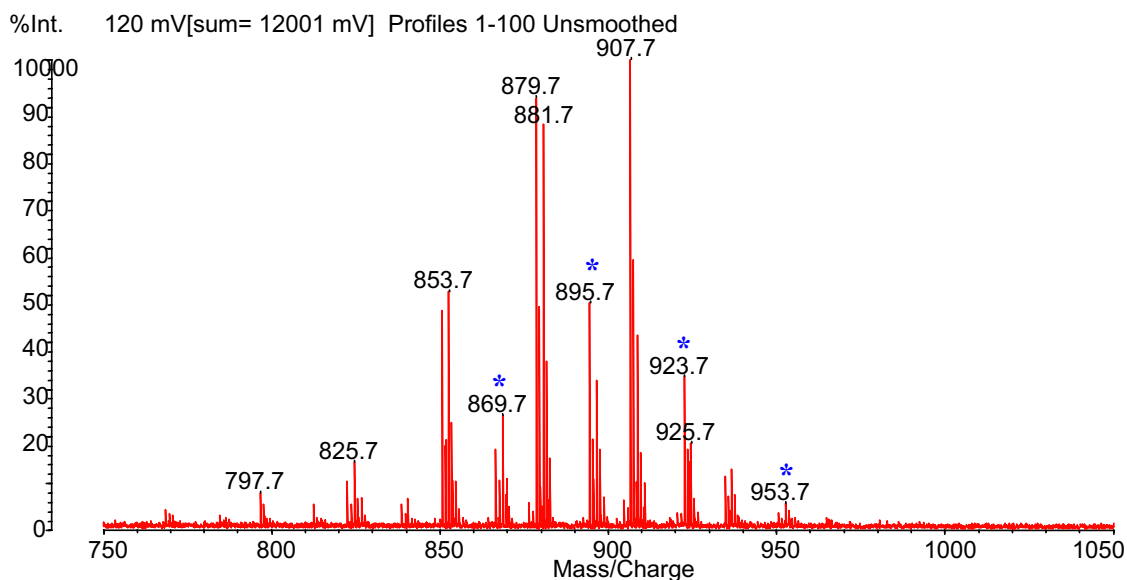


**Abb.9** Chemische Struktur des Gangliosids GM<sub>2</sub>.

## 2. ERGEBNISSE DER MATRIXUNTERSUCHUNGEN FÜR MALDI-MS VON LIPIDEN

### 2.1 Triacylglycerole

In der Suche nach geeigneten Matrixsystemen für die Untersuchung von TAGs aus Pflanzenölen richteten sich unsere Untersuchungen sowohl auf organische und feste Matrices, wie sie üblicherweise für MALDI-MS eingesetzt werden, wie auch auf flüssige Matrixsysteme, die meistens nur für spezifische Applikationen beschrieben wurden. In Bezug auf die Qualität der erzielten MALDI Massenspektren zeigten viele Matrixsysteme nur geringe Signalintensitäten und/oder sehr schlechte Signal-Rausch Verhältnisse (z.B. Dithranol, CMBT, Harmalin oder DHAP), eine verstärkte Molekülionen-fragmentierung (z.B. CHCA) oder die verstärkte Bildung von Alkali- und/oder Matrixaddukten (z.B. Nor-Harman) (siehe Tab.1 Anh.). Die besten Ergebnisse unter den festen Matrices konnten mit DHB und THAP erzielt werden. Besonders THAP zeigte sehr gute Signalempfindlichkeiten, bis in den Femtomolbereich. Der einzige Nachteil war in diesem Fall die verstärkte Ausbildung von Kaliumaddukten, die zu komplexeren Massenspektren führt (Abb.4).

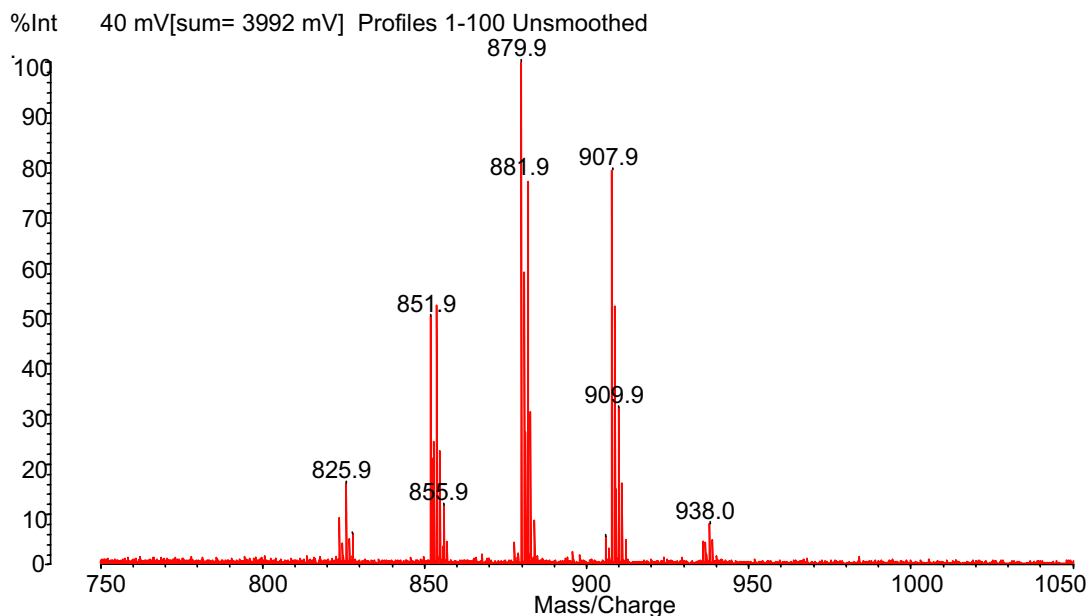


**Abb.4** Positives MALDI-Massenspektrum von Macadamiaöl (20ng) mit THAP Matrix. Die Peaks stellen  $[M+Na]^+$  Ionen dar. Zusätzliche Kaliumaddukte (\*) konnten detektiert werden.

Bei der Untersuchung flüssiger Matrices richteten sich unsere Experimente vor allem auf ein binäres Matrixsystem bestehend aus Natriumhexacyanoferrat(II) und Glycerin, das ursprünglich für die MALDI MS Analyse von hydrophoben Substanzen entwickelt wurde (12). Wie beschrieben, war die Ausbildung eines dünnen Analyt/Matrix Films auf der Targetoberfläche der entscheidende Schritt für eine erfolgreiche Probenpräparation. In Bezug auf die Analyse von TAGs aus komplexen Pflanzenölen wurde eine modifizierte Präparationsmethode entwickelt. Dabei wird ein sehr geringes Matrix- (0.2µl) gefolgt vom Analytenlösungsvolumen (0.3 bis 0.4µl, gelöst in Chloroform) auf das Target aufgetragen. Die rasche Verdampfung der organischen Lösungsmittel führt dabei zu einer unmittelbaren Ausbildung des dünnen Analyt/Matrixfilms („spreading“). Dieser positive Effekt wurde durch die Verwendung von speziellen MALDI Targets aus Edelstahl mit geätzter Oberfläche zusätzlich unterstützt, wobei durch eine Verringerung der Hydrophobizität der Oberfläche die Ausbildung des Films deutlich erleichtert wurde. Es zeigte sich dabei, daß auch ein mehrmaliges Auftragen der Analytenlösung auf dieselbe Matrixpräparation möglich war und zu einem sehr guten Film führte. Dadurch konnte die Probenkonzentration auf dem MALDI Target deutlich erhöht werden. Die erzielten Massenspektren zeigten dabei sehr hohe Signalintensitäten bis in den unteren Pikomolbereich. Dabei konnten gut reproduzierbare Signale während einer hohen Zahl von Laserschüssen erzielt werden. Ein weiterer, wichtiger Vorteil dieses Matrixsystems war die praktisch ausschliessliche Generierung von  $[M+Na]^+$  Molekülonen, die eine eindeutige Differenzierung einzelner TAGs in Mischungen ermöglichte (Abb.5).

Mit anderen flüssigen Matrices konnten keine vergleichbaren, guten Resultate erzielt werden. Mittels Co-UFP und Glycerin (13) konnte eine gute massenspektrometrische Auflösung erreicht werden, allerdings zeigte sich in diesem Fall nur eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit der Massenspektren und auch eine Ausbildung von zusätzlichen Kaliumaddukten. Bedingt durch die geringere Sensitivität dieses Matrixsystems waren deutlich höhere Probenmengen notwendig. Auf einem anderen flüssigen Matrixsystem TiN und Glycerin (14) konnten z.B. überhaupt keine brauchbaren Ergebnisse erzielt werden.

Als MALDI Matrixsystem der Wahl für TAGs in komplexen Ölgemischen und für TAGs als Einzelkomponenten hat sich Natriumhexacyanoferrat(II) suspendiert in Glycerin herausgestellt.



**Abb.5** Positives MALDI-Massenspektrum von Macadamiaöl (20ng) mit der flüssigen Matrix Natriumhexacyanoferrat(II)/Glycerin. Die Peaks stellen  $[M+Na]^+$  Ionen dar. Keinerlei störenden Kaliumaddukte konnten beobachtet werden.

## 2.2 Andere Lipidklassen

### (1) Sphingo- und Glycerophospholipide

Wie beschrieben (12), eignet sich die Natriumhexacyanoferrat(II)/Glycerin Matrix vor allem für niedermolekulare (Molekulargewicht  $\leq 1200$  Dalton) und hydrophobe Moleküle. Wir versuchten daher dieses Matrixsystem auch in der Analyse diverser Phospholipide einzusetzen. Erste Experimente richteten sich auf die MALDI MS Analyse von verschiedenen PEs (einschliesslich MMPE und DMPE) und dabei konnten Massenspektren mit dominierenden  $[M+Na]^+$  und  $[M-H+2Na]^+$  Ionen generiert werden. In der Anwendung für andere GPLs zeigte sich allerdings, daß dieses flüssige, binäre Matrixsystem nicht generell eingesetzt werden konnte. In den meisten Fällen zeigten sich nur sehr geringe absolute Signalintensitäten und sehr schlechte S/N-Verhältnisse. Nur

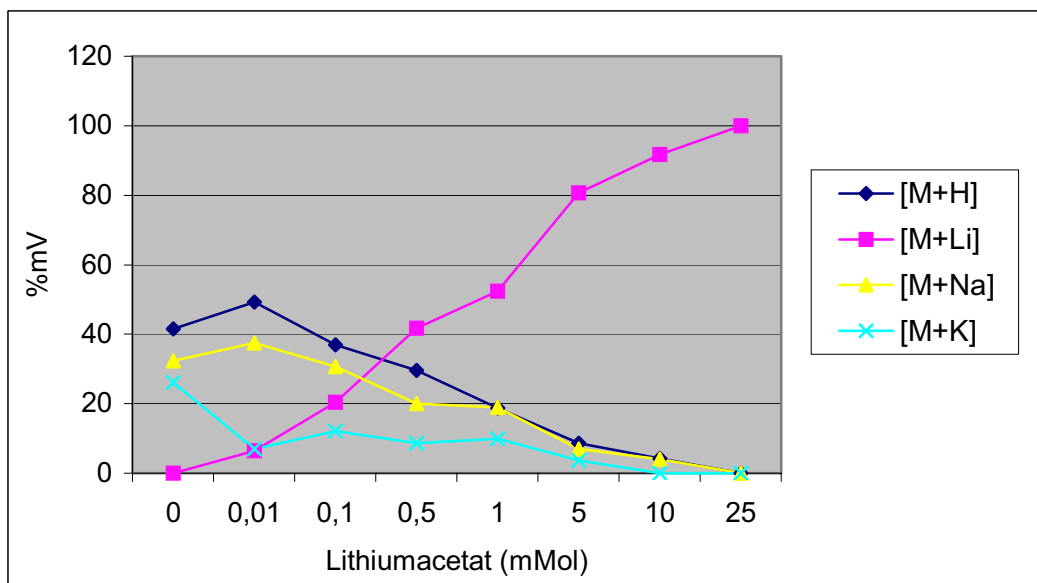
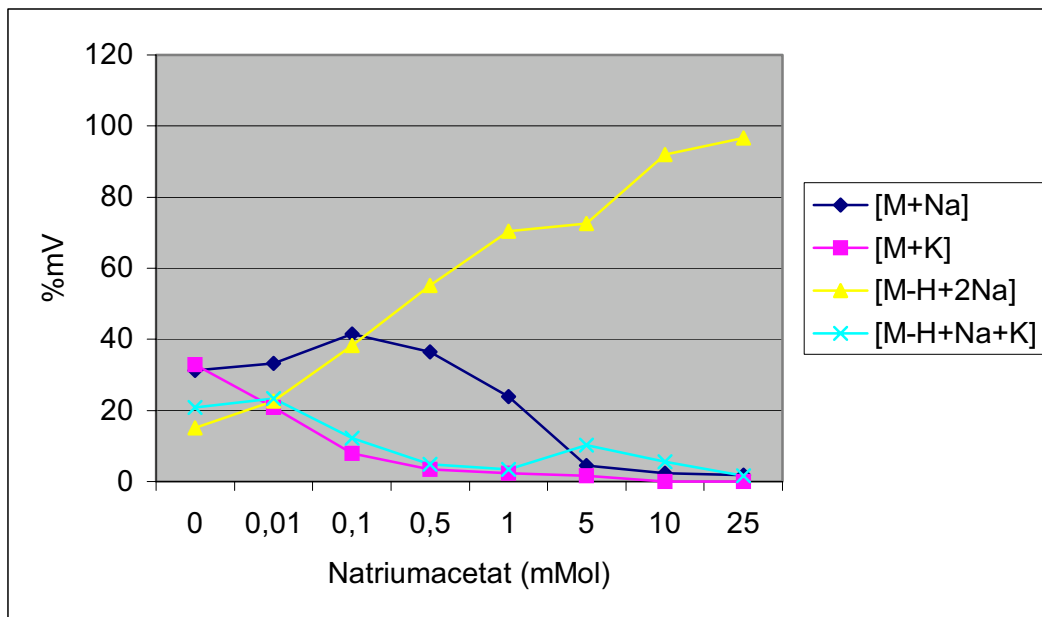
im Fall von PG konnten vergleichbar gute Resultate erzielt werden. Sehr ähnliche Ergebnisse zeigten auch andere flüssige Matrixsysteme, wie Co-UFP/Glycerin und TiN/Glycerin, wobei im Fall von PCs und Ceramiden Massenspektren mit dominierenden  $[M+Na]^+$  und  $[M+H]^+$  Ionen detektiert werden konnten (siehe Tab.1 Anh.).

Die weiteren Experimente richteten sich daher auf den Einsatz von festen, organischen MALDI Matrices. In den wenigen Arbeiten in Bezug auf die Analyse von Lipiden mittels MALDI-MS wurden CHCA oder DHB als Matrices eingesetzt (15). Unsere Untersuchungen zeigten aber in diesem Zusammenhang, daß es dabei zu sehr inhomogenen Analyt/Matrix Verteilungen mit einer sehr schlechten Reproduzierbarkeit und zur Ausbildung komplexer Molekülionenmuster (Signalgemische aus hauptsächlich  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H+2Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  und  $[M-H+Na+K]^+$  Ionen von einer Einzelkomponente) kommt. Im Fall von CHCA konnte eine sehr intensive Fragmentierung beobachtet werden. In unserer Studie setzten wir daher erstmals die Matrix THAP ein, die in der Analyse von bakteriellen Glykolipiden erfolgreich verwendet wurde (16, 17). Die MALDI Massenspektren von GPLs zeigten dabei ein sehr ähnliches Molekülionenmuster wie mit DHB, allerdings mit deutlich linienärmeren Massenspektren im niederen Massenbereich ( $m/z$  100 bis 500). Der letztere Effekt ist bedingt durch eine geringere Ausbildung von Matrixionen. Wir setzten dabei eine modifizierte Probenpräparation ein (18), wobei zuerst die Lipidprobe (gelöst in einem Chloroform/Methanolgemisch) und direkt folgend die THAP Matrixlösung (in einem organischen Lösungsmittel) auf das Target aufgetragen wird. Dies führte zu einer sehr homogenen Kristallisation (d.h. homogene Analyt/Matrix Verteilungen) mit der Folge einer hohen Signalreproduzierbarkeit und absoluten Empfindlichkeit. Für die projektrelevante Anwendungen wurde das Lösungsmittel für THAP optimiert und dabei hat sich Aceton oder Methanol als Optimum herausgestellt (50mM THAP Konzentration). Es konnte eine hohe Reproduzierbarkeit und ein exzellentes S/N-Verhältnis in der MALDI MS Analyse aller wesentlichen GPL Klassen, sowie SM und Ceramide erzielt werden. Bei der Verwendung von Aceton als Lösungsmittel für die Matrix konnte auch eine Verringerung der Kaliumaddukte beobachtet werden. Zur weiteren Verringerung der Komplexität der Massenspektren setzten wir im Rahmen von



Dotierungsexperimenten bewußt Alkalisalze zu, die schon erfolgreich zur Generierung von Natrium- bzw. Lithiumaddukten von GPLs mittels ESI-MS eingesetzt wurden (19, 20). In diesem Fall wurde die THAP Matrix in Methanol zuerst gelöst und damit dann millimolare Natrium- oder Lithiumacetatlösungen hergestellt. Diese Dotierungstechnik führte zur Ausbildung der am meisten alkaligesättigten Molekülionen der einzelnen GPL Klassen, wobei störende Kaliumaddukte vollständig unterdrückt werden konnten (Tab.2 Anh.). In Abb. 6 sind die relativen Signalintensitätsverhältnisse (% mV) der Molekülionen von PE und PC bei verschiedenen Konzentrationen von Natrium- und Lithiumacetat in der Matrixlösung zu sehen. In beiden Fällen (PE und PC) wurden zur Evaluierung des Effektes jeweils 30 Pikomol Probe aufgetragen. Es zeigt sich, daß im Fall von PE ab einer Konzentration von 10 mM Natriumacetat praktisch ausschliesslich  $[M-H+2Na]^+$  Ionen generiert werden. Im Fall von PC konnte in diesem Konzentrationsbereich nur  $[M+Na]^+$  Ionen beobachtet werden. Bei Zugabe von Lithiumsalz konnte ein ähnlicher Effekt ab 5 mM Lithiumacetat beobachtet werden, der zur Ausbildung von dominierenden  $[M+Li]^+$  Ionen führte. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass dabei ein optimales molares Konzentrationsverhältnis der Analyten (A) zu den Salzen (S) im Bereich von  $1:10^6$  bis  $10^8$  (A:S) liegt. Höhere Salzmengen ( $> 50$  mM) führen zu einer entscheidenden Verschlechterung des Desorption/Ionisationsprozesses mit einer deutlichen Erhöhung der Threshold Energie und sehr verminderten S/N-Verhältnissen.

Untersuchungen haben gezeigt, daß die Zugabe von Citratsalzen zur THAP Matrixpräparation zu einer Reduktion der Intensitäten von Matrixionen und Alkaliaddukten der Analyten führt (21). Unsere Experimente haben gezeigt, daß eine derartige Zugabe von Ammoniumcitrat zur THAP Matrixlösung zu einer deutlichen Unterdrückung von Kaliumaddukten und zur gleichzeitigen vermehrten Bildung von  $[M+Na]^+$  Ionen führte. Im Fall von PCs konnte damit

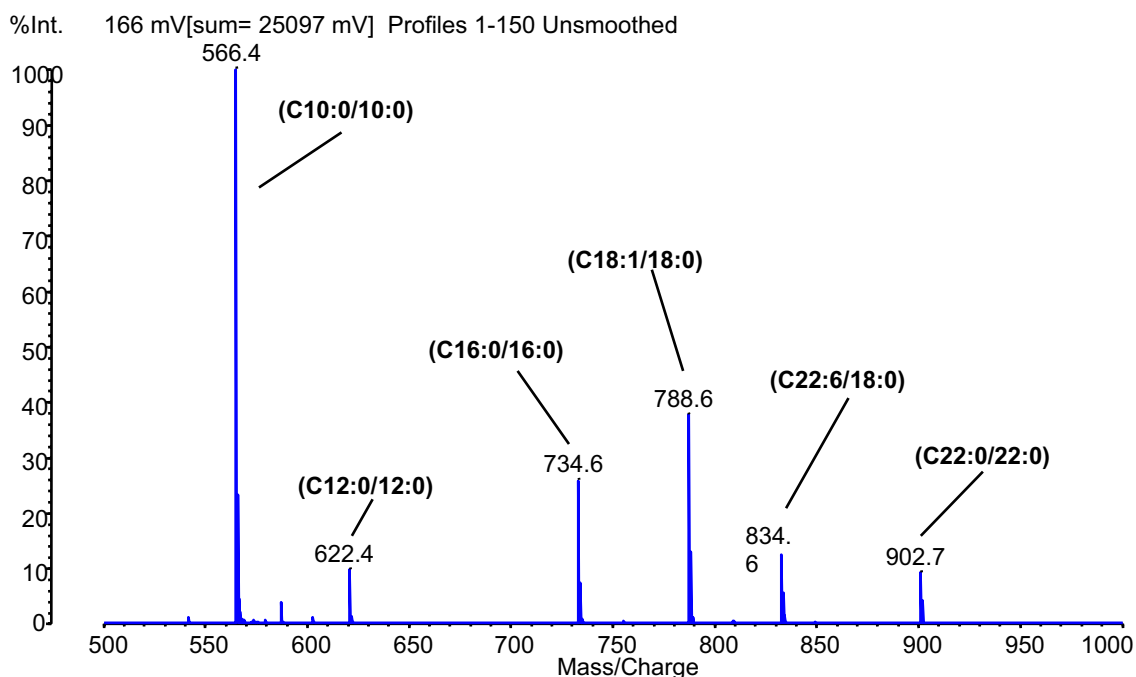


**Abb.6** Abhängigkeit der Molekülionenverteilung von PE (oben) und PC (unten) bezogen auf die Natrium- bzw. Lithiumacetatkonzentration in der Matrixlösung. In beiden Fällen wurden 30 Pikomol Probe aufgetragen. Über einer Konzentration von 10mM Natriumacetat oder 5mM Lithiumacetat dominieren die  $[M-H+2Na]^+$  Ionen von PE bzw. die  $[M+Li]^+$  Ionen von PC.

auch die Generierung von  $[M+H]^+$  Ionen gefördert werden. In Abb.7 ist das MALDI Massenspektrum einer Mischung aus verschiedenen PCs mit der THAP als Matrix nach Zusatz von Diammoniumhydrogencitrat (> 25 mM) zu

sehen. Die  $[M+H]^+$  Ionen der unterschiedlichen PCs dominieren das Massenspektrum und keinerlei Alkaliaddukte sind zu detektieren.

Für die große Gruppe der GPL hat sich die Matrix THAP in der beschriebenen Präparationsweise mit Alkalisalzdotation bzw. Diammoniumhydrogencitrat-zugabe als Optimum herausgestellt.



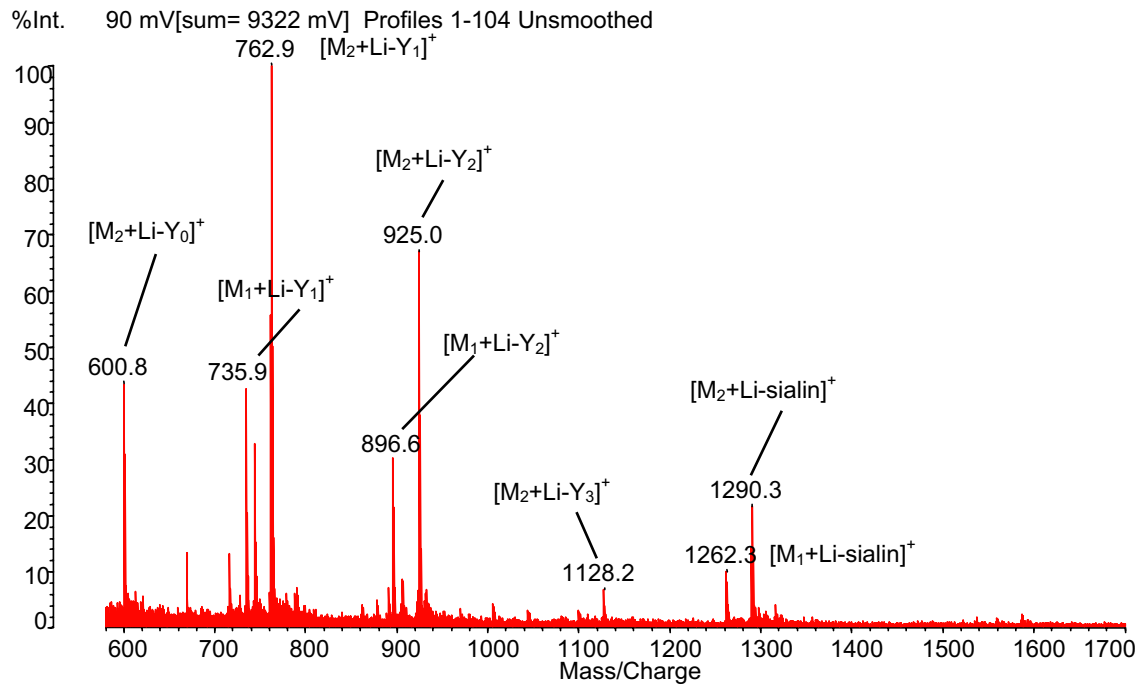
**Abb.7** Positives MALDI-Massenspektrum einer PC Mischung mit der Matrix THAP nach Zugabe von Diammoniumhydrogencitrat ( $>25\text{mM}$ ). Alle Signale stellen  $[M+H]^+$  Ionen dar. Die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen PC ist in Kurzform (siehe Tab. 1) angegeben.

## (2) Glykolipide

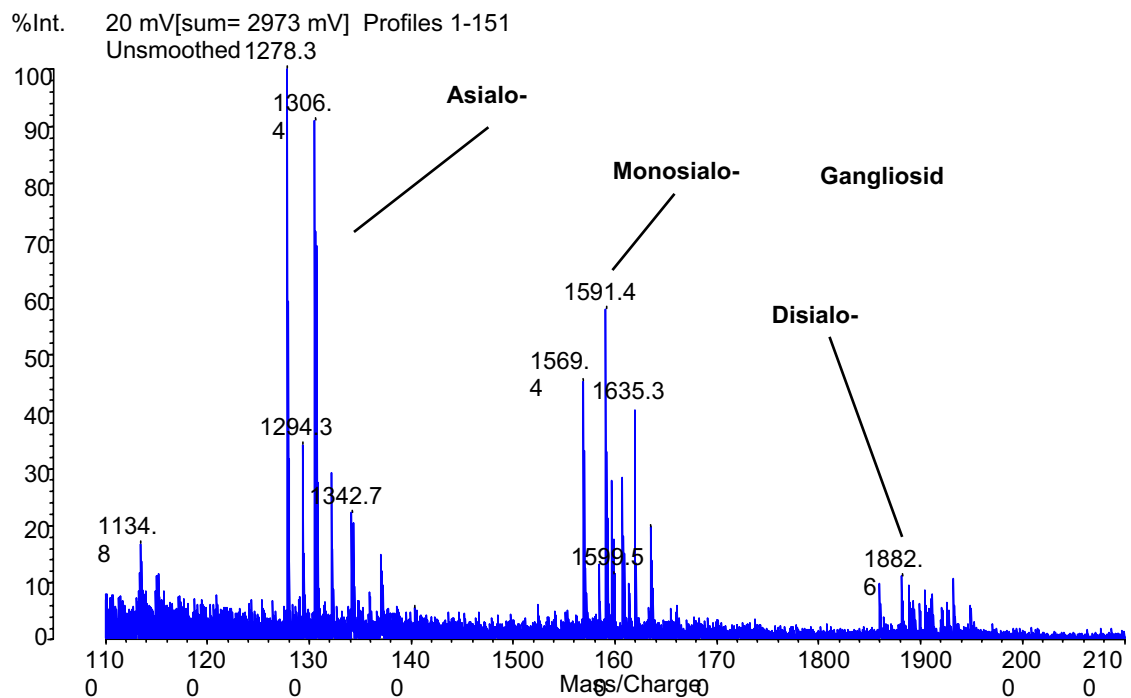
Die besten Ergebnisse in der MALDI MS Analyse von diversen GLs konnten mit den Matrices DHB bzw. THAP Matrix erzielt werden. Mit der Matrix DHB konnten Massenspektren mit ausgezeichneten Signalintensitäten und sehr guten S/N-Verhältnis bis in den unteren Pikomolbereich erreicht werden. In den positiven MALDI Massenspektren dominieren die  $[M+Na]^+$  Ionen als Molekülonen. Ähnliche Resultate konnten auch mit der Matrix THAP erreicht werden, hier zeigten sich aber etwas komplexere Massenspektren durch die Ausbildung von verschiedensten Alkaliaddukten (mehrfache Anlagerung von Alkaliionen an das Analytmolekül), insbesondere bei sauren Glykolipiden.

Andere Matrices, einschliesslich der schon genannten flüssigen Matrices, zeigten keine vergleichbar guten Resultate und eine nur eingeschränkte Anwendbarkeit (siehe Tab.2 Anh.). Grundsätzlich enthielten die Massenspektren mehr oder weniger intensive In-Source Fragmente (hauptsächlich von den Oligosacchariden herrührend). Insbesondere saure GLs zeigten sehr intensive Fragmentationen, die von der Abspaltung der Sialinsäuren sich ableiten lassen. Im Gegensatz zu anderen Lipidklassen konnten bei den Glykolipiden nur sehr schwache metastabile Zerfälle (die für PSD Fragmentationenanalyse nötig wären) registriert werden.

Die bewußte Zugabe von Natrium- oder Lithiumacetat (25 mM) zur Matrixlösung führte zu einer vollständigen Unterdrückung der kationisierten Molekülonen zugunsten einer verstärkten Fragmentierung des Oligosaccharidteils. Dieser Effekt war nicht zuletzt eine Folge von höheren Threshold Energien, die für einen brauchbaren MALDI Desorption/Ionisationsprozeß nötig waren. In Abb.8 ist ein derartiges MALDI Massenspektrum nach Zugabe von Lithiumacetat zu sehen. In diesem Fall konnte eine vollständige Y-Serie (22) der Zuckerfragmente nachgewiesen werden. Die Signale bei  $m/z$  1262 und 1290 stammen von  $[M+Li-Sialinsäure]^+$  Ionen von zwei verschiedenen  $GM_1$  Spezies die ein  $C_{18}$  und  $C_{20}$  Sphingosin enthalten. Intakte  $[M+Li]^+$  Ionen oder andere Typen von Molekülonen konnten keine detektiert werden. Weiters zeigte sich im Fall von natürlichen Gangliosidmischungen ein beträchtlicher Unterdrückungseffekt von höhermolekularen Spezies (mit zunehmender Zahl an Sialinsäuren) der auch von ESI-MS Untersuchungen bekannt ist (17). Abb.9 zeigt das positive MALDI Massenspektrum einer GL Mischung (isoliert aus Rinderhirn) mit der Matrix THAP. Die Peakgruppen bei  $m/z$  1300, 1600 und 1900 stammen aus Alkaliaddukten (dominierend  $[M+Na]^+$  Ionen) von verschiedenen Asialo-, Monosialo- und Disialogangliosiden ( $\Delta m$  entspricht 291 Dalton und korreliert mit einer Sialinsäure). Im Fall des hochmolekularen Trisialogangliosids  $GT_{1b}$  (Molekulargewicht 2128 Dalton) konnten nur mehr schwache Signale im positiven Modus detektiert werden.

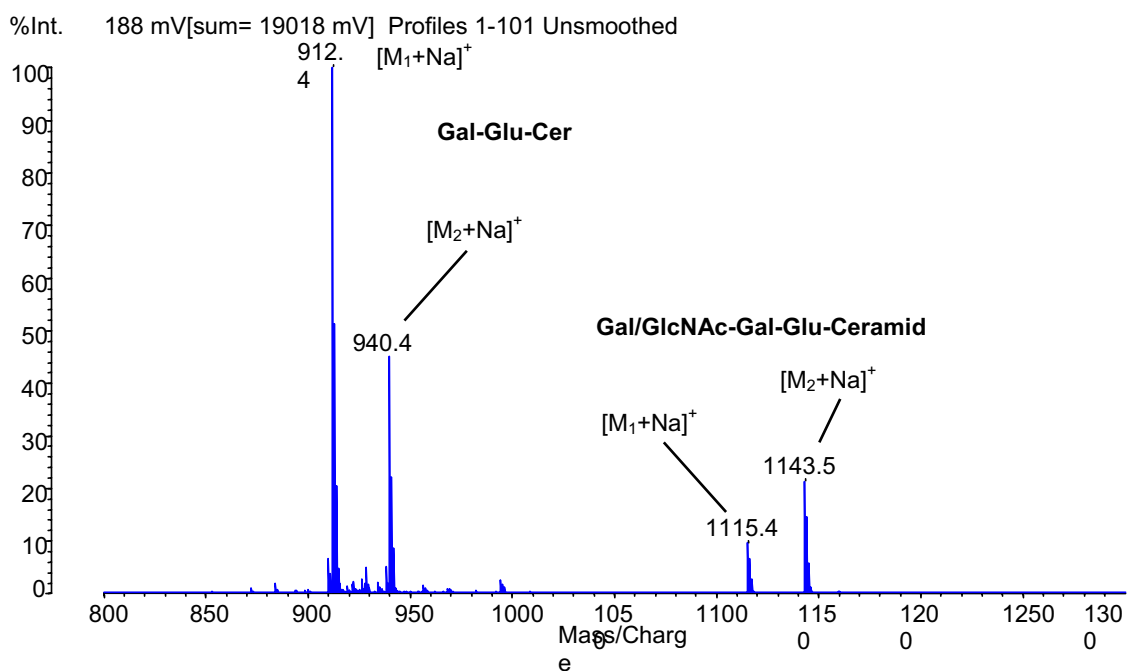


**Abb.8** Positives MALDI-Massenspektrum von Monosialoganglioside GM<sub>1</sub> (30 pMol) mit der Matrix THAP nach Zugabe von Lithiumacetat (25mM).



**Abb.9** Positives MALDI-Massenspektrum einer Rinderhirngangliosid-mischung mit der Matrix THAP ohne Zusätze.

Weniger komplexe MALDI Massenspektren konnten im Falle von neutralen GLs erhalten werden. Abb.10 zeigt das Massenspektrum eines binären Lactocerebrosidgemisches. Die Ionen bei  $m/z$  912 und 940 stellen die  $[M+Na]^+$  Ionen der zwei Hauptkomponenten, die sich um eine  $-CH_2=CH_2-$  Einheit (28 Dalton) in ihrer C-Kette unterscheiden. Zwei zusätzliche Molekülionen konnten bei  $m/z$  1115 und 1143 detektiert werden. Die Massendifferenz von 203 Dalton deutet auf die Anwesenheit einer zusätzlichen N-Acetylhexosamineinheit hin. Dieses MALDI MS Experiment zeigt auch, daß Spurenkomponenten aufzeigbar sind.



**Abb.10** Positives MALDI-Massenspektrum eines Lactocerebrosidgemisches (ca. 50 Pikomol Gesamtmenge) mit der Matrix THAP ohne Zusätze.  $M_1$  und  $M_2$  stellen Moleküle mit einem  $C_{18}$  oder  $C_{20}$  Sphingosinrest dar.

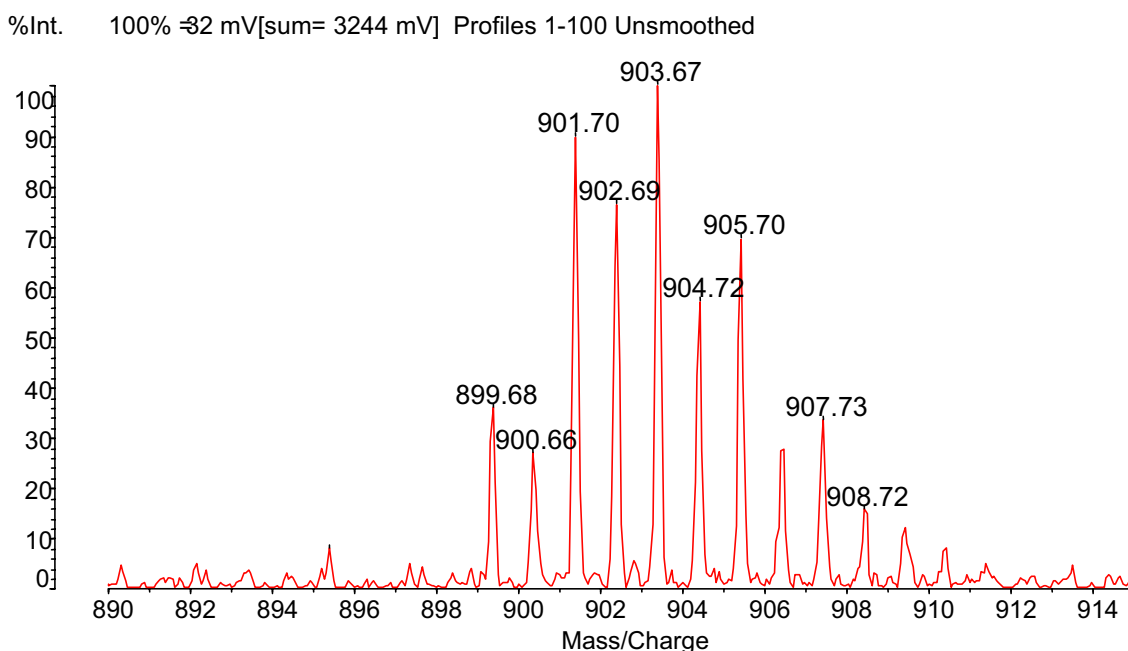
### 3. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN VON PFLANZENÖLEN

#### 3.1 „Ölscreening“ mittels MALDI-MS

Unsere Untersuchungen von unaufgetrennten Pflanzenölen mittels MALDI-MS zeigten, dass spezifische TAG-Muster von einzelnen Ölen schnell und einfach nachgewiesen werden konnten. Dabei wurde ein kleines Probenvolumen (0.3-0.5 $\mu$ l), gelöst in Chloroform (Konzentration 60ng/ $\mu$ l), auf das matrixbeschichtete Target ohne Vorreinigung des Öls aufgetragen. Bei unseren Untersuchungen wurde dabei ein Matrixsystem bestehend aus Natriumhexacyanoferrat(II) und Glycerin verwendet (siehe 2.1). Durch die Kombination mit einem hochauflösenden ( $R_{FWHM} \geq 7000$ ) Flugzeitanalysators konnte dabei ein vollständiges TAG-Profil erhalten werden, wobei charakteristische Peakgruppen von Molekülionen, die sich nur in der Anzahl der Doppelbindungen ihrer Acylreste (FA Reste) unterscheiden ( $\Delta m = 2u$ ), eindeutig differenziert werden konnten (Abb.11).

Die Experimente zeigten, dass jedes Pflanzenöl ein charakteristisches TAG-Profil in Abhängigkeit der FA-Zusammensetzung aufweist, das zu seiner schnellen Charakterisierung („Ölscreening“) und in Kombination mit einer potentiellen Datenbank auch zur Identifizierung eingesetzt werden kann. Abb.12 zeigt den aus MALDI-Massenspektren ermittelten relativen Prozentanteil einzelner TAG-Komponenten in sechs verschiedenen Ölen. In diesem Diagramm sind die Prozentanteile der einzelnen TAGs auf die Peakfläche der jeweils intensivsten Komponente (100%) bezogen. Viele züchterische Experimente richten sich auf eine Veränderung der FA-Zusammensetzung in Ölpflanzen (10, 11), die natürlich zu einer Änderung des TAG-Profils in den Ölen führt. In diesem Zusammenhang sind einfach anwendbare analytische Methoden für die Identifikation und/oder Quantifizierung von TAGs gefragt. Unsere Studie hat gezeigt, dass solche Veränderungen mittel MALDI-MS einfach analysiert werden können. In bezug auf die Evaluierung einzelner Zuchtformen, z.B. von Sonnenblumenpflanzen, konnte eine eindeutige Veränderung der TAG-Komponenten in diesen Ölen mittels MALDI-MS nachgewiesen werden. Abb.13 zeigt die Daten basierend

auf MALDI- und ESI Massenspektren von zwei Kultursorten (Sorte Olbaril und Proleic) mit verstärkter Ölsäureexprimierung im Vergleich zu einem „normalen“ Sonnenblumenöl. Dieser Vergleich zeigt die Verschiebungen im TAG-Profil und eine deutliche Zunahme an Triolein in diesen beiden Züchtungen. Vergleichsuntersuchungen anhand dieser drei Öle mittels ESI-MS zeigten eine weitgehende Übereinstimmung der relativen quantitativen Ergebnisse, womit die MALDI-MS basierenden Daten durch eine unabhängige, analytische Meßmethoden verifiziert werden konnten.

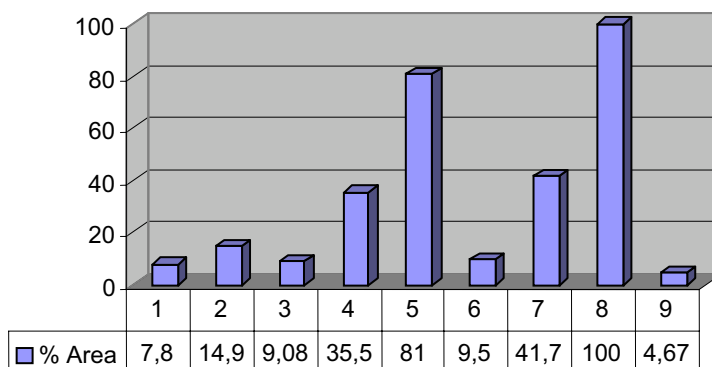


[M+Na] <sup>+</sup> gefunden m/z (monoisotop)	[M+Na] <sup>+</sup> berechnet m/z (monoisotop)	$\Delta m$ (Da)	Fettsäurezusammensetzung (berechnet aus PSD Daten)
899.68	899.71	0.03	18:2/18:2/18:3 (LLLn)
901.70	901.72	0.02	18:2/18:2/18:2 (LLL)
903.67	903.74	0.07	18:2/18:2/18:1 (LLO)
905.70	905.76	0.06	18:2/18:1/18:1 (LOO)
907.73	907.77	0.04	18:1/18:1/18:1 (OOO)

**Abb.11** Positives MALDI-Massenspektrum von unaufgetrenntem Sojaöl gemessen mit dem binären Natriumhexacyanoferrat(II)/Glycerin Matrixsystem. Detailansicht einer Peakgruppe bestehend aus fünf verschiedenen TAGs. Die Peakauflösung von  $R_{FWHM} = 6000$  ermöglicht eine eindeutige Differenzierung einzelner TAGs, die sich nur durch ein  $\Delta m$  von 2 Da unterscheiden (Massendifferenz einer Doppelbindung).

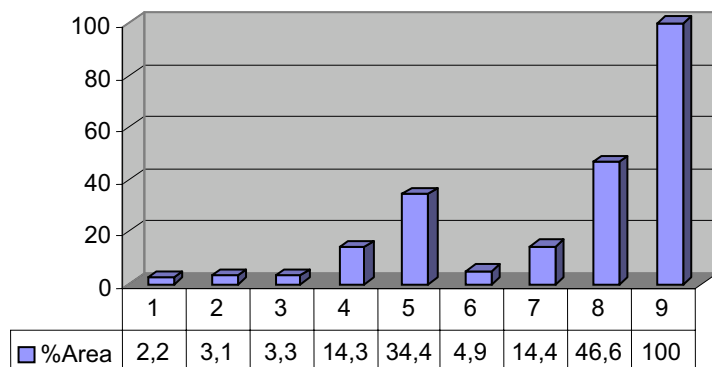


### OLIVENÖL



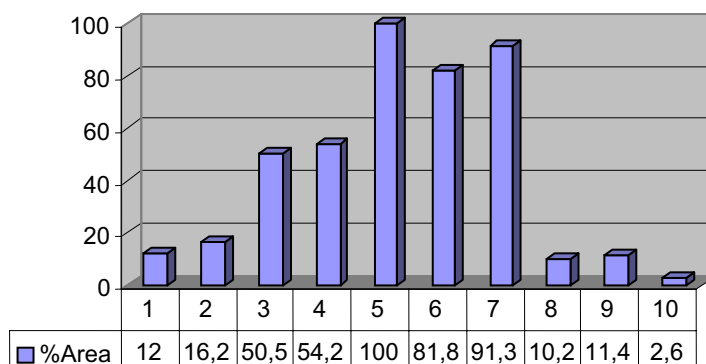
$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
853,70	LPP
855,73	OPP
877,68	LOP <sub>o</sub>
879,69	LOP
881,70	OOP
903,68	LLO
905,72	LOO
907,70	OOO
935,68	ALO

### HASELNUSSÖL



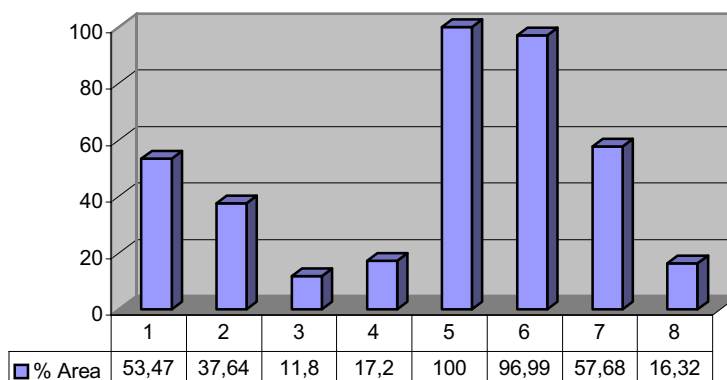
	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
1	853,58	LPP
2	855,62	OPP
3	877,62	LLP
4	879,63	LOP
5	881,64	OOP (+LPS)
6	901,58	LLL
7	903,62	LLO
8	905,60	LOO
9	907,64	OOO

### MACADAMIAÖL

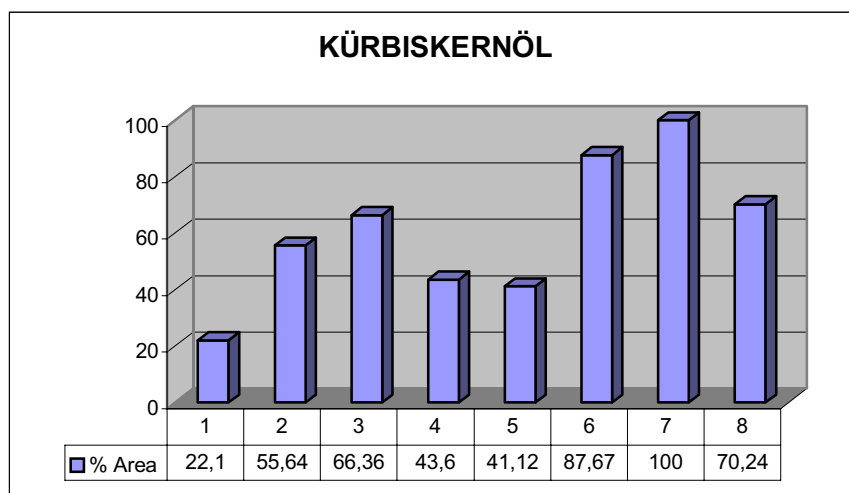


	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
<b>1</b>	<b>823,64</b>	<b>PoPoPo</b>
<b>2</b>	<b>825,65</b>	<b>PoPoP</b>
<b>3</b>	<b>851,60</b>	<b>PPO</b>
<b>4</b>	<b>853,64</b>	<b>PPoO</b>
<b>5</b>	<b>879,63</b>	<b>PoOO</b>
<b>6</b>	<b>881,64</b>	<b>OOP</b>
<b>7</b>	<b>907,64</b>	<b>OOO</b>
<b>8</b>	<b>935,68</b>	<b>GOO</b>
<b>9</b>	<b>937,69</b>	<b>AOO</b>
<b>10</b>	<b>965,70</b>	<b>BOO</b>

### SOJAÖL

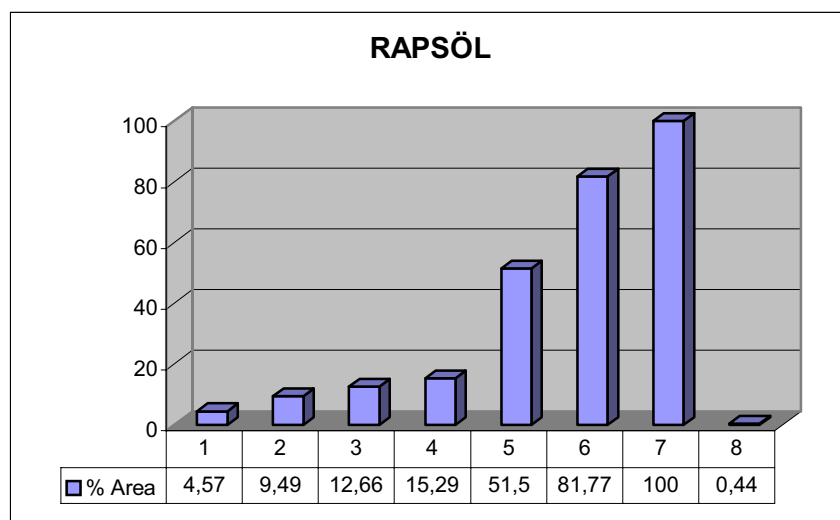


	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
<b>1</b>	<b>877,64</b>	<b>PLL</b>
<b>2</b>	<b>879,65</b>	<b>PLO</b>
<b>3</b>	<b>881,60</b>	<b>POO</b>
<b>4</b>	<b>899,64</b>	<b>LLLn</b>
<b>5</b>	<b>901,63</b>	<b>LLL</b>
<b>6</b>	<b>903,64</b>	<b>LLO</b>
<b>7</b>	<b>905,64</b>	<b>LOO</b>
<b>8</b>	<b>907,68</b>	<b>OOO</b>



	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
<b>1</b>	<b>853,73</b>	<b>PPL</b>
<b>2</b>	<b>877,72</b>	<b>PLL</b>
<b>3</b>	<b>879,73</b>	<b>PLO</b>
<b>4</b>	<b>881,74</b>	<b>PLS</b>
<b>5</b>	<b>901,76</b>	<b>LLL</b>
<b>6</b>	<b>903,73</b>	<b>LLO</b>
<b>7</b>	<b>905,77</b>	<b>LOO (+LLS)</b>
<b>8</b>	<b>907,76</b>	<b>OOO (+LOS)</b>

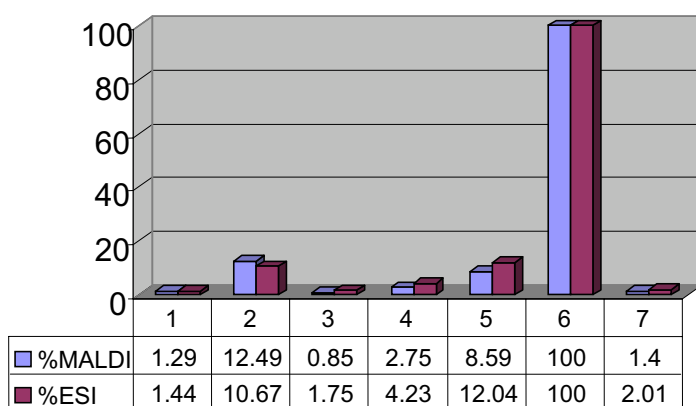
Fortsetzung nächste Seite



	$[M+Na]^+$ m/z	TAG
1	877,62	POLn
2	879,63	PLL
3	881,64	OOP
4	901,69	LOLn
5	903,62	LLO
6	905,66	LOO
7	907,65	OOO
8	935,68	OOG

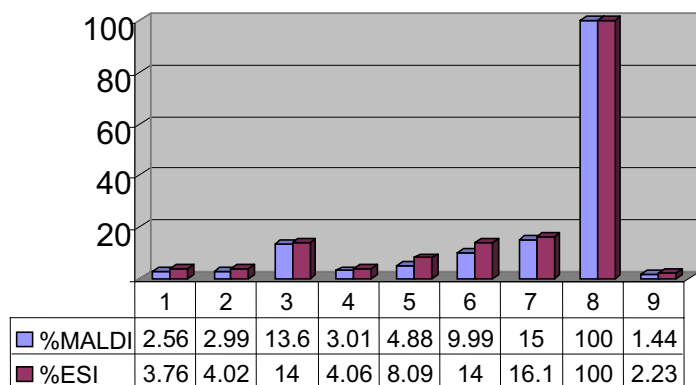
**Abb.12** Vergleich von sechs pflanzlichen Ölen. Die Werte repräsentieren den prozentuellen Anteil (% Peakfläche) von bestimmten TAGs im Massenbereich m/z 800-1000 aus den Massenspektren der unaufgetrennten Öle, bestimmt mit MALDI-MS. In der Tabelle sind die gefundenen m/z Werte sowie die FA-Zusammensetzung basierend auf PSD-Analyse angegeben.

### OLBARIL

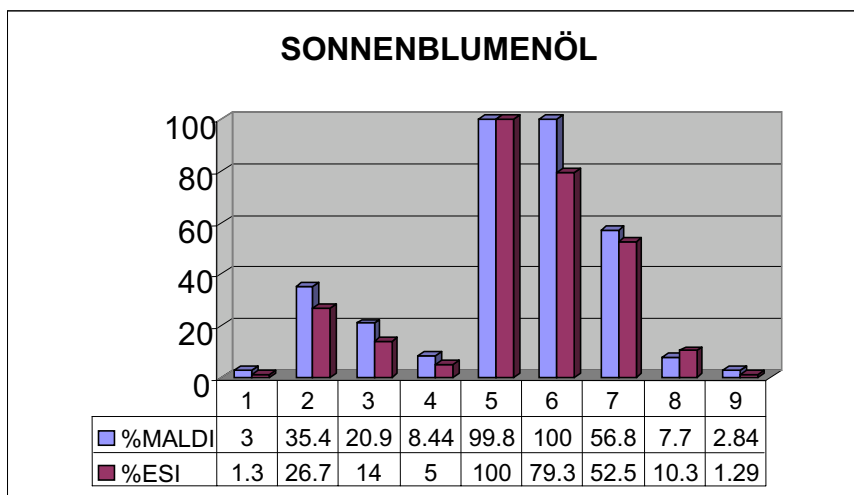


	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
1	879,69	LOP (+OOPo)
2	881,70	OOP
3	901,64	LLL
4	903,68	LLO (+LnOO)
5	905,72	LOO (+ LLS)
6	907,70	OOO
7	965,70	BOO

### PROLEIC



	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	TAG
1	877,68	LLP
2	879,69	LOP
3	881,70	OOP (+LPS)
4	883.71	OPS
5	901,64	LLL
6	903,62	LLO
7	905,66	LOO (+LLS)
8	907,70	OOO (+LOS)
9	965,70	BOO



	$[M+Na]^+$ m/z	TAG
1	853,58	LPP
2	877,56	LLP
3	879,57	LOP
4	881,58	LPS
5	901,53	LLL
6	903,56	LLO
7	905,60	LOO (+LLS)
8	907,60	OOO (+LOS)
9	963.60	BLO

**Abb.13** Vergleich von Ölen aus drei verschiedenen Sonnenblumensorten. Die Werte repräsentieren den prozentuellen Anteil (% Peakfläche) von bestimmten TAGs im Massenbereich m/z 800-1000 aus den Massenspektren der unaufgetrennten Öle, gefunden mit MALDI-MS (blau) und ESI-MS (rot). In der Tabelle sind die gefundenen m/z Werte sowie die FA-Zusammensetzung basierend auf PSD-Analyse angegeben.

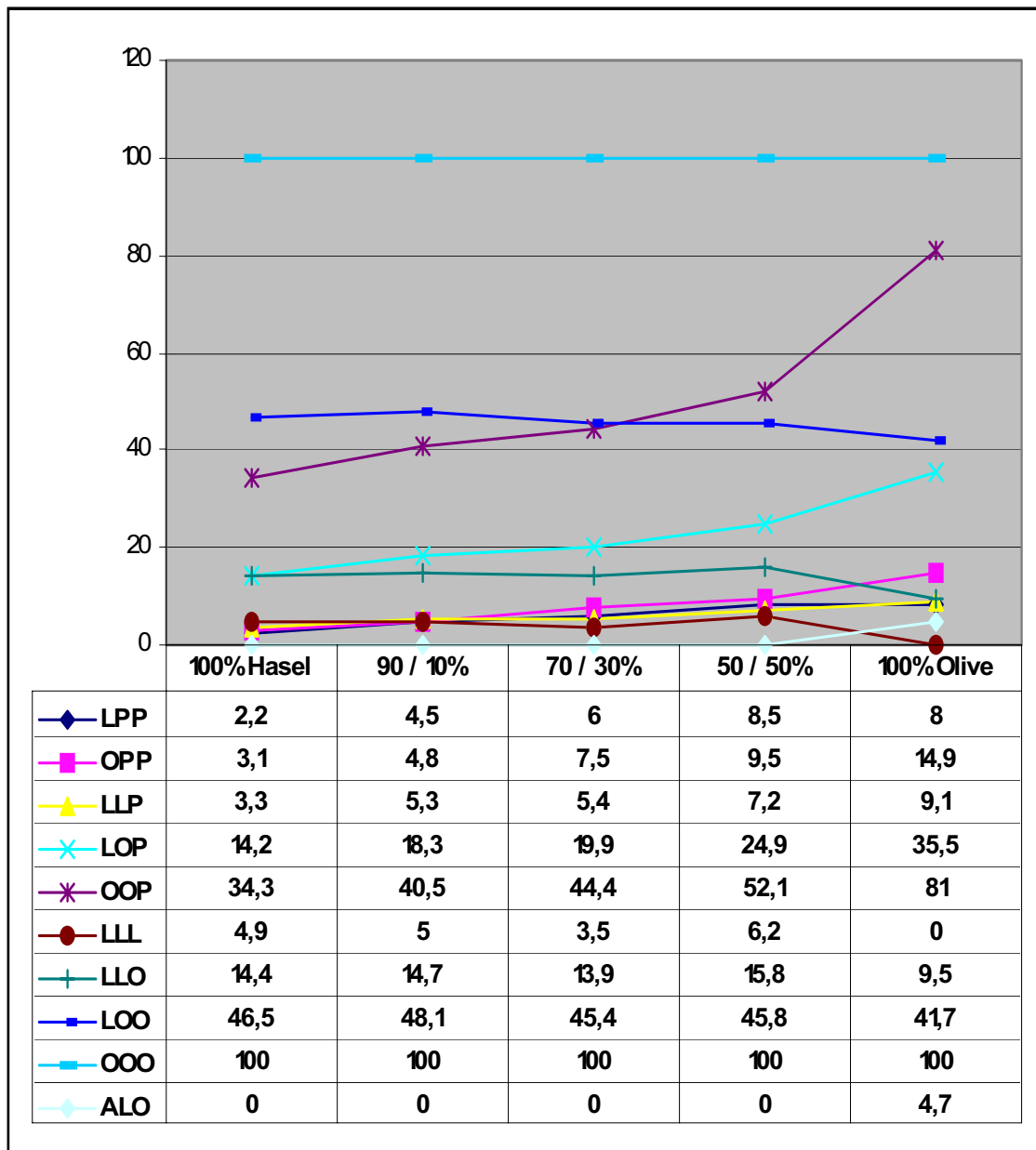
Eine interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang war auch, inwieweit die Möglichkeit des MALDI-MS Nachweises von Ölverfälschungen möglich ist. Oftmals werden nämlich Billigöle (z.B. Sojaöl) als Zusätze zu Qualitätsölen (z.B. kaltgepresstes Olivenöl) benutzt, was zu beträchtlichen Qualitätsveränderungen führt bzw. eine Verfälschung darstellen kann. Der Brauchbarkeit einer eingesetzten Analysenmethode wird dadurch bestimmt, inwieweit sie in der Lage ist qualitativ und quantitativ die Fremdöl TAGs eindeutig zu bestimmen, wobei aber auch andere ölspezifische Bestandteile berücksichtigt werden können bzw. müssen (z.B. Farb- und Aromastoffe). Die

MALDI-MS Technik wurde nun betreffend einer solchen Fragestellung evaluiert. Wie schon gezeigt, ist diese Technik zum Nachweis von qualitativen TAG-Profilveränderungen und zur Detektion ungewöhnlicher TAGs in Ölgemischen sehr gut geeignet. Im Gegensatz zu chromatographischen Methoden (23), ist die MALDI-MS wesentlich weniger zeitaufwendig und liefert eindeutigere Ergebnisse mit hoher Empfindlichkeit. Eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Akkumulation einer grösseren Anzahl von Massenspektren ist dabei jedoch für die Erlangung guter, auch statistische abgesicherter Daten notwendig. Als Evaluierungsbeispiel für den quantitativen Aspekt einer Ölgemischanalyse wurden Oliven- und Haselnussöl ausgewählt. Oliven- und Haselnussöl weisen eine sehr ähnliche TAG-Zusammensetzung auf, wobei die Triglyceride OOO, OOP, LOO und LOP dominieren. In unseren Experimenten wurden neben den reinen Ölen, Mischungen der beiden Öle im Bereich von 10-50% (w/w) mittels MALDI-MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb.14 zusammengefasst.

Die Daten basieren auf einer Serie von Analysen und den dabei gemessenen Molekülionenintensitäten der einzelnen TAGs. Diese TAG Intensitäten wurden als relativer Prozentsatz bezogen auf die intensivste TAG Komponente (in den beiden, reinen Ölen das Triglycerid OOO; entspricht 100%) der beiden Öle angeführt. Obwohl beide Öle eine sehr ähnliche Zusammensetzung haben, konnten relative Intensitätsänderungen einzelner Komponenten in Abhängigkeit der untersuchten Mischungsbereiche beobachtet werden. Dabei konnte ein deutlicher Trend zu einer Zunahme der Signalintensität der TAGs OOP, LOP und OPP mit steigendem Mengenanteil von Olivenöl nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich natürlich eine Zunahme von LLL, LLO und LOO mit einem steigenden Mengenanteil von Haselnussöl. Der Zusatz eines Olivenöls zu einem Haselnussöl konnte sowohl qualitativ als auch semiquantitativ bestimmt werden. Eine absolute TAG Quantifizierung ist jedoch schwierig bzw. erfordert den Einsatz eines oder mehrerer markierter TAG Standards.

Der beschriebene Fall stellt eine besonders schwierige Konstellation dar, da die beiden Öle ein sehr ähnliches TAG-Profil zeigen. Im Fall von Ölen unterschiedlicheren TAG-Profilen (z.B. Oliveöl/Sojaöl) können solche

verfälschungsbedingten Änderungen wesentlich eindeutiger mittels MALDI-MS nachgewiesen werden

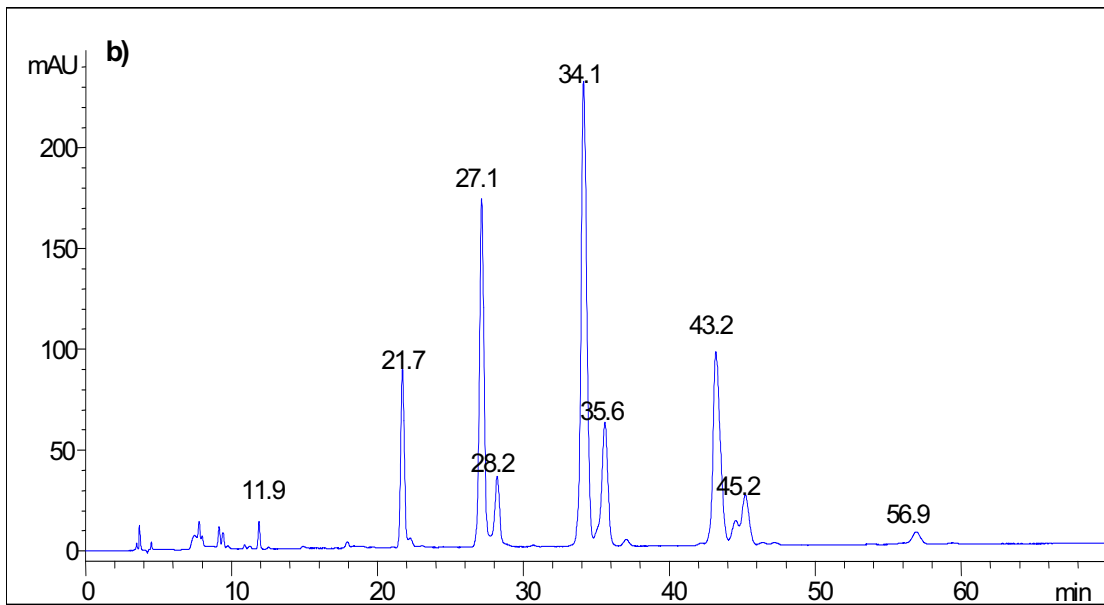
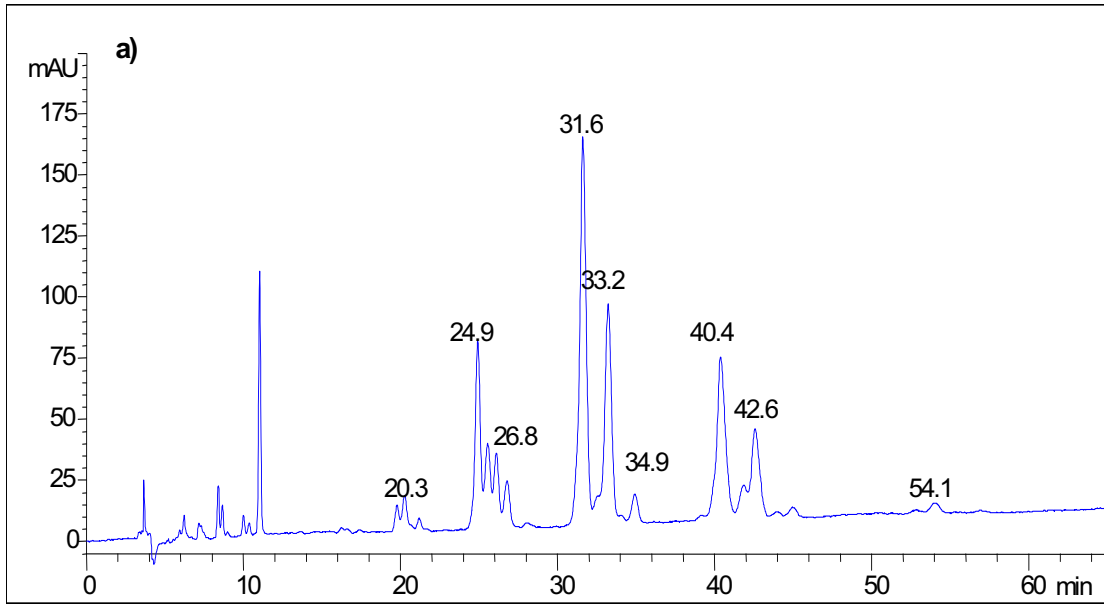


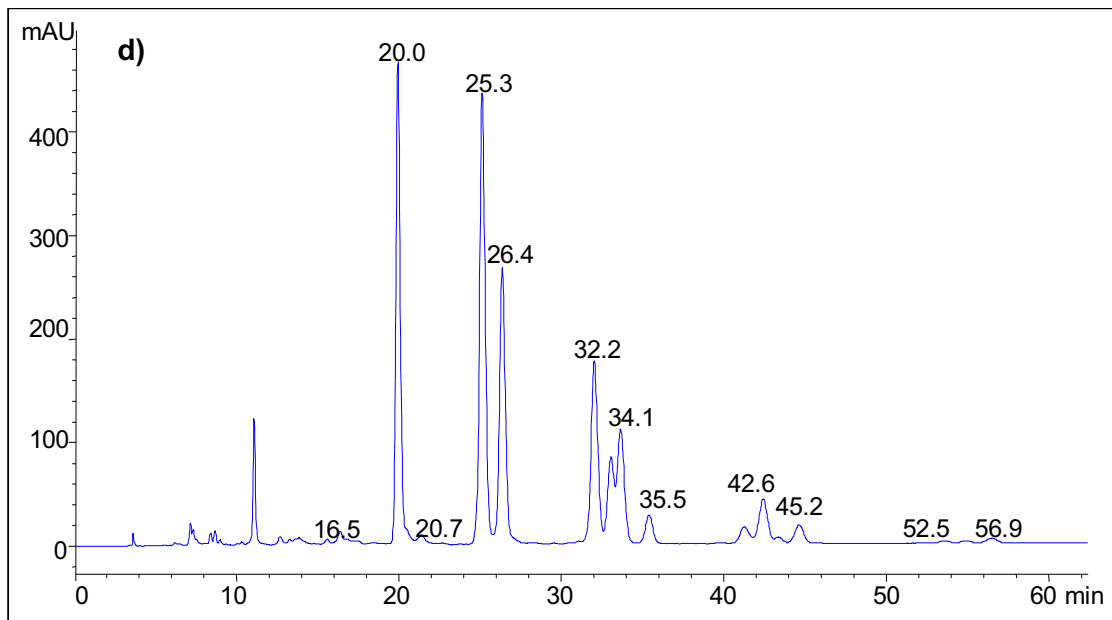
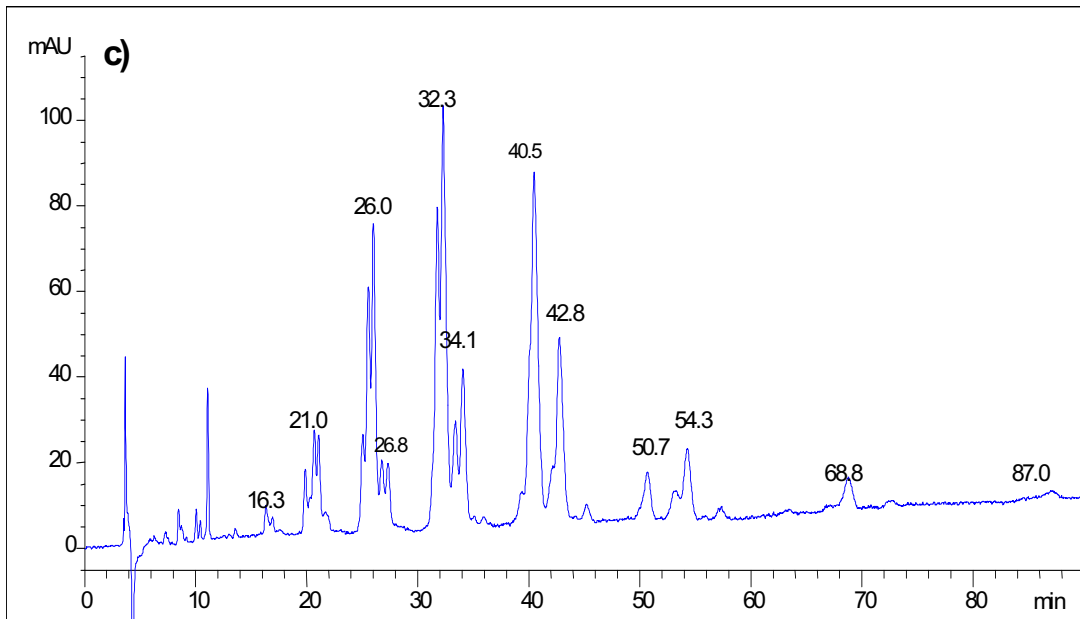
**Abb.14** Nachweis der Veränderungen in der TAG-Zusammensetzung bedingt durch Mischung zweier Öle mittels MALDI-MS. Dargestellt ist der Übergang von 100% Haselnuss- (Hasel) zu 100% Olivenöl (Olive) und die Änderung des %-Anteils einzelner TAGs in drei definierten Mischungsstufen bezogen auf Triolein (OOO; 100% Peakintensitätsmaximum).

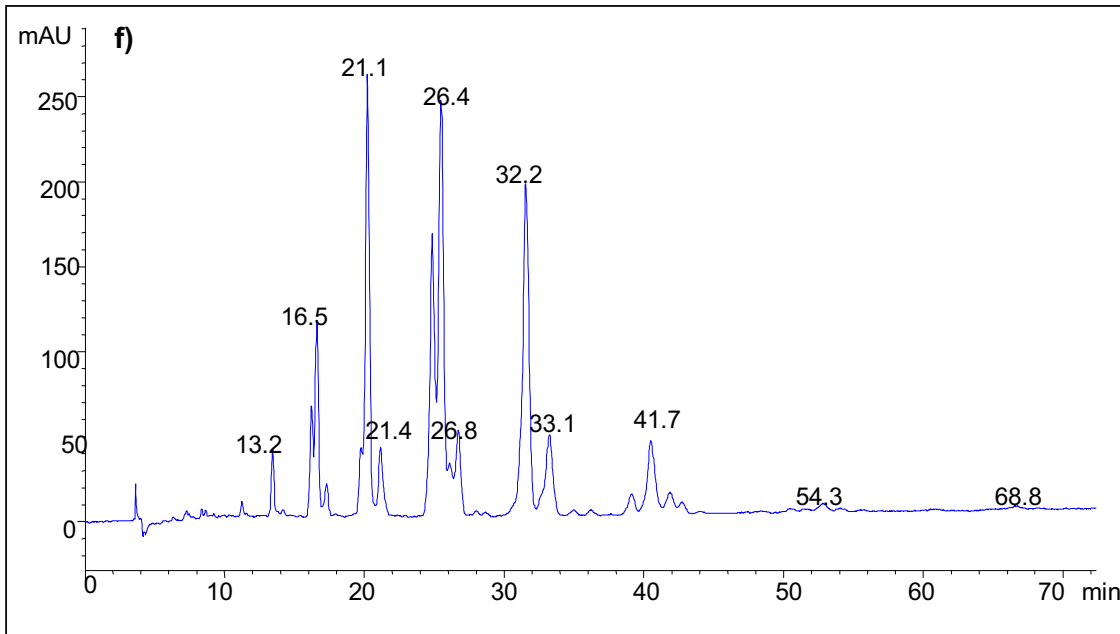
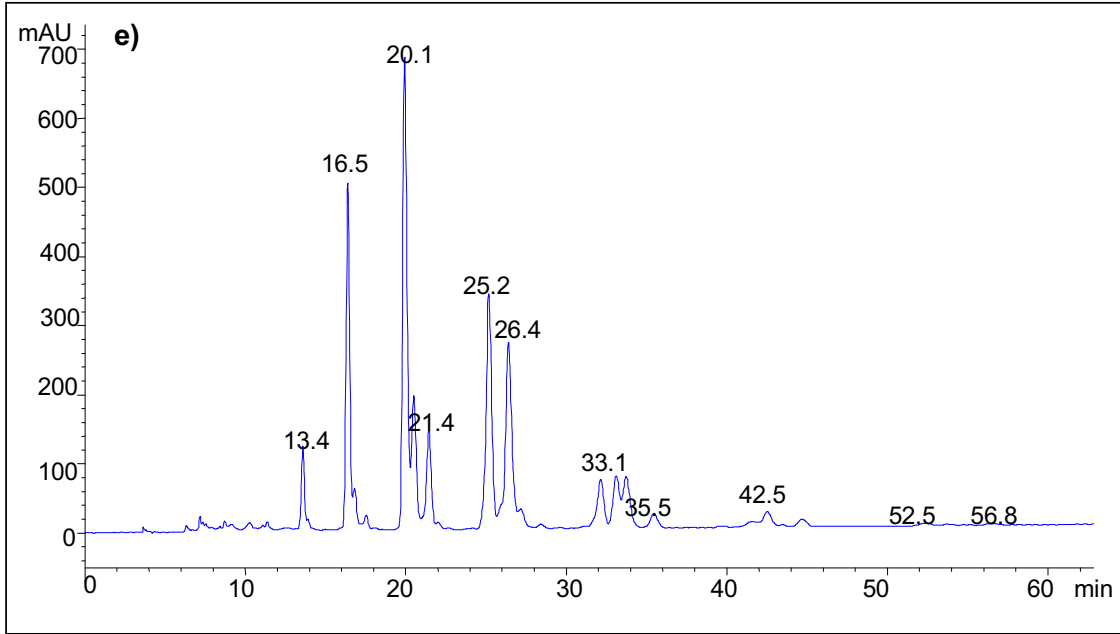


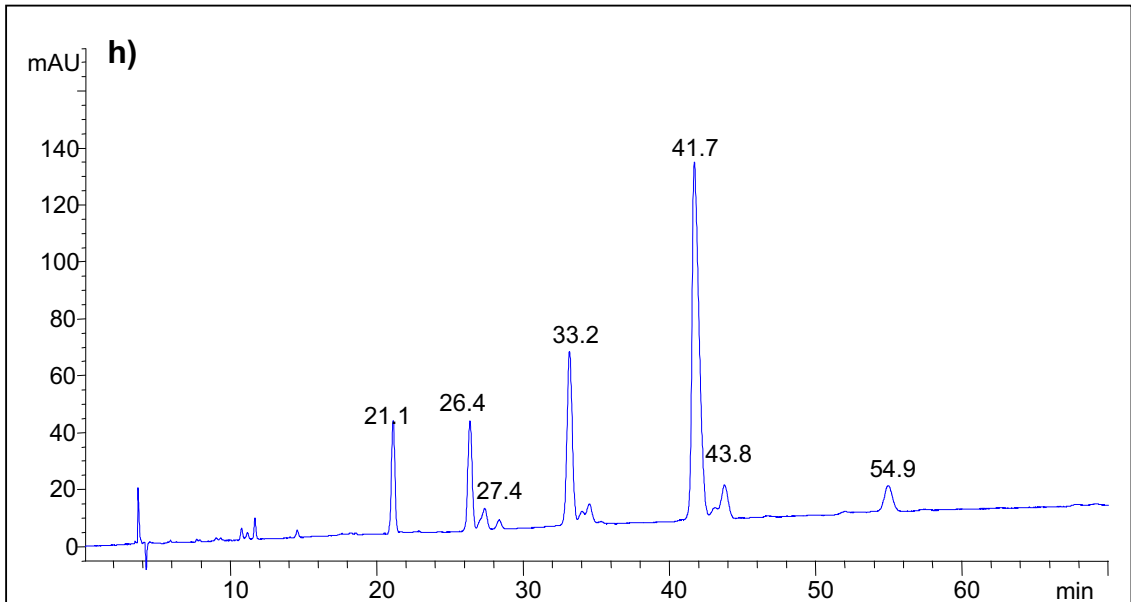
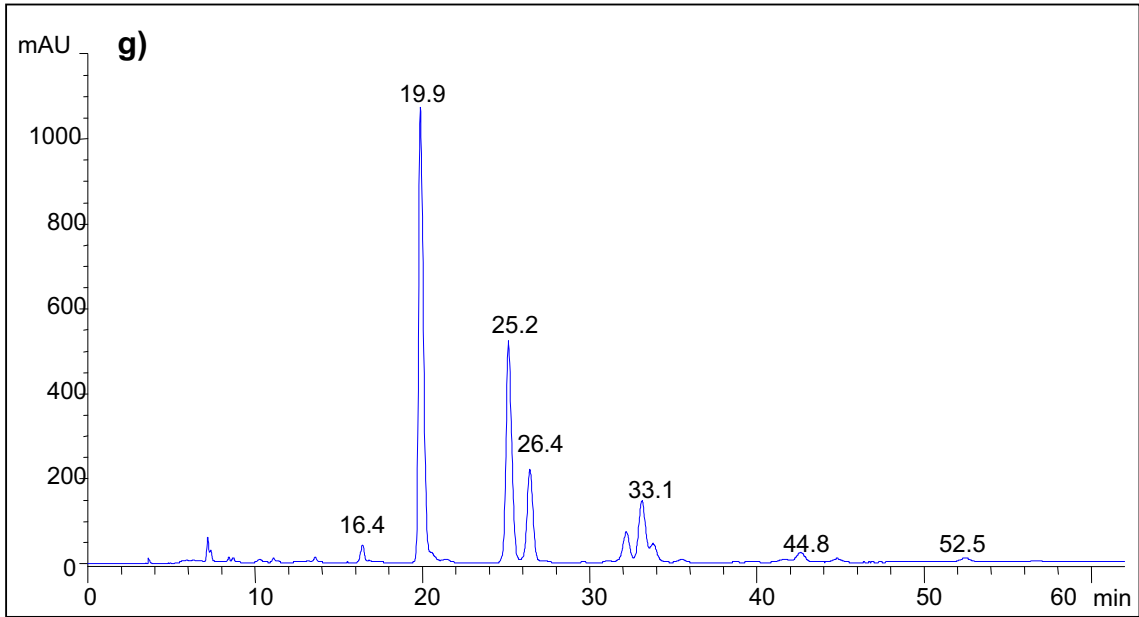
### **3.2 Bestimmung der TAG-Zusammensetzung von Pflanzenölen mittels HPLC und MS**

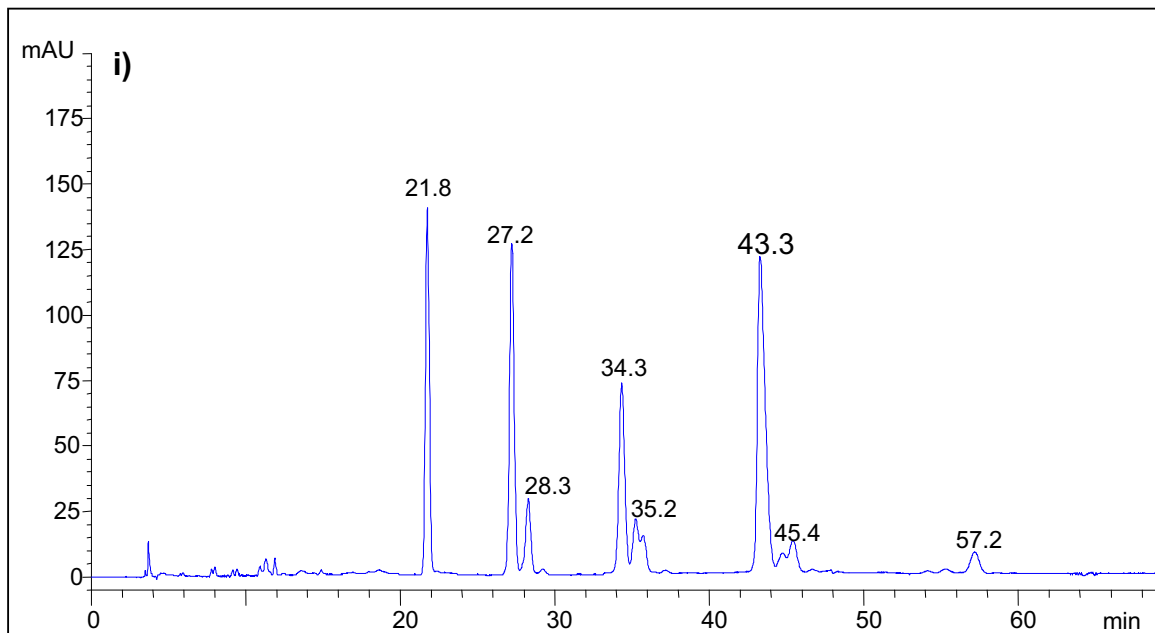
Wie unsere Untersuchungen zeigten, können die TAG-Profile von Pflanzenölen mittels MALDI-MS einfach bestimmt werden. In vielen Pflanzenölen sind TAGs mit unterschiedlichem FA-Zusammensetzung/Stellung aber gleichen Molekulargewichtswerten zu finden, die daher mittels MS nicht einfach differenziert werden können. Zu diesen zählen sowohl Strukturisomere (z.B. OOP/LPS) als auch Positionsisomere (z.B. OOP/OPO). Eine detaillierte Isomerencharakterisierung der einzelnen TAG-Spezies ist daher in den meisten Fällen nur über eine chromatographische Vortrennung der Öle möglich. Einzelne TAG-Komponenten von Ölen können sehr gut mittels RP-HPLC aufgetrennt werden. TAGs werden dabei nach der Kettenlänge der FAs und ihrem Sättigungsgrad aufgetrennt (24). Die einzelnen Komponenten eluieren dabei in Peakgruppen mit gleichen ECNs (Equivalent Carbon Number, 25). In unserer Untersuchung wurde ein isokratisches Trennsystem mit UV-Detektion eingesetzt. In Abb.15 sind die HPLC Chromatogramme von neun verschiedenen analysierten Pflanzenölen zu sehen. Das entwickelte HPLC-System zeigte eine sehr gute Brauchbarkeit (in bezug auf Trennleistung, Empfindlichkeit, Säulenstabilität etc.) und ermöglichte eine gute Auftrennung der meisten Komponenten in einer Laufzeit von 60 bis 100 min. Die einzelnen HPLC Fraktionen wurden anschliessend für die weiteren MALDI-MS Experimente gesammelt oder durch eine „online“-Kopplung mittels APCI-MS analysiert. Dabei konnten sowohl die Molekulargewichte der einzelnen TAGs bestimmt, als auch ihre FA-Zusammensetzung aufgrund der Detektion charakteristischer Fragmentationen nachgewiesen werden (siehe auch 4.1). In Abb.16 sind exemplarisch die PSD-Spektren von TAGs aus HPLC-Fraktionen von Sonnenblumen- und Macadamiaöl zu sehen. In beiden Fällen konnte die Identität der Acylgruppen eindeutig bestimmt werden. In dieser Weise war es möglich TAGs aus den verschiedensten, tw auch sehr komplexen Pflanzenölen zu analysieren. Eine Zusammenfassung aller in den untersuchten Ölen gefundener TAG-Spezies ist in Tab.3 (Anh.) zu finden.







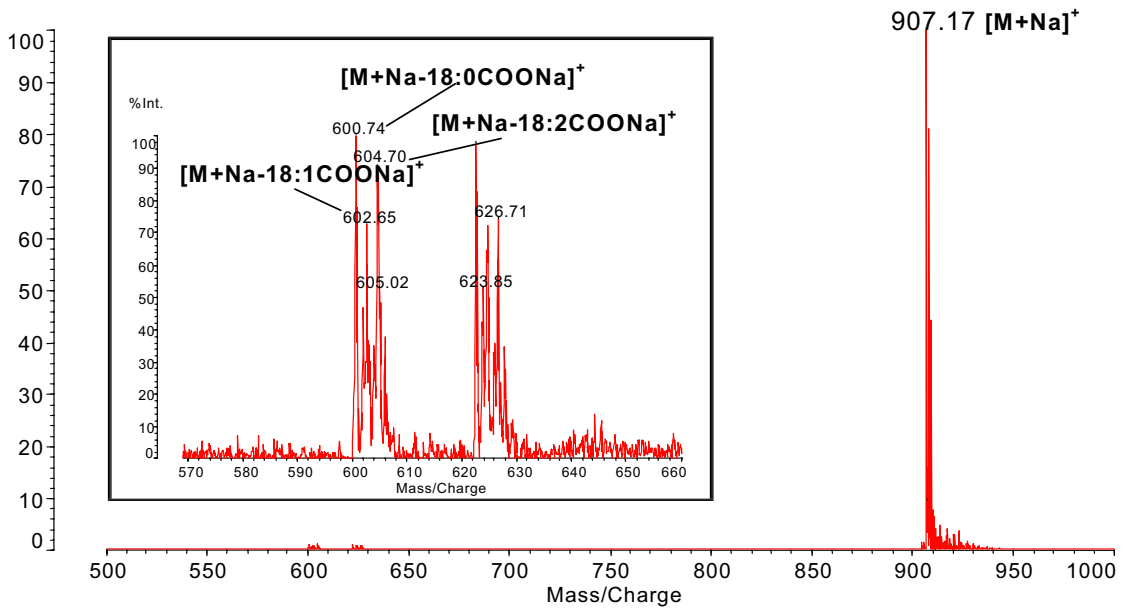




**Abb.15** HPLC-Chromatogramme von a) Olivenöl, b) Haselnussöl, c) Macadamiaöl, d) Kürbiskernöl, e) Sojaöl, f) Rapsöl, g) Sonnenblumenöl (Standard), h) Sonnenblumenöl (Sorte: Olbaril) und i) Sonnenblumenöl (Sorte: Proleic). Dargestellt sind die UV-Spuren detektiert bei  $\lambda = 210\text{nm}$ .

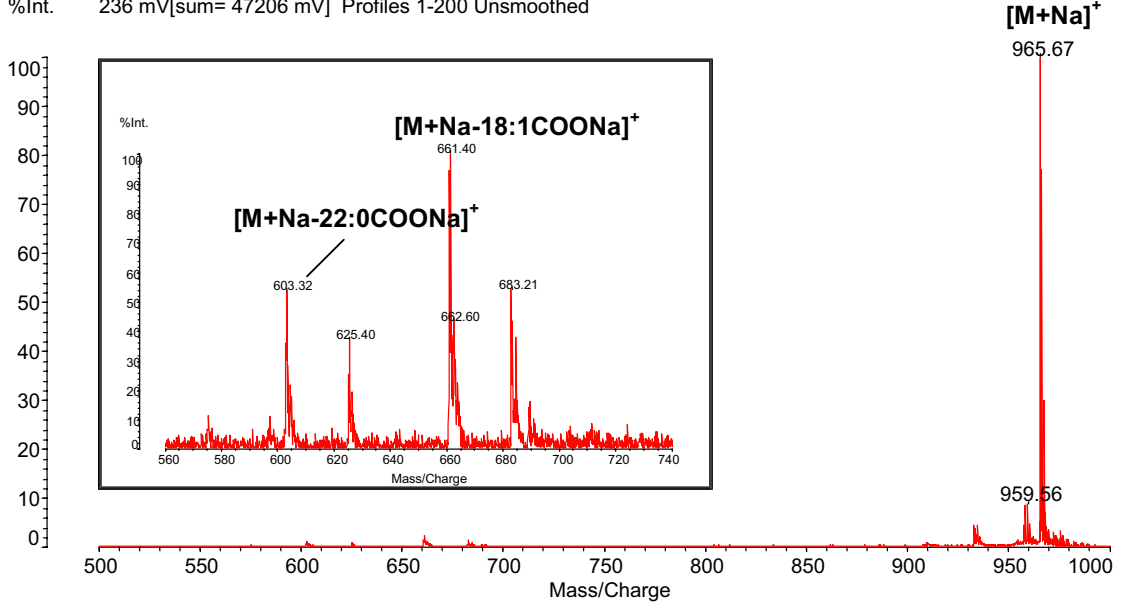
a)

%Int. 338 mV[sum= 50738 mV] Profiles 1-150 Unsmoothed



b)

%Int. 236 mV[sum= 47206 mV] Profiles 1-200 Unsmoothed



**Abb.16** MALDI-PSD Spektren von Fraktionen aus HPLC-getrennten Pflanzenölen. a)  $[MNa]^+$   $m/z$  907 aus Fraktion 12 von Sonnenblumenöl (identifiziert als sn-1-Linoleoyl-2-Oleoyl-3-Stearoylglycerin) und b)  $[MNa]^+$   $m/z$  966 aus Fraktion 15 von Macadamiaöl (identifiziert als sn-1,2-Dioleoyl-3-Behenoylglycerin)

Von Interesse ist auch noch die exakte FA-Position am Glyceringrundkörper. Unsere Untersuchungen zeigten nun, dass eine gewisse Positionsspezifität (sn-1, 2, 3) von FAs in den TAGs zu beobachten ist. Dabei konnten Öl- (18:1) und Linolsäure (18:2) vor allem in sn-2 Position gefunden werden, wobei gesättigte oder längerkettige FAs (C20 bis 22) vor allem in sn-1/3 Stellung dominieren.

Die Verteilung der einzelnen FAs in den einzelnen TAGs war dabei in den verschiedenen Ölen recht unterschiedlich. Dabei zeigte sich, dass manche TAGs und FAs sehr universell auftreten und in den meisten Pflanzenölen nachgewiesen werden können (z.B. OOO, OOP, OOS, POL, LLL), während andere relativ spezifisch sind und daher auch als „Marker“ für bestimmte Öle dienen können. Solche TAGs konnten z.B. in Macadamiaöl detektiert werden, wo besonders palmitolein- (16:1) oder heptadecensäurehaltige (17:1) Komponenten gefunden werden konnten. Bestimmte langkettige FAs, besonders Lignocerin- (24:0) oder Behensäure (22:0), finden sich in TAGs von Sonnenblumenöl, während linolensäurehaltige (18:3) Komponenten besonders in Soja- und Rapsöl nachgewiesen werden konnten. Im Fall mancher TAG Nebenkomponenten oder auch koeluerender TAGs konnten aufgrund zu geringer Signalintensitäten der PSD-Fragmente keine positiven bzw. eindeutigen Ergebnisse mit der „offline“ HPLC/MALDI-MS erzielt werden. In solchen Fällen erwies sich die „online“ HPLC Kopplung mit APCI-MS als hilfreich. In den APCI Massenspektren zeigten sich dann, im Gegensatz zu MALDI-MS, noch weitere  $[M+H]^+$  Molekülonen. Die Signalintensität der  $[M+H]^+$  Ionen waren dabei, aber stark vom Sättigungsgrad der Komponenten abhängig. Bei stärker gesättigten (bzw. wenig ungesättigten) TAGs kam es aber zu nur geringen  $[M+H]^+$  Signalintensitäten. Alle APCI Massenspektren im positiven Ionenmodus zeigten intensive Diglyceridfragmentationen (sogar bei TAGs mit völlig gesättigten FAs). Darauf basierend, war auch in allen Fällen die Bestimmung der TAG Struktur möglich. Bei manchen, koeluerenden Nebenkomponenten, die mittels MALDI und PSD nicht charakterisiert werden konnten, gelang dies aber auch nicht mittels „online“ HPLC/APCI-MS. In diesen Fällen zeigten die Massenspektren oft ein komplexes Diglyceridfragmentierungsmuster, das jedoch keinem Molekülion klar zugeordnet werden konnte. Im Vergleich zu MALDI-MS, mit



allgemein sehr geringen Fragmentationenintensitäten (ca. 5% relative Intensität), konnte die starke Fragmentierung in der APCI-MS für die Interpretation der TAG Strukturen herangezogen werden. Auch konnten mittels „online“ HPLC/APCI-MS spät eluierende TAGs identifiziert werden, die aufgrund von zu schwachen UV-Signalen in der HPLC nicht detektiert und somit auch nicht sinnvoll fraktioniert werden konnten. Die, in verschiedenen Pflanzenölen zusätzlich (also nicht mittels MALDI-MS gefunden) detektierten TAG Komponenten, sind in Tab.5 aufgelistet. Dabei zeigte sich auch in allen ölsäurereichen Ölen eine sehr ähnliche Zusammensetzung der spät-eluierenden TAG Komponenten (Retentionszeit > 60 min).

<b>Analysiertes Pflanzenöl</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>	<b>m/z Werte [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>TAG-Struktur</b>
SONNENBLUMENÖL (NORMAL)	58	887.9	<b>OOS</b>
	60	861.9	<b>OPS</b>
	70	967.9	<b>LLLc</b>
	71	941.9	<b>BOS</b>
	90	969.9	<b>LLcO</b>
	92	943.8	<b>BOO</b>
SONNENBLUMENÖL (Sorte: PROLEIC)	71	941.8	<b>BLO</b>
	73	915.9	<b>AOO</b>
	76	889.8	<b>OSS</b>
	92	943.8	<b>BOO</b>
SONNENBLUMENÖL (Sorte: OLBARIL)	75	889.8	<b>OSS</b>
OLIVENÖL	20	879.6	<b>LLnO</b>
	73	915.9	<b>AOO</b>
	76	889.9	<b>OSS</b>
	92	943.8	<b>BOO</b>

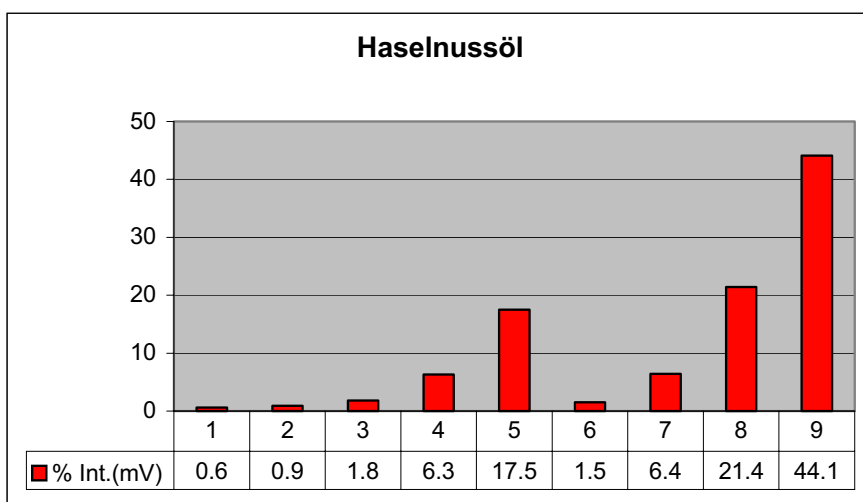
HASELNUSSÖL	73	915.7	<b>AOO</b>
	76	889.9	<b>OSS</b>
MACADAMIAÖL	26	855.7	<b>POL</b>
	27	829.7	<b>PPoL</b>
	33	857.7	<b>LPO</b>
KÜRBISKERNÖL	70	967.9	<b>LLLc</b>
	85	969.9	<b>LlcO</b>

**Tab.5** Zusätzliche TAGs, die mittels „online“ HPLC/APCI-MS in verschiedenen Pflanzenölen gefundenen werden konnten. Aufgeführt sind nur die TAG-Komponenten, die mittels „offline“ HPLC MALDI-MS und nachfolgender PSD-Analyse nicht charakterisiert werden konnten.

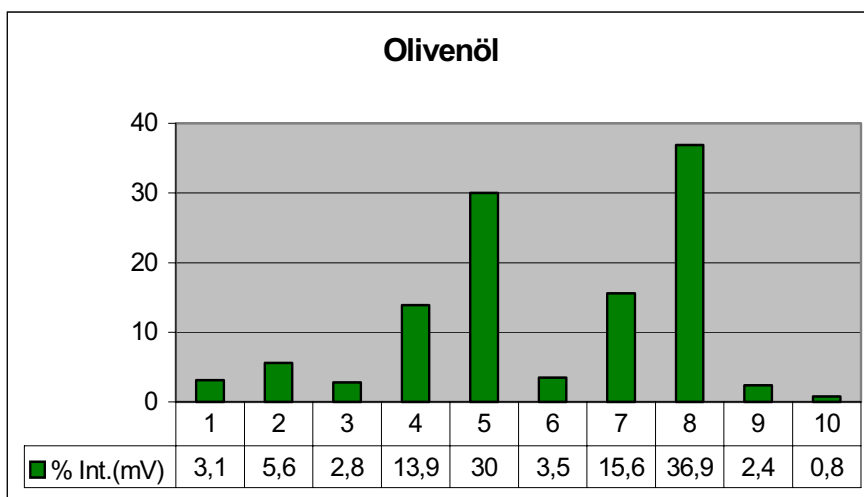
### 3.3 Quantitative Aspekte

Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine exakte, relative Quantifizierung von TAGs in komplexen Pflanzenölen eine anspruchsvolle Aufgabe darstellt, insbesondere durch eine mehr oder weniger starke Abhängigkeit der individuellen TAG Signalintensitäten vom eingesetzten Detektionssystem. Bei UV-Detektion, die häufig in der HPLC eingesetzt wird, erfolgt die Absorption des UV-Lichts besonders durch die Doppelbindungen der FAs in den TAGs und die Signalintensitäten sind in diesem Fall stark vom Sättigungsgrad der TAG/FA-Komponenten abhängig. Einen sehr ähnlichen Effekt konnten wir auch bei APCI-MS beobachten, wo es zu geringeren Signalintensitäten der  $[M+H]^+$  Ionen von mehr gesättigten TAGs kam bei gleichen molaren Substanzmengen. Bei diesen, beiden Methoden entsprechen die Signalintensitäten der Einzelsubstanzen daher nicht den realen Mengenverhältnissen in den Ölproben. Im Gegensatz dazu, zeigten sich bei ESI- und MALDI-MS eine wesentlich schwächer ausgeprägte Beeinflussung der Signalintensität durch ungesättigte versus gesättigten TAGs/FAs. Dieser noch vorhandene, aber schwache Effekt ist entweder eine direkte Folge des Desorption/Ionisierungsprozesses selbst, könnten aber auch besonders bei MALDI-MS das Ergebnis von Aggregationsvorgängen der TAGs in der Matrix sein. Dabei könnten sich in Abhängigkeit von der Hydrophobizität der TAGs verschiedene Schichtungen von Molekülen ausbilden, die sich dann im Desorptionsvorgang widerspiegeln. Es könnte sich dabei um ein Phänomen handeln, das auch in der PD-MS beobachtet wurde, wobei TAGs mit kürzeren FA-Ketten vor allem an der Matrixoberfläche konzentriert wurden (26). Dieser Segregationseffekt könnte dabei besonders stark bei Mischungen von chemisch mehr unterschiedlichen Verbindungen ausgeprägt sein. Pflanzenöle enthalten zwar eine grosse Anzahl verschiedener TAGs, die jedoch einen relativ homogenen chemischen Charakter aufweisen. Unsere MALDI-MS Experimente zeigten, dass ein schwacher quantitative Effekte zu finden ist. Der Vergleich unserer relativen quantitativen MALDI-MS Daten ausgewählter Pflanzenöle mit Literaturdaten (6), demonstrierte aber einen sehr ähnlichen Gehalt an den einzelnen TAG-Komponenten. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, dass die Verwendung von flüssigen Matrices auch zu diesen guten Ergebnisse geführt hat, da sie aufgrund der flüssigen Matrixphase zu einer sehr homogenen

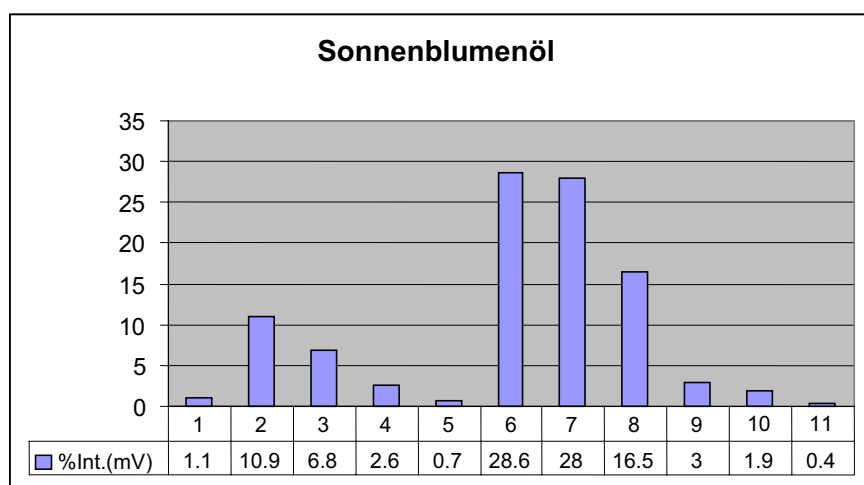
Analytverteilung führen. In Abb.17 sind die quantitativen Resultate einer statistischen MALDI-MS Untersuchung an vier verschiedenen Pflanzenölen dargestellt. Die gefundenen Werte stellen das Ergebnis einer Serie von drei unabhängigen MALDI-MS Messungen (unterschiedliche Präparationen) basierend auf den Signalintensitäten einzelner TAG-Spezies dar, wobei jeweils 150 Profiles (Massenspektren) akkumuliert wurden. Die Standardabweichungen (SD) lagen dabei im Bereich von 4-20% der individuellen TAG-Werte. Höhere SD wurden im Fall von Nebenkomponenten aufgrund einer schlechteren Ionenstatistik registriert. Diese Ergebnisse zeigen, dass MALDI-MS neben strukturellen Informationen auch rasch semiquantitative (relative) Ergebnisse in der TAG-Analyse liefern kann. Weitere Untersuchungen für die Entwicklung genauer quantitativer Methoden mittels markierter TAGs in der Pflanzenölanalyse erscheinen daher sehr vielversprechend.



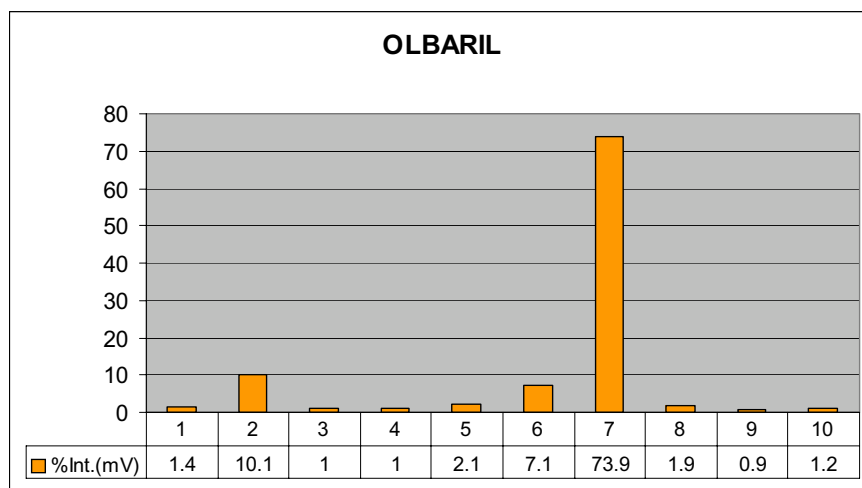
	<b>TAG</b>	<b>[%] und SD<sup>a</sup></b>	<b>[%] Literaturwerte<sup>b</sup></b>
1	LPP	0.6±15.1	0-1
2	OPP	0.9±11.8	1-2
3	LLP	1.8±13.0	0.5-2
4	LOP	6.3±5.8	3-6
5	OOP (+LPS)	17.5±6.5	10-18
6	LLL	1.5±5.2	0.5-4
7	LLO	6.4±9.4	2-11
8	LOO	21.4±7.7	10-24
9	OOO	44.1±4.4	36-57



	<b>TAG</b>	<b>[%] und SD<sup>a</sup></b>	<b>[%] Literaturwerte<sup>b</sup></b>
1	LPP	3.1±13.4	—
2	OPP	5.6±13.2	3
3	LOPo	2.8±13.0	—
4	LOP	13.9±15.1	4
5	OOP	30.0±19.6	23
6	LLO (+LOPo)	3.5±17.5	1
7	LOO	15.6±18.2	10
8	OOO	36.9±16.9	45
9	—	2.4±44.4	—
10	ALO	0.8±28.9	—



	<b>TAG</b>	<b>[%] und SD<sup>a</sup></b>	<b>[%] Literaturwerte<sup>b</sup></b>
1	LPP	1.1±3.2	0.8
2	LLP	10.9±5.7	8.9
3	LOP	6.8±8.0	6.4
4	LPS	2.6±4.6	1.2
5	—	0.7±6.0	—
6	LLL	28.6±5.3	20.6
7	LLO	28.0±3.9	25.9
8	LOO (+LLS)	16.5±6.0	11.8
9	OOO (+LSO)	3.0±5.2	2.5
10	—	2.0±10.0	—
11	BLO	0.5±5.9	—



	<b>TAG</b>	<b>[%] und SD<sup>a</sup></b>	<b>[%] Literaturwerte<sup>b</sup></b>
1	LOP (+OOPo)	1.4±0.9	1.6 LOP
2	OOP	10.1±3.3	10
3	—	1.0±20.9	—
4	LLL	1.0±9.7	1.5
5	LLO (+LnOO)	2.1±9.3	2.3 LLO
6	LOO (+LLS)	7.1±4.0	6.7 LOO
7	OOO	73.9±0.3	73.9
8	—	1.9±4.5	—
9	—	0.9±6.0	—
10	BOO	1.2±9.0	—

**Abb.17** Semiquantitative Analyse von TAGs in Pflanzenölen mittels MALDI-MS ausgedrückt als % Satz der einzelnen TAGs an der Gesamttriglyceridmenge (100%). Werte stellen den Mittelwert aus unterschiedlichen Probenpräparationen unter denselben Messbedingungen dar (150 Profiles, fixe Laserenergie: 90 Einheiten). In der Tabelle sind weiters die Standardabweichungen (SD) in %<sup>(a)</sup> für die Messwerte einzelner TAGs, sowie die gefundenen Literaturwerte der TAG Verteilung in %<sup>(b)</sup> angegeben.

**Anmerkungen:** Alle berechneten Mittelwerte (% mV) beziehen sich auf die C<sup>12</sup> peaks der einzelnen Komponenten. Aufgrund der Isotopenauflösung können sich bei TAGs mit einem Massenabstand von Δm=2 Da die C<sup>12</sup> Signale mit dem zweiten C<sup>13</sup> Isotopomer der vorhergehenden Komponente überlagern. In diesem Fall muss für eine exakte Berechnung die Intensität dieses Signals (bestimmt aus dem theoret. Isotopenmuster des entsprechenden Moleküls) berücksichtigt werden. Als Referenz kann das erste C<sup>13</sup> Isotopomer herangezogen werden, dessen Intensität praktisch konstant ist (bei m/z 900 beträgt das Intensitätsverhältnis ≈ 3 : 1). Daraus kann auch ermittelt werden, ob das zweite C<sup>13</sup> Isotopomer von einem C<sup>12</sup> Peak einer anderen TAG-Komponente mit geringer Intensität überlagert wird.

## 4. STRUKTURCHARAKTERISIERUNG VON LIPIDEN MITTELS MALDI-MS

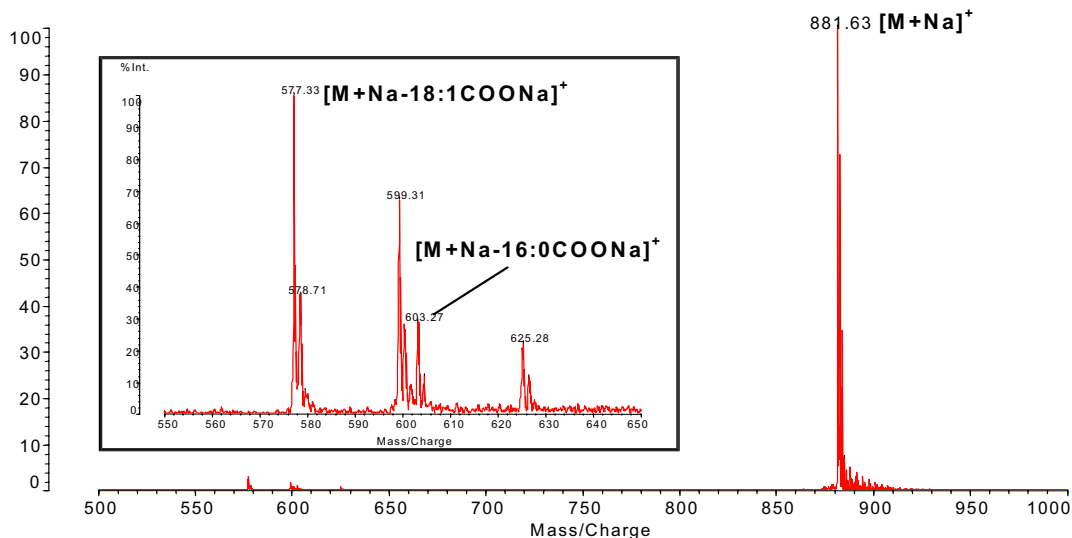
### 4.1 „Post Source Decay“ (PSD)-Fragmentenanalyse von TAGs

Der Einsatz eines MALDI-TOF Instruments mit einem „Curved-Field“ Reflektron (27) ermöglicht aufgrund der direkten Vergleichbarkeit der Signalintensitäten aller detektierter Fragmentationen im PSD Modus (alle Fragmentationensignale werden praktisch simultan detektiert), Informationen über bestimmte Primärstrukturen der Analyten und über bevorzugte Fragmentierungskanäle dieser zu erhalten. Die PSD-Spektren von TAGs zeigte dabei zwei Typen von diglyceridartigen Fragmenten, die aus der Abspaltung der Acylreste vom Glycerin stammen:  $[M+Na-RCOOH]^+$  Ionen und die dominierenden  $[M+Na-RCOONa]^+$  Ionen, die zur Bestimmung der FA-Zusammensetzung herangezogen wurden. Experimente mit Positions-isomeren haben gezeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den Signalintensitäten dieser Fragmente und der Stellung der FAs in den TAGs besteht. Dabei konnte eine bevorzugte Abspaltung aus der sn-1/3 Position festgestellt werden. Eine Beobachtung, die auch bei anderen Desorption/Ionisierungstechniken beschrieben wurde (28 - 30). In Abb.18 ist das PSD-Spektrum von sn-1,3-Dipalmitoyl-2-Oleoylglycerin (POP) und sn-1,3-Dioleoyl-2-Palmitoylglycerin (OPO), zu sehen. Die dominierenden Fragmentationen (PO oder OP) stammen in beiden Fällen aus der Abspaltungen der Acylgruppen aus der sn-1/3 Position. Entsprechende Fragmente (PP oder OO), FA-Abspaltung aus der sn-2 Stellung, zeigen dagegen um ca. 60% verminderte Intensitäten. Diese Beobachtung konnte im Fall von TAGs mit nur zwei unterschiedlichen FAs gemacht werden, wobei eine Signalmultiplizierung bei den Fragmenten aus der Abspaltung der beiden identischen FAs zu berücksichtigen ist. Im Vergleich von sn-1,2-Dipalmitoyl-3-Oleoylglycerin (PPO) zu sn-1,3-Dipalmitoyl-2-Oleoylglycerin (POP) zeigte sich eine Zunahme der Signalintensitäten der  $[M+Na-18:1COONa]^+$  Ionen um ca. 30%. Dieser Effekt kann durch die Stellungsänderung der Ölsäure aus sn-2 zu sn-3 erklärt werden. Im Fall von TAGs mit drei verschiedenen FAs

konnten ebenfalls solche Fragmentationenintensitätsunterschiede mit Positionsunterschieden korreliert werden. Die Signale von Abspaltungen aus der sn-2 Position zeigte dabei 30-40% geringere Intensitäten gegenüber

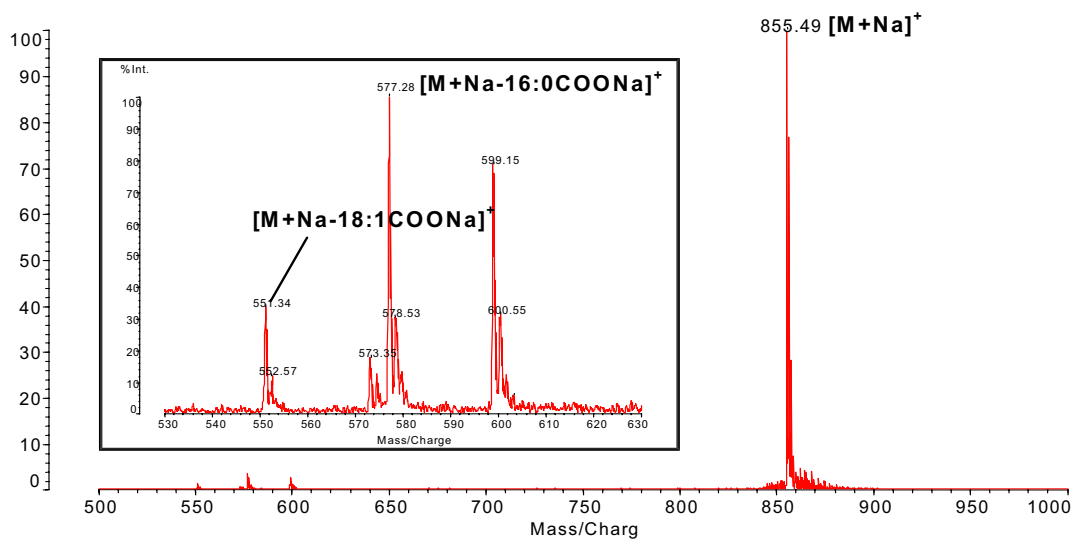
a)

%Int. 235 mV[sum= 46906 mV] Profiles 1-200 Unsmoothed



b)

%Int. 154 mV[sum= 30784 mV] Profiles 1-200



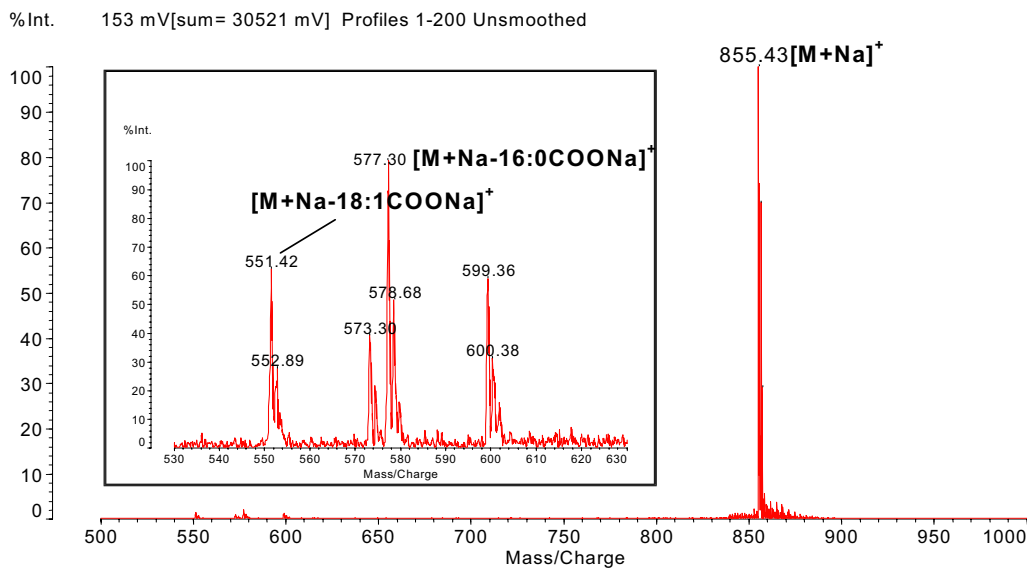
**Abb.18** MALDI PSD-Spektren von a) sn-1, 3-Dioleoyl-sn-2-Palmitoylglycerin (POP) und b) sn-1, 3-Dipalmitoyl-sn-2-Oleoylglycerin (OPO). In den kleinen Fenstern sind die entsprechenden Diglyceridfragmentationen zu sehen, die jeweils intensivsten Signale (100% Int.) stammen aus der Abspaltung der Fettsäuren in sn-1/3 Position.

solchen aus sn-1/3. In Abb.19 ist das PSD-Spektrum von sn-1-Palmitoyl-2-Oleoylglycerol-3-Linoleoylglycerin (POL) zu sehen. Die  $[M+Na-18:2COONa]^+$

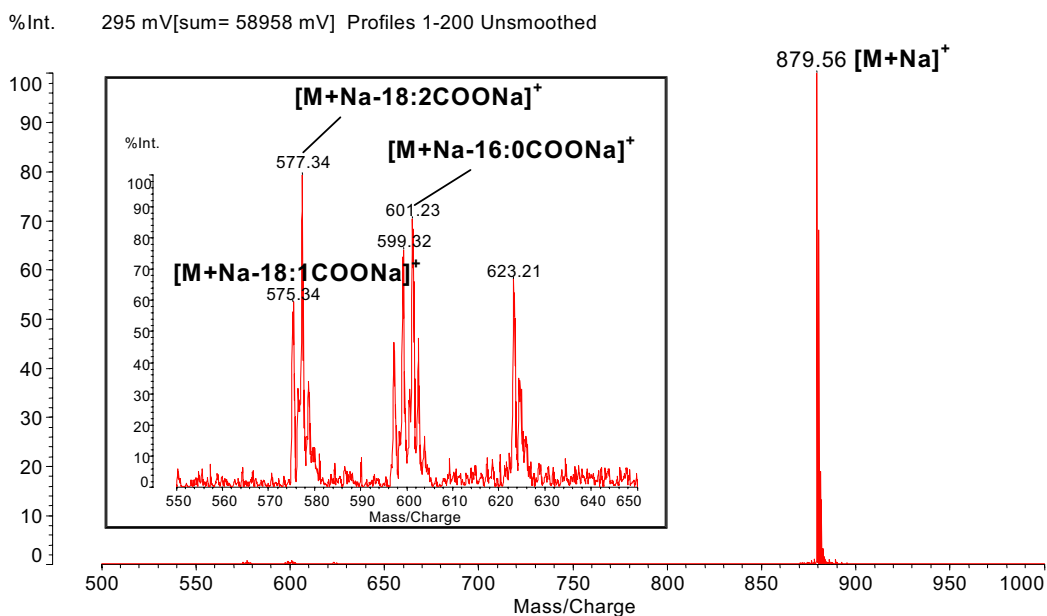


und  $[M+Na-16:0COONa]^+$  Ionen zeigen dabei relative Signalintensitäten von 100% und 90%. Im Gegensatz dazu weisen die  $[M+Na-18:1COONa]^+$  Ionen aus dem Verlust der Ölsäure in sn-2 Position nur ca. 60% relative Intensität auf.

a)



b)

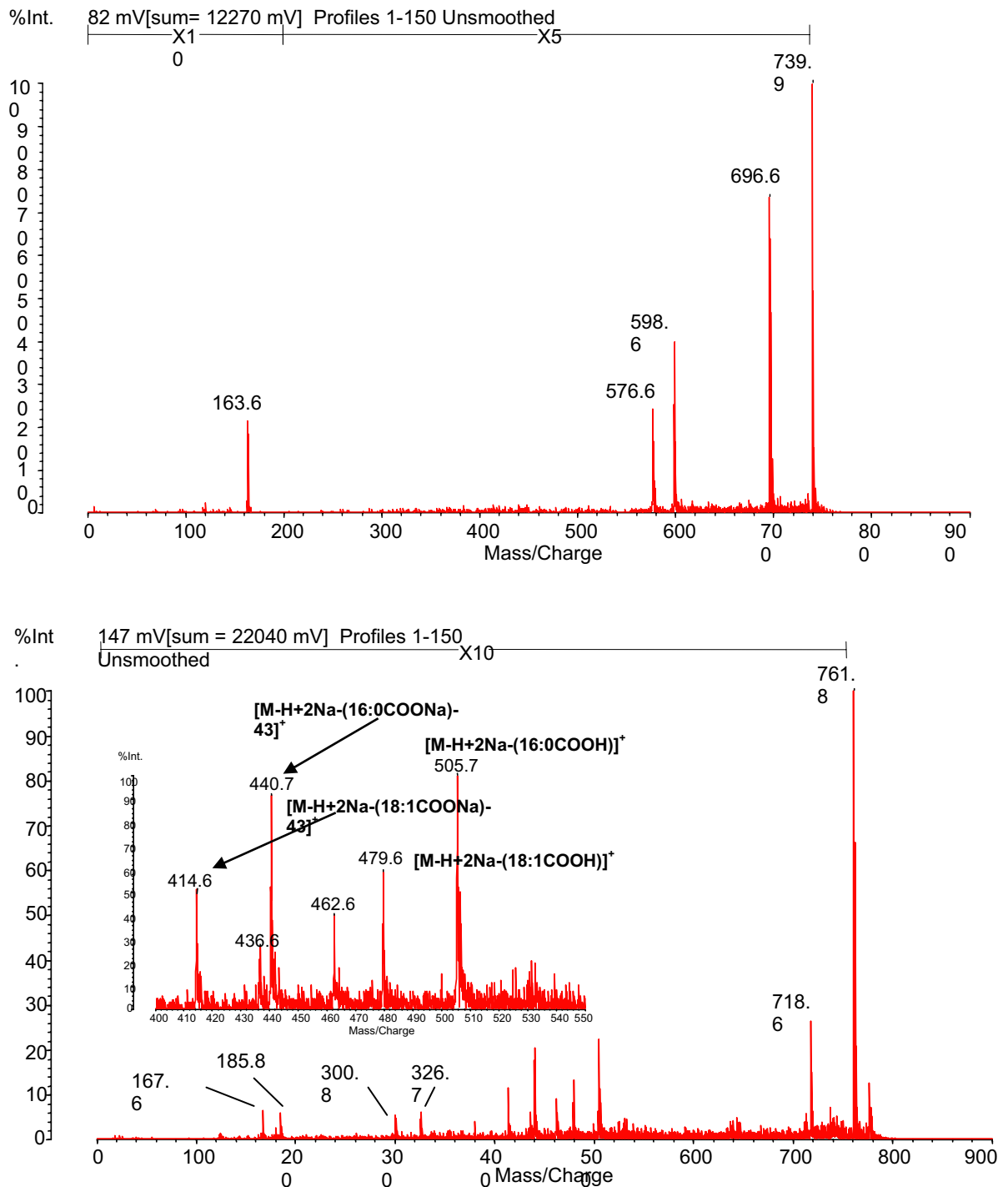


**Abb.19** MALDI PSD-Spektren von a) sn-1, 2-Dipalmitoyl-sn-3-Oleoylglycerin (PPO) und b) sn-1-Palmitoyl-sn-2-Oleoyl-sn-3-Linoleoylglycerin (POL). Die Stellungsverschiebung der Ölsäure in die sn-3 Position in PPO bewirkt eine Signalverstärkung des Fragmentations um ca. 30% (Vergl. Abb.17 b). Im unteren Spektrum (b) stammen die intensivsten Fragmentationen auch aus der sn-1/3 Abspaltung der Acylreste.

## 4.2 PSD-Fragmentationsanalyse von Phospho (PLs) - und Glykolipiden (GLs)

Die unterschiedlichen PL-Klassen sind durch die polaren Kopfgruppen definiert, während sich einzelne PL-Spezies in der Zusammensetzung ihrer FAs unterscheiden. Unsere Untersuchungen waren daraufhin ausgerichtet, ob charakteristische Fragmentationen für eine Differenzierung dieser Lipide mittels MALDI-MS nachgewiesen werden können. Wie im Fall der TAGs wurden auch hier PSD-Experimente unter Verwendung eines hochauflösenden „Curved-Field“ Reflektors durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass generell von allen untersuchten Lipiden klassenspezifische Kopfgruppenfragmente, wie auch Fragmentationen aus der Abspaltung der Acylgruppen (FA) gefunden werden konnten. Eine vollständige Zusammenstellung der mittels PSD-Analyse gefundenen klassenspezifischen Fragmente der untersuchten Lipide ist in Tab.4 (Anh.) zu finden. Alle diese Experimente wurden mit der MALDI Matrix THAP unter Zusatz von Natrium- oder Lithiumacetat ausgeführt (siehe 2.2). Dabei zeigte sich, dass FA-spezifische Fragmentationen nur von alkalihaltigen Molekülonen generiert werden konnten. Ähnlich wie bei den TAGs war es auch hier möglich zwischen der sn-1 und sn-2 Position aufgrund von Intensitätsunterschieden von spezifischen Fragmentationen zu unterscheiden. Es zeigte sich auch hier eine bevorzugte Abspaltung der Acylreste aus der sn-1 („randständigen“) Position des Glycerins. Unsere Studie ergab, dass der energetische Zustand (interne Energie) der Vorläuferionen für die PSD-Analyse wesentlich die Natur und Menge der generierten Fragmentationen beeinflusst. Unter denselben MALDI-Ionenquellenbedingungen zeigten Lithiumaddukte ( $[M+Li]^+$ ) die meisten strukturellen Fragmente im Vergleich zu Natrium- oder Kaliumaddukten. In den sogenannten „weichen“ Ionisierungsprozessen, wie MALDI oder ESI, sind Fragmentierungsvorgänge generell schwach ausgeprägt und sind sehr stark von energetischen Zuständen der Analyten abhängig. So zeigte sich im Fall von  $[M+H]^+$  Ionen der meisten PLs keine signifikante Fragmentierung. Im PSD-Spektrum der  $[M+H]^+$  Ionen von PCs konnte nur ein einziges, intensives Fragmentation bei  $m/z$  184 detektiert werden, das aus dem Verlust von Cholinphosphat stammt. Die Verwendung von Alkaliaddukten (Na oder alternativ Li)

als Vorläuferionen begünstigt hingegen die gleichverteilte und tw. stärkere Dissoziation dieser Molekülionen. In Abhängigkeit von der Lipidklasse, konnte Fragmentierung besonders stark in PSD-Spektren von  $[M-H+2Na(Li)]^+$  oder  $[M-2H+3Na(Li)]^+$  nachgewiesen werden. In Abb.20 sind die PSD-Spektren der  $[M+Na]^+$  und  $[M-H+2Na]^+$  Ionen von sn-1-Palmitoyl-2-Oleoyl-PE zu sehen.



**Abb.20** MALDI PSD-Spektrum des Vorläuferions  $[M+Na]^+$  (oben) und  $[M-H+2Na]^+$  (unten) von sn-1-Palmitoyl-2-Oleoyl-PE.

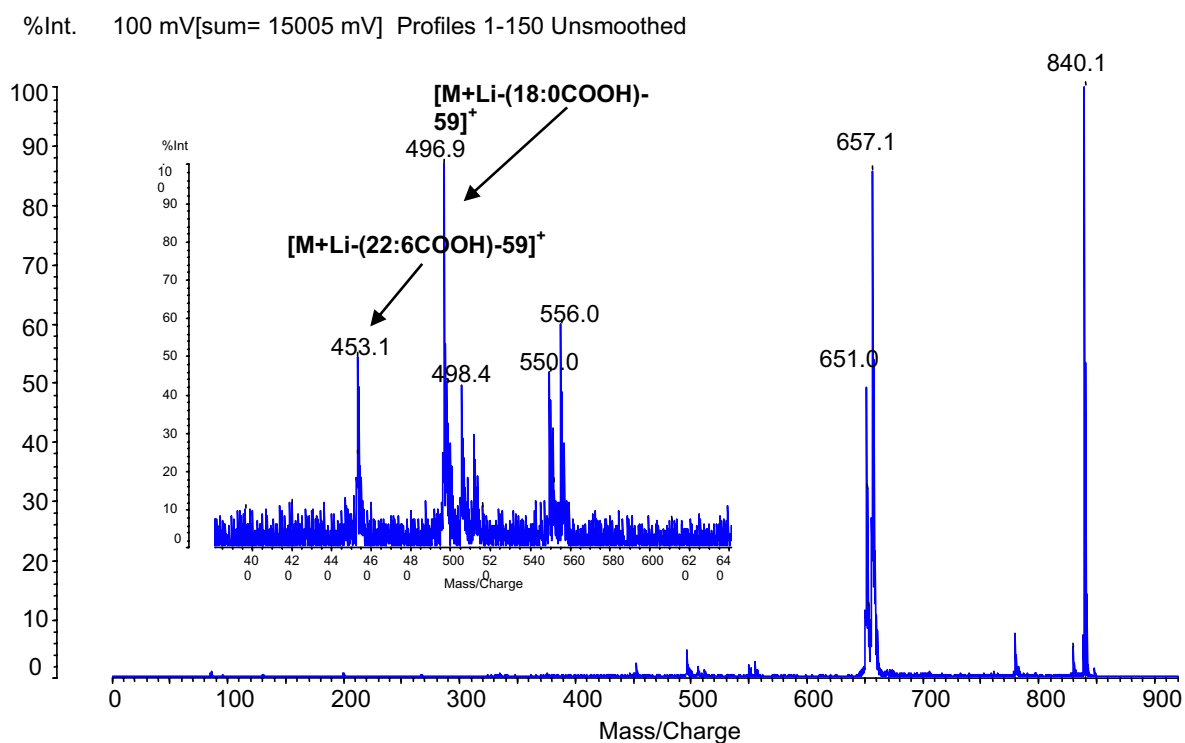
Das PSD-Spektrum der  $[M+Na]^+$  Ionen zeigt vier Fragmentationen, die alle aus der Kopfgruppe stammen. Besonders der Verlust von Ethanolamin ( $\Delta m = 43$  Da) sowie Ethanolaminphosphat ( $\Delta m = 141$  Da) und das Natriumaddukt von Ethanolaminphosphat ( $m/z$  164) sind charakteristisch für die  $[M+Na]^+$  Ionen von PE als Vorläuferionen. Acylgruppenfragmente fehlen in diesen Spektren vollständig. Im Gegensatz dazu, zeigen die PSD-Spektren von  $[M-H+2Na]^+$  Ionen wesentlich komplexere Spektren. Die charakteristischen Fragmente aus der Kopfgruppe sind die Abspaltung von Ethanolamin ( $\Delta m = 43$  Da) und das Dinatriumaddukt von Ethanolaminphosphat ( $m/z$  186). Zusätzliche Kopfgruppenfragmente in geringerer Intensität konnten bei  $m/z$  168 und  $m/z$  125 nachgewiesen werden. Fragmente aus der Abspaltung der Acylgruppen konnten im Massenbereich zwischen  $m/z$  400 - 550 detektiert werden (Insertbild). Die intensivsten Signale stammen dabei von den  $[M-H+2Na-(RCOOH)]^+$  und  $[M-H+2Na-(RCOONa)-43]^+$  Ionen, wobei letztere aus einer gemeinsamen oder auch konsekutiven (aus  $m/z$  719) Fragmentierung der FAs und Ethanolamin stammen. Das Verhältnis der Produktionsintensitäten war in beiden Fällen ca. 2:1, was wieder für die bevorzugte Acylabspaltung aus der sn-1 gegenüber der sn-2 Position spricht. Somit zeigte sich auch, dass eine Differenzierung zwischen positionsisomeren PE Molekülen von mittels MALDI-PSD-MS möglich ist. Diese Beobachtungen konnten während dieser Studie, auch im Fall verschiedener anderer PL-Klassen gemacht werden. Eine Beobachtung, die bisher nur ansatzweise für ESI-CID-MS Experimente beschrieben wurde (32).

Ausgehend von ESI-MS Experimenten wurden Fragmentierungsprozesse unter Ausbildung von fünf- oder sechsgliedrigen Ringprodukten (z.B. Cyclo- und Amidophosphanstrukturen) postuliert (31). Unsere Experimente zeigten, dass auf Basis der gefundenen  $m/z$ -Werte der Fragmente, sehr ähnliche Fragmentierungsprodukte bzw. -vorgänge auch für MALDI-MS angenommen werden können (Tab.5 Anh.). Generell kann dabei ein zweistufiger kompetitiver Reaktionsmechanismus in Abhängigkeit von der Alkalisalzkonzentration angenommen werden. Vermutlich kommt es dabei zu einer Anlagerung der Alkaliionen an eines der beiden elektronegativen Zentren der Moleküle. Unter niederen Salzkonzentrationen kann eine bevorzugte

Anlagerung an die Phosphatestergruppierung angenommen werden, die natürlich die höchste Alkaliaffinität aufweist, wodurch es zur bevorzugten Bildung von Kopfgruppenfragmenten kommt. In diesem niederen Alkali-konzentrationsbereich überwiegen  $[M+Na(Li)]^+$  Ionen in den MALDI-Massenspektren, die praktisch ausschließlich als Vorläuferionen herangezogen werden können. In einer weiteren Fragmentierungsreaktion kann es zu einer Abspaltung der Acylgruppen kommen, wobei dies aber meist die Anlagerung eines weiteren Alkaliions in der Umgebung der Carboxylestergruppe der FAs schon im Vorläuferion voraussetzt. Die Acylgruppen werden dabei als freie Fettsäuren oder als Alkalisalz abgespalten (ebenfalls bei TAGs beobachtet), meist in Kombination mit Kopfgruppenfragmenten. Der Verlust aus sn-1 ist dabei über sn-2 deutlich gefördert, vermutlich durch die Bildung von sterisch (energetisch) mehr bevorzugten Fragmentierungsprodukten. Diese Spaltungsreaktion wird durch höheren Alkalisalzkonzentrationen gefördert, wobei dies bereits zu MALDI-Massenspektren führt, die von  $[M-H+2Na(Li)]^+$  oder  $[M-2H+3Na(Li)]^+$  Ionen dominiert sind. Damit können diese Vorläuferionenarten praktisch nur mehr für PSD Experimente herangezogen werden.

In Tab.6 (Anh.) sind alle Fragmentationen aus PSD-Spektren der Vorläuferionen  $[M+Na]^+$  und  $[M-H+2Na]^+$  Ionen von PG aufgeführt. Dabei zeigt sich, dass acylgruppenspezifische Fragmente nur im Fall von  $[M-H+2Na]^+$  Ionen detektiert werden konnten. Im Fall von PCs verhindert die quartäre Aminogruppe des Cholins mehrfache Alkalianlagerungen, wodurch es bei dieser Lipidklasse somit nur zur Ausbildung einfacher Alkaliaddukte kommt. Wie unsere Experimente zeigten, konnten dabei FA-spezifische (acylgruppenspezifische) Fragmentationen nur aus den  $[M+Li]^+$  Ionen von PCs generiert werden. In Abb.21 ist das PSD-Spektrum des  $[M+Li]^+$  Ions von sn-1-Stearoyl-2-Docosahexaenoyl-PC zu dargestellt. Die dominierenden Fragmentationen stammen dabei aus der Abspaltung von Cholinphosphat ( $m/z$  657) und dem korrespondierenden Lithiumaddukt ( $m/z$  651). Das Ion bei  $m/z$  781 stammt aus dem Verlust von Trimethylamin direkt vom Vorläuferion. Zusätzliche Fragmentationen aus der Kopfgruppe konnten bei  $m/z$  131 und  $m/z$  86 (Dehydrocholin) detektiert werden. Im Massenbereich von  $m/z$  450 - 600 konnten Fragmentationen aus der Abspaltung der FAs nachgewiesen werden

(Insertbild). Die intensivsten Signale stammen dabei von  $[M+Li-(RCOOH)-59]^+$  Ionen (Abspaltung der Acylgruppen und von Trimethylamin). Der Vergleich der Intensitäten dieser Fragmentationen (Verlust von Stearinsäure ( $m/z$  497) und Docosahexaensäure ( $m/z$  453)) zeigt auch hier wiederum eine bevorzugte FA-Abspaltung aus der sn-1 Stellung am Glycerin.



**Abb.21** MALDI PSD-Spektrum des Vorläuferions  $[M+Li]^+$  ( $m/z$  840) von sn-1-Stearoyl-2-Docosahexaenoyl-PC (22:6/18:0).

Die MALDI PSD-Spektren der Klasse der Glycolipide zeigten hauptsächlich Bindungsbrüche an den glykosidischen Verknüpfungen der Oligosaccharidgruppen. Dabei zeigte sich bereits in den einfachen MALDI-Massenspektren eine stark ausgeprägte „in-source“ Fragmentierung, besonders wenn Sialinsäuren oder aminogruppenhaltigen Monosaccharide vorhanden waren (siehe Abb.7 und 8). Im Gegensatz zu dieser „in-source“ Fragmentierung, konnten von derartigen Glykolipiden nur PSD-Spektren mit geringer Signalintensität und einer niederen Zahl von Fragmentationen beobachtet werden, was einen Nachteil für die detaillierte Strukturanalyse darstellt. Fragmentationen aus der Abspaltung der Acylgruppen oder aus dem

Sphingosin konnten in unseren Experimenten mittels MALDI-PSD-MS überhaupt nicht beobachtet werden (Details siehe 2.2).

## 5. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN VON LIPID-GEMISCHEN

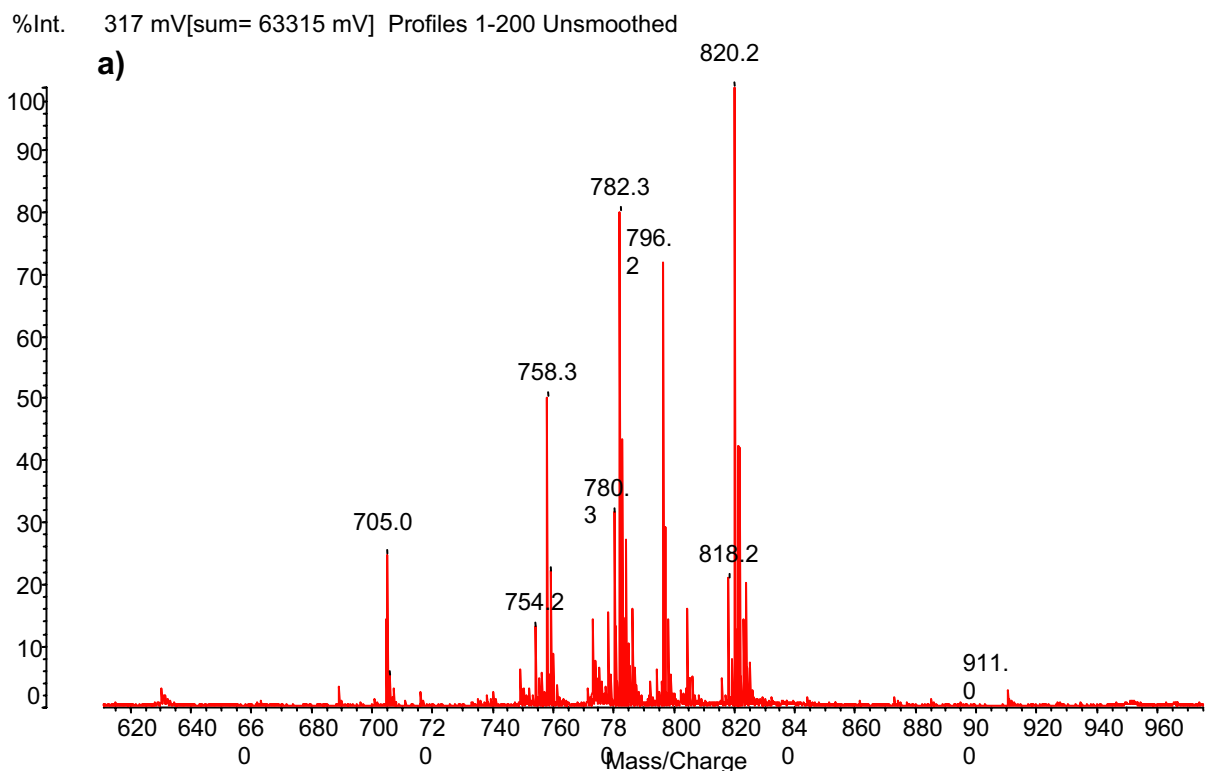
### 5.1 Untersuchung von Lipidmischungen (Bsp. Sojalecithin) mittels MALDI-MS und DC

#### (1) Untersuchung von Sojalecithin direkt mittels MALDI-MS

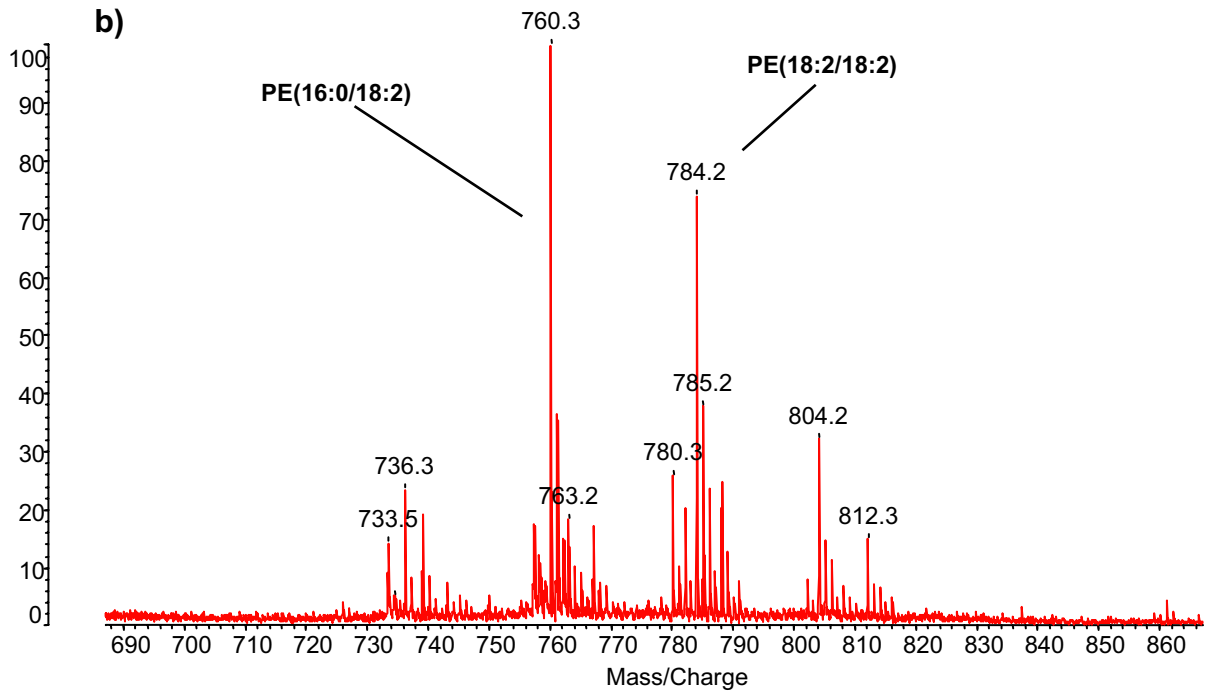
Unsere Experimente zeigten, dass in Mischungen die Molekülionen verschiedener PL-Klassen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Alkalisalzen in der Matrix selektiv verstärkt und somit detektiert werden können. Dabei zeigten PEs z.B. eine besonders hohe Affinität zu Natriumionen, was unter höherer Natriumkonzentration zu einer bevorzugten Generierung von  $[M+H+2Na]^+$  Ionen von PEs führt, währenddessen  $[M+H]^+$  Ionen von PCs besonders unter niederen Natriumkonzentrationen dominieren. Im Gegensatz dazu, zeigten PCs eine hohe Affinität zu Lithiumionen, wobei  $[M+Li]^+$  Ionen von PCs durch Zugabe von Lithiumacetat selektiv verstärkt werden konnten. In Abb.22a ist das MALDI-Massenspektrum von Sojalecithin ( $\sim 100$  ng/ $\mu$ l) zu sehen. Vier dominierende Ionen bei m/z 759, 783, 796 und 820 können beobachtet werden. Nach Zugabe von Natriumacetat ( $>20$ mM) konnten nur noch zwei vorherrschende Ionen bei m/z 760 und 784 detektiert werden (Abb.22b). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Diammoniumhydrogencitrat zur Verstärkung der Molekülionensignale bei m/z 759 und 783. Eine nachfolgende PSD-Fragmentationsanalyse dieser Molekülionen zeigte, dass es sich dabei um die Hauptkomponenten der PEs und PCs des Sojalecithins handelt. Die Zugabe von Ammoniumcitrat Salz führte dabei zu einer selektiven Verstärkung der  $[M+H]^+$  Ionen von sn-1/2-Dilinoleoyl-PC (m/z 759) und sn-1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-PC (m/z 783), während die Peaks bei m/z 796 und 820 von den korrespondierenden  $[M+K]^+$  Ionen stammen, die durch die Citratzugabe unterdrückt wurden (Abb.22c). Andererseits führte die Natriumzugabe zu einer Selektion der  $[M+H+2Na]^+$  Ionen von sn-1/2-Dilinoleoyl-PE (m/z784) und sn-1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-PE (m/z 760), die auf der undotierten Matrix sehr stark von den PC-Signalen unterdrückt waren. Diese Effekte können auch auf andere PL-Klassen zutreffen.



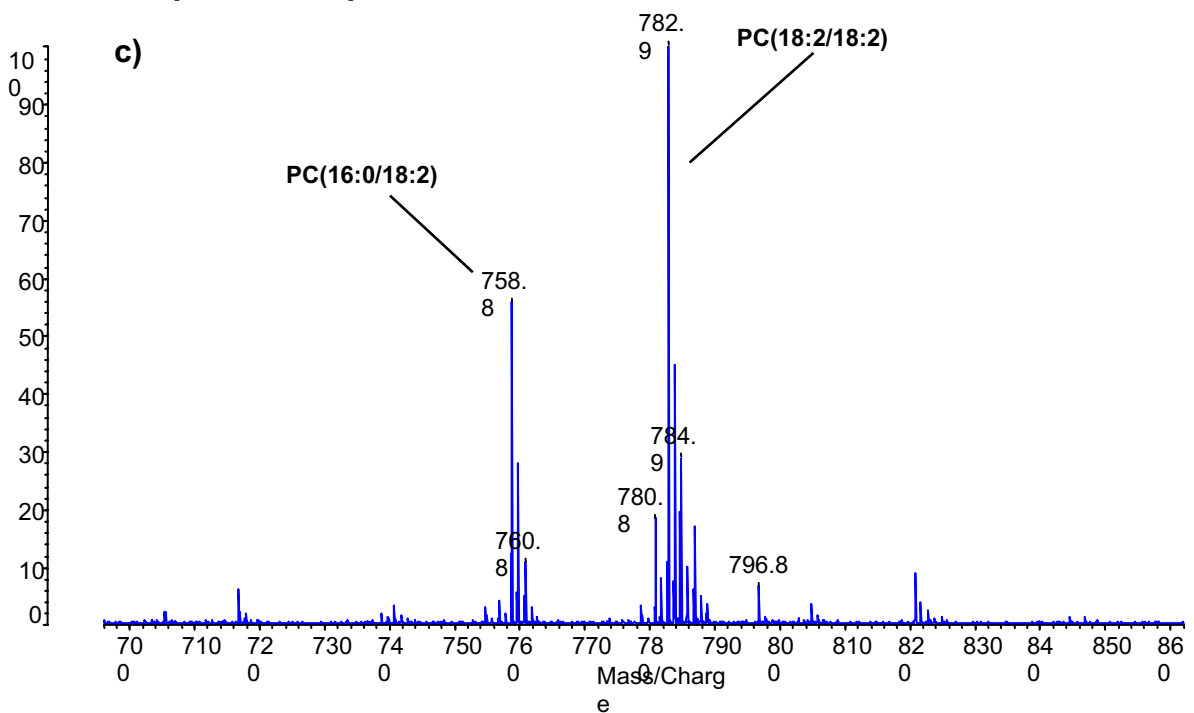
In Abb.23 sind die relativen Signalintensitäten (%) der beobachteten Molekülionen der PE und PC Spezies in Sojalecithin bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (Na- und Li-Acetat) in der MALDI-Matrix THAP zu sehen. In diesen Experimenten zeigten sich primär Wettbewerbseffekte zwischen den  $[M+K]^+$  und  $[M+Na]^+$  Ionen der PCs bei einer Natriumkonzentration von 0.5 - 10 mMol. Bei einer Konzentration über 50 mMol Natriumacetat kam es zu einer dramatischen Verstärkung der  $[M-H+2Na]^+$  Ionenintensitäten der PEs, während die Signalintensitäten der PCs schrittweise reduziert wurden. Die Zugabe von Lithiumacetat in einer Konzentration von 0.01 bis 1 mMol führte zu einem ähnlichen Effekt, allerdings in Bezug auf die Verstärkung der PC-Signalintensitäten. Die  $[M+H]^+$  Ionenintensitäten der PCs zeigten dabei eine sehr starke Abnahme mit zunehmender Salzkonzentrationen ( $> 1$  mMol). Bei mehr als 10 mMol Lithiumacetat wurden die  $[M+Li]^+$  Ionen der PCs zu den dominierenden Molekülionen. Lithiumaddukte von PEs konnten ebenfalls beobachtet werden, erreichten aber nie mehr als 30% relative Intensität in den Massenspektren.



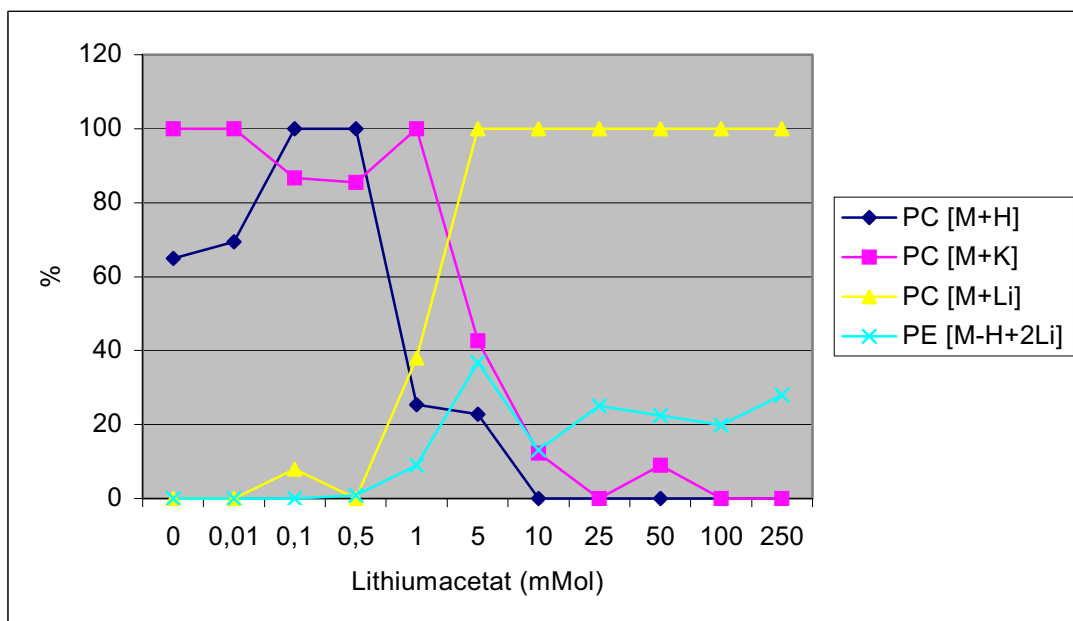
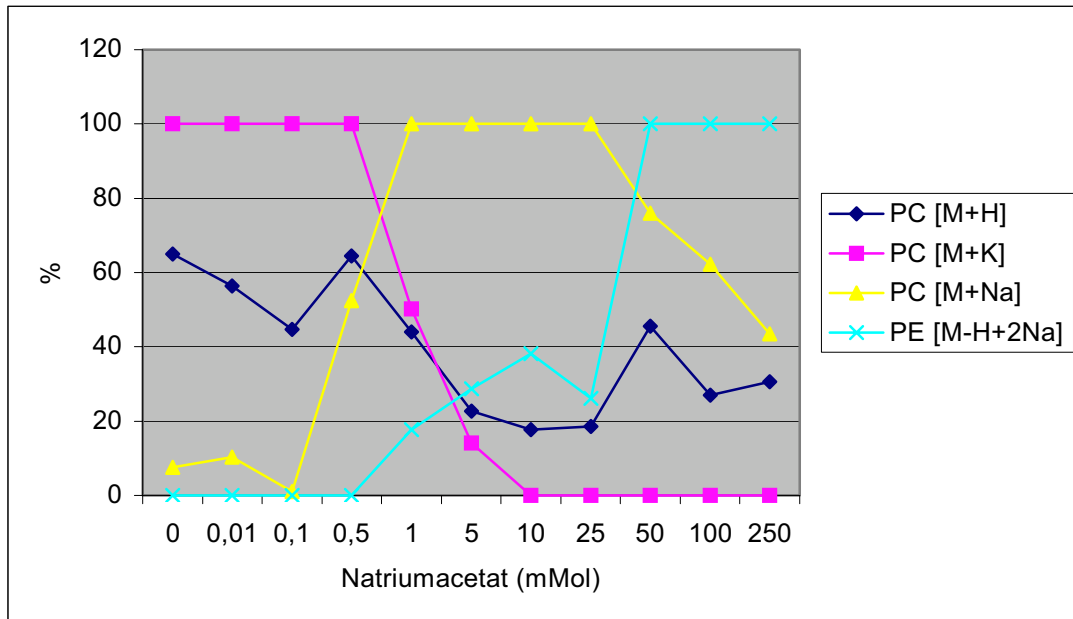
%Int. 66 mV[sum = 13266 mV] Profiles 1-200 Unsmoothed



%Int. 69 mV[sum = 6884 mV] Profiles 1-100 Unsmoothed



**Abb.22** MALDI-Massenspektren von unaufgetrenntem Sojalecithin mit der Matrix THAP (a) ohne Salzzusatz in nativer Form, (b) dotiert mit 20mM Natriumacetat und (c) mit 25mM Diammoniumhydrogencitrat.



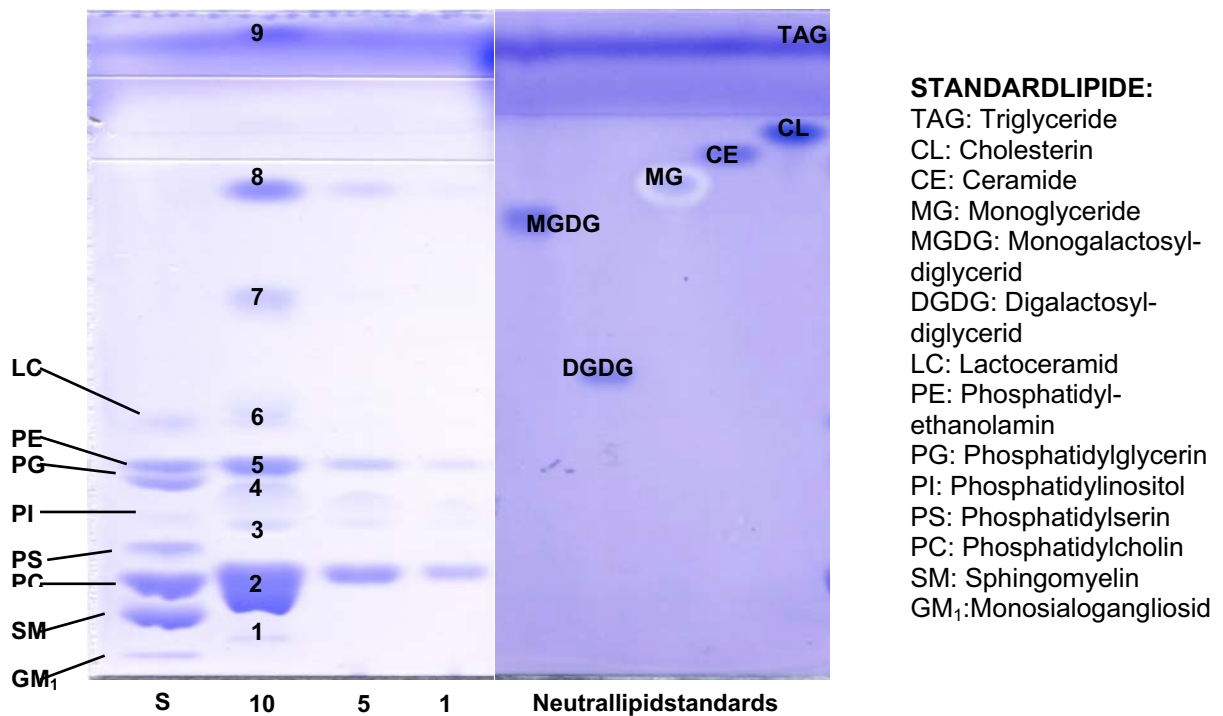
**Abb.23** Abhängigkeit der Molekülonenverteilung von PE and PC Molekülen aus unaufgetrenntem Sojalecithin in Bezug auf die Konzentration von Natrium- und Lithiumacetat in der Matrixlösung. Über einer Konzentration von 50 mM Natriumacetat kommt es zu einer Dominanz der  $[M-H+2Na]^+$  Ionen von PEs (oben). Die Zugabe von mehr als 5 mM Lithiumacetat führt zu einer Dominanz von  $[M+Li]^+$  Ionen der PCs (unten).

Diese Untersuchungen zeigten, dass eine direkte MALDI-MS Analyse von unaufgetrennten Lipidmischungen möglich ist. Eine vorhergehende Auftrennung der diversen Lipidklassen könnte aber zu einer Verbesserung bzw. Vereinfachung der Analyse führen, insbesondere bei der Detektion von Spurenkomponenten oder bei nur geringen Probenmengen, wo stärkere quantitative Unterdrückungseffekte möglich sein könnten.

## **(2) Untersuchung von Sojalecithin mit Dünnschichtchromatographie und nachfolgender MALDI-MS**

Viele Untersuchungen bei der Auftrennung von Lipidmischungen setzen heute auf den Einsatz von HPLC-Methoden, die sich besonders für eine Kopplung mit Sprayionisationstechniken eignen. Der Einsatz von Dünnschichtchromatographie (DC) in Kombination mit MALDI-MS stellt dabei eine interessante, kostengünstigere Alternative dar. DC ist eine klassische Trennmethode, die schon eine lange Tradition in der Lipidanalytik hat (33). Die Vorteile von DC als mikroanalytische Trennmethode sind dabei die einfache Instrumentierung (geringer Kostenaufwand), eine einfache Anwendbarkeit, ein geringer Lösungsmittelverbrauch, die relativ geringe Analysendauer und eine hohe Sensitivität. Untersuchungen haben auch gezeigt, dass auch die Möglichkeit einer direkten Kopplungsmöglichkeit mit MALDI-MS (DC/MALDI-MS) besteht, was auch für unsere Fragestellungen interessant war (34). In unserem Fall setzten wir eine eindimensionale DC mit einem komplexen, zweistufigen Laufmittelsystem, bestehend aus einem polaren Laufmittel 1 (Methylacetat:1-Propanol:Chloroform:Methanol:0.25% KCl, 25:25:25:10:9, v/v/v/v/v) und einem nachfolgenden, apolaren Laufmittel 2 (Toluol:Diethylether:Ethanol:Essigsäure, 60:40:1:0.05, v/v/v/v), ein (35). Zur Detektion wurde eine Färbung der DC-Platten mit einer 0.03% Lösung von Coomassie Brilliant Blue R-250 in 20% Methanol eingesetzt (36). MALDI-Signalunterdrückungseffekte durch den Farbstoff selbst traten in dem angewandten Konzentrationsbereich kaum auf und konnten durch einen nachfolgenden Entfärbungsschritt noch reduziert werden. Das verwendete Trennsystem ermöglichte eine sehr gute Auftrennung der verschiedenen Lipidklassen (im Falle von Sojalecithin konnten 9 verschiedene Lipidklassen, Banden 1 bis 9, detektiert werden) konnten nachgewiesen werden. auf einer Laufstrecke von nur 7 cm mit einer hohen Reproduzierbarkeit (Abb.24). Dabei

konnte ein quantitatives Verhalten der einzelnen Lipidklassen beobachtet werden. Die Coomassiefärbung zeigte eine sehr hohe Empfindlichkeit (Detektionsgrenze der Lipide in Sojalecithin bei  $< 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), wobei einzelne Banden schon unmittelbar nach Färbebeginn sichtbar wurden. Eine optimale Färbung konnte nach ca. 15 bis 20 min erreicht werden.

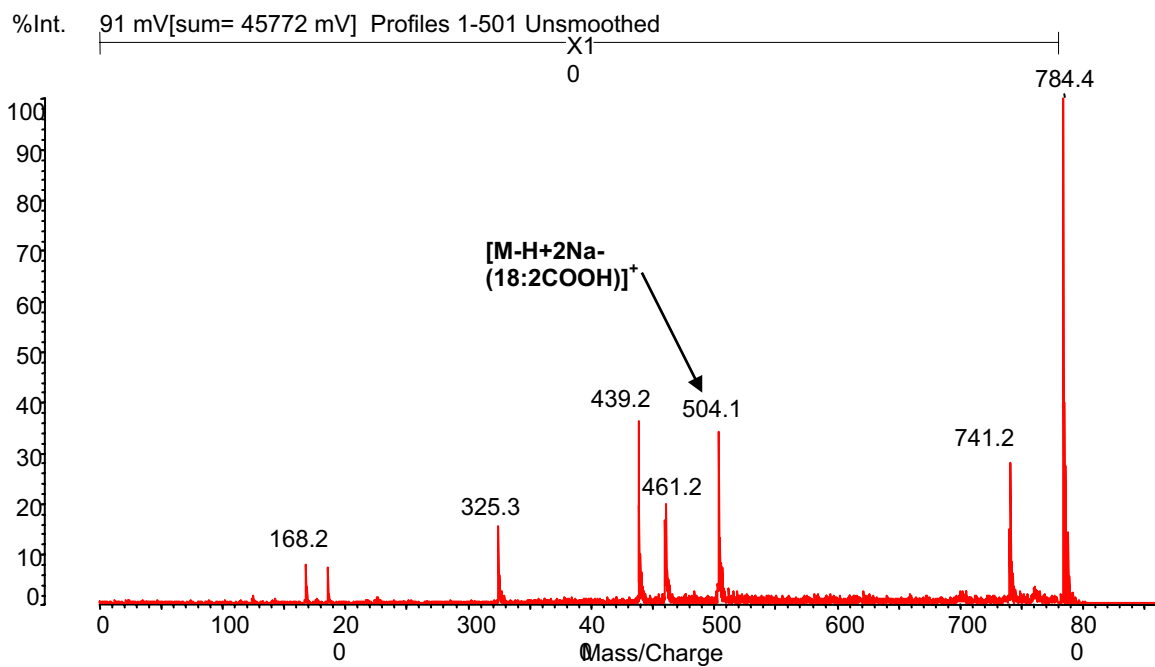
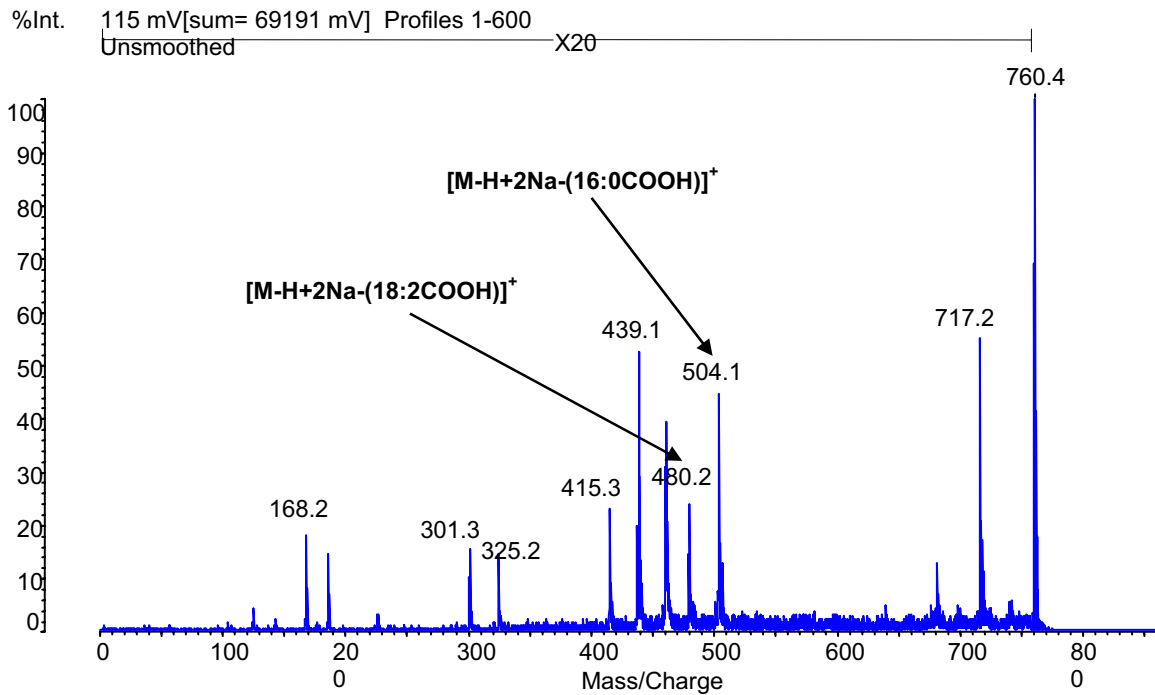


**Abb.24** Trennung von Sojalecithin und Lipidstandards auf Kieselgel 60 DC Platten. Spur **S**: Phospholipidstandards. Spur **10**, **5** und **1**: Lecithinkonzentrationen von 10, 5 und 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aufgetragen. Spuren **Neutrallipidstandards**. Detektion mittels Coomassie R-250.

Die Vorteile der Coomassiefärbung gegenüber vielen für üblichen DC Sprayreagenzien sind, die schonende Anwendbarkeit ohne Notwendigkeit einer besonderen Apparatur, eine hohe Empfindlichkeit (Nanogrammbereich), die kurze Färbedauer und die tw. Reversibilität des Färbeprozesses, die wiederum eine volle Kompatibilität mit der MALDI-MS ermöglicht (siehe unten). Nach Detektion einzelner Banden mittels Coomassie R-250 wurden die DC Platten zur Entfärbung des Hintergrundes ca. 20 min in einer Lösung aus 20% Methanol oder besser Methanol:H<sub>2</sub>O:Essigsäure (25:65:10, v/v/v) behandelt und danach noch ca. 15 min in hochreinem Wasser gewaschen. Die danach noch schwach

gefärbten Banden wurden anschliessend von der Platte (zusammen mit Kieselgelmaterial) ausgekratzt und danach diese Proben mit 20 µl reinem Chloroform oder Chloroform:Methanol (1:1, v/v) extrahiert (10 min Ultraschall und dann 30 s zentrifugiert mit 6000 rpm). Die so gewonnenen, leicht bläulichen Probenlösungen wurden dann der üblichen MALDI-MS Analyse unterworfen. Die Auswirkung der Coomassie R-250 Farbstoffspuren auf die MALDI-MS Analyse wurde im Detail evaluiert. Dabei zeigte sich, dass der Färbeprozess mittels Coomassie als auch die Anwesenheit von Farbstoffspuren in der Extraktlösung überhaupt keinen Einfluss auf die Qualität der MALDI-Massenspektren von Lipiden (z.B. PLs oder Sphingomyelin) hat im Vergleich zu Massenspektren von Standardlipiden.

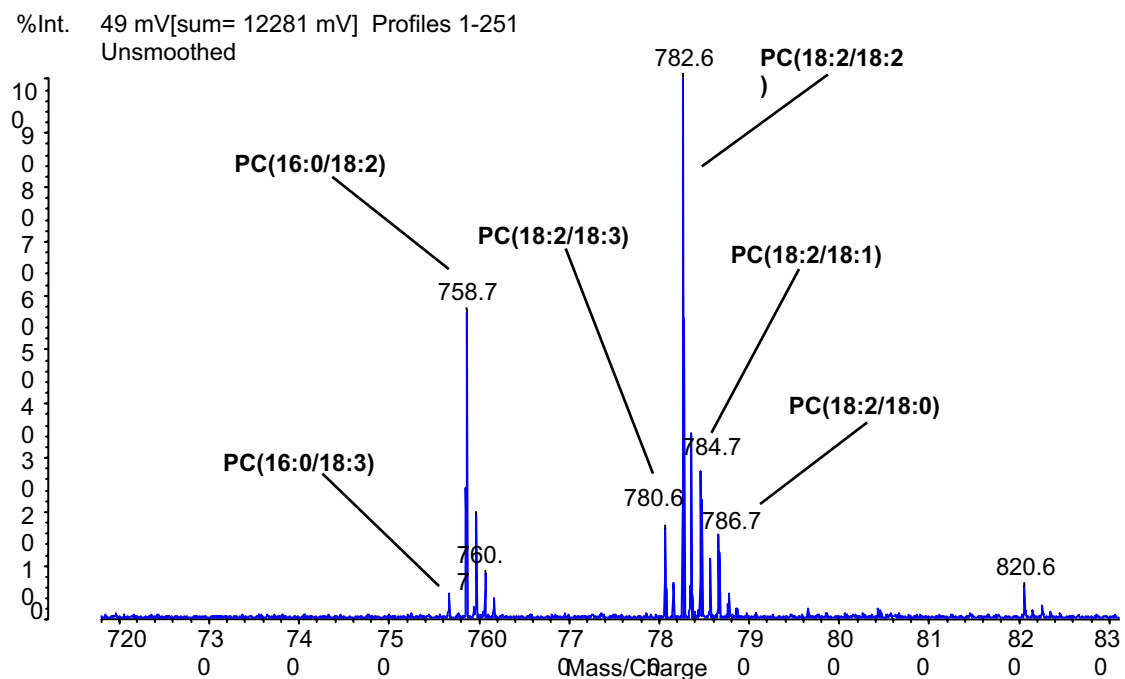
Ein Beispiel für eine derartige DC/MALDI-MS Analyse ist das Extrakt aus der PE-Bande (Abb.24, Spur 10, Bande 5), welches fünf Hauptsignale bei m/z 736, 738, 760, 762 und 784 im MALDI Massenspektrum zeigte. Wie sich herausstellte, handelte es sich dabei um eine Mischung aus  $[M+Na]^+ / [M-H+2Na]^+$  Ionen von nachweislich zwei PE-Spezies, wobei die Signale bei m/z 738 und 762 die  $[M+Na]^+$  Ionen der korrespondierenden  $[M-H+2Na]^+$  Ionen bei m/z 760 und 784 darstellen. In einem Parallelversuch wurde ein Aliquot dieses PE-Extraktes auch, auf mittels Natriumacetat dotierter THAP MALDI-Matrix gemessen. Dabei zeigten sich drei dominierende Signale bei m/z 736, 760 und 784, wobei aber hier die  $[M+Na]^+$  Signale (m/z 738 und 762) vollständig unterdrückt wurden. Aus der PSD-Analyse der  $[M-H+2Na]^+$  Ionen bei m/z 760 und 784 konnten zwei PE Strukturen, sn-1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-PE und sn-1,2-Dilinoleoyl-PE, eindeutig nachgewiesen werden (Abb.25). Das PSD-Spektrum des Vorläuferions m/z 736 zeigte, dass es sich dabei um kein PE handeln konnte, da keinerlei PE-spezifische Fragmentationen detektierbar waren. Es könnte sich dabei um eine mit der PE-Fraktion koeluiierende Lipidkomponente handeln. Zusätzlich konnten noch drei PE-Nebenkomponenten (m/z 758, 782, und 788) detektiert werden, die linolensäure- bzw. ölsäurehaltige PEs darstellen.



**Abb.25** MALDI PSD-Spektren des Vorläuferions m/z 760 (oben) und 784 (unten) aus DC Bande 5 (siehe Abb.24, Spur 10) von Sojalecithin. Beide Vorläuferionen stellen  $[M-H+2Na]^+$  Ionen dar.

Im Fall der PC-Bande (Abb.24, Spur 10, Bande 2) zeigten sich in den MALDI-Massenspektren sowohl mit undotierter als auch mit Diammoniumhydrogencitrat-dotierter MALDI-Matrix THAP zwei dominierende Signale bei m/z 759 und 783.

Dabei handelt es sich um  $[M+H]^+$  Ionen, die auch schon bei der Analyse von unaufgetrenntem Sojalecithin auf diesem Matrixsystem nachweisbar waren (siehe Abb.22c). Ionen bei  $m/z$  662, 685, 832 und 854 stellen Hintergrundionen dar, die auch bei der Analyse einer Blankprobe auftraten (reines Kieselgelmaterial nach Coomassie-Färbung). Zusätzlich konnten weitere PC-Spezies mit geringer Intensität bei  $m/z$  759, 781, 785 und 787 detektiert werden (Abb.26). Eine MALDI-MS Vergleichsmessung eines Aliquots des gleichen PC-Extrakts mit Li-dotierter THAP Matrix zeigte ebenfalls zwei dominante Molekülionen bei  $m/z$  765 und 789, wie sie auch bei der Analyse von unaufgetrenntem Sojalecithin beobachtet wurden. Diese stellen  $[M+Li]^+$  Ionen dar und entsprechen den  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  759 und 783 mit der Diammoniumhydrogencitrat-hältigen MALDI-Matrix THAP mit (Massendifferenz von  $\Delta m = 6$  Da). Die nachfolgende PSD-Analyse zeigte, dass es sich dabei um sn-1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-PC und sn-1,2-Dilinoleoyl-PC handelt, was ebenfalls mit den Ergebnissen von unaufgetrenntem Sojalecithin übereinstimmt.

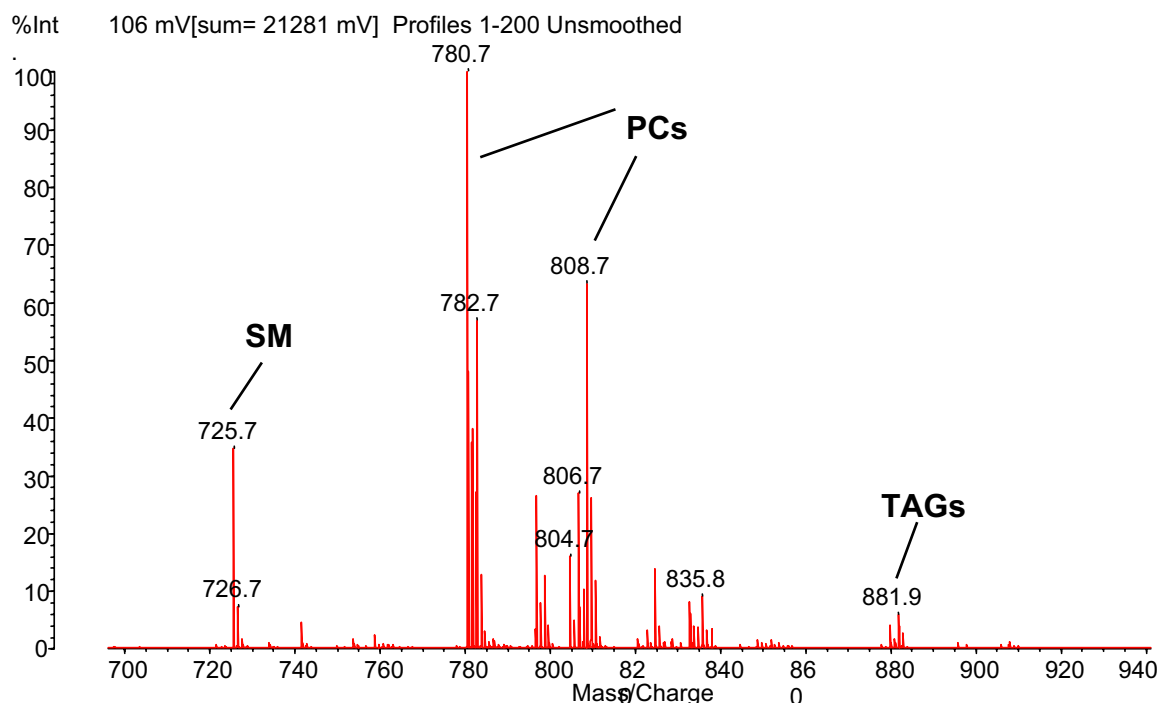


**Abb.26** MALDI-Massenspektrum von DC Bande 2 (Abb.24, Spur 10) aus Sojalecithin mit der MALDI-Matrix THAP dotiert mit Diammoniumhydrogencitrat (25mM). Die beschrifteten Peaks stellen  $[M+H]^+$  Ionen von verschiedenen PCs dar.



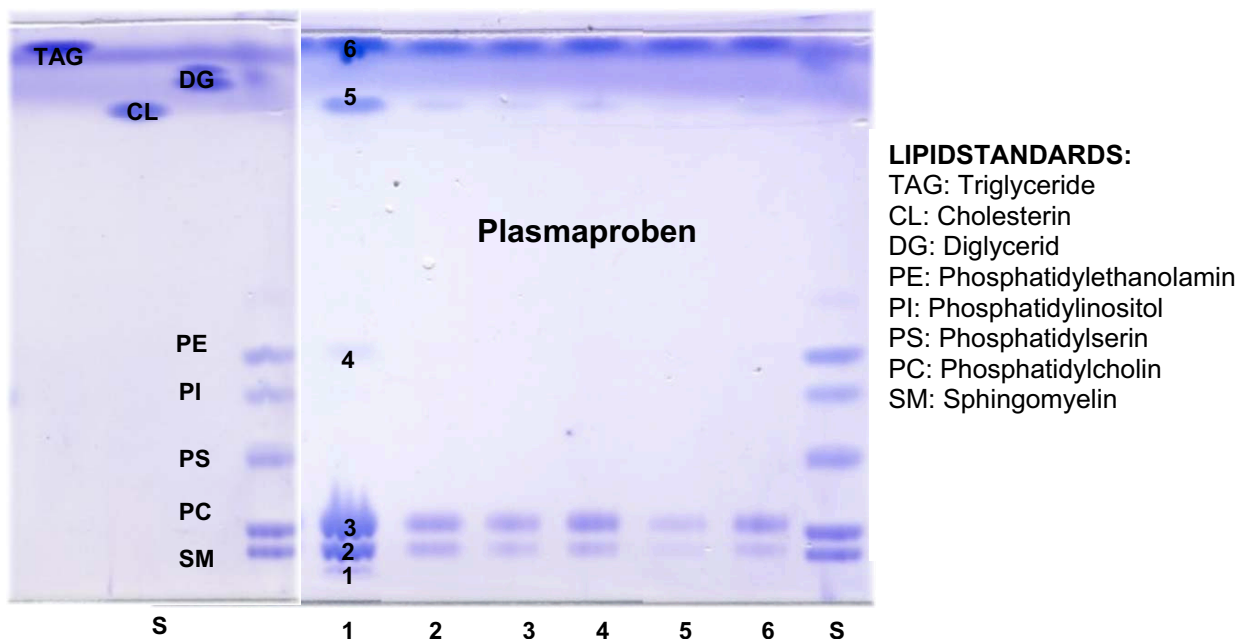
## 5.2. Analyse von Humanlipidproben mittels DC / MALDI-MS und PSD-Fragmentionenanalyse

Zur Untersuchung wurden Plasmaproben von Patienten, sowohl vor als auch nach einer rapsölreichen Diätphase herangezogen. Dabei konnten sowohl individuelle als auch möglicherweise diätbedingte Veränderungen des Lipidmusters mittels MALDI-MS festgestellt werden. Zur Gewinnung der Lipide aus den humanen Plasmaproben wurde eine zweistufige Extraktionsmethode mit zwei unterschiedlichen eisgekühlten Ethanol/Ether Gemischen (1. Stufe: 3:1, v/v und anschliessend 2. Stufe: 3:2, v/v) bei 4°C angewandt. Der Proteinanteil wurde dabei jeweils mittels Zentrifugation (15 min bei 6000 rpm) abgetrennt und die Überstände vereint und dann der MALDI-MS Analyse zugeführt. Dazu wurde das Lösungsmittel mittels N<sub>2</sub> abgeblasen und anschliessend in 20 bis 30 µl Chloroform:Methanol (1:1, v/v) gelöst. Alle Arbeitsschritte wurden dabei in Glassgefässen ausgeführt um Wandadsorptionen der Lipide zu minimieren. Als Hauptkomponenten dieses unaufgetrennten Lipidextraktes aus humanem Plasma konnten PCs, SMs und TAGs bestimmt werden basierend auf direkter MALDI-MS Analyse (Abb.27).



**Abb.27** MALDI-Massenspektrum einer humanen Lipidextraktes. Die detektierten Molekülonen stammen von verschiedensten Lipidklassen.

Die Identität dieser Komponenten konnte aus der unaufgetrennten Probe mittels PSD-MALDI Analyse eindeutig bestimmt werden. Die vorherrschenden Signale in den MALDI-Massenspektren stammen hauptsächlich von den PC Komponenten. Prinzipiell ist diese Substanzklasse, sowohl in den MALDI- als auch ESI-Massenspektren überrepräsentiert, im Vergleich zu anderen Lipiden (37) unabhängig von den realen quantitativen Verhältnissen. Basierend auf den oben beschriebenen direkten MALD-MS Analysen, konnten bei den PCs keine wesentlichen Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Patienten als auch vor und nach der rapsölreichen Diät gefunden werden. Die DC Auftrennung dieser Lipidextrakte mit nachfolgender Coomassie-Färbung (Abb.28) zeigte, dass neben PCs (Bande 3), auch signifikante Mengen an SMs (Bande 2), Cholesterin (Bande 5) und TAGs (Bande 6) vorliegen, jedoch ohne signifikante Probandenunterschiede.

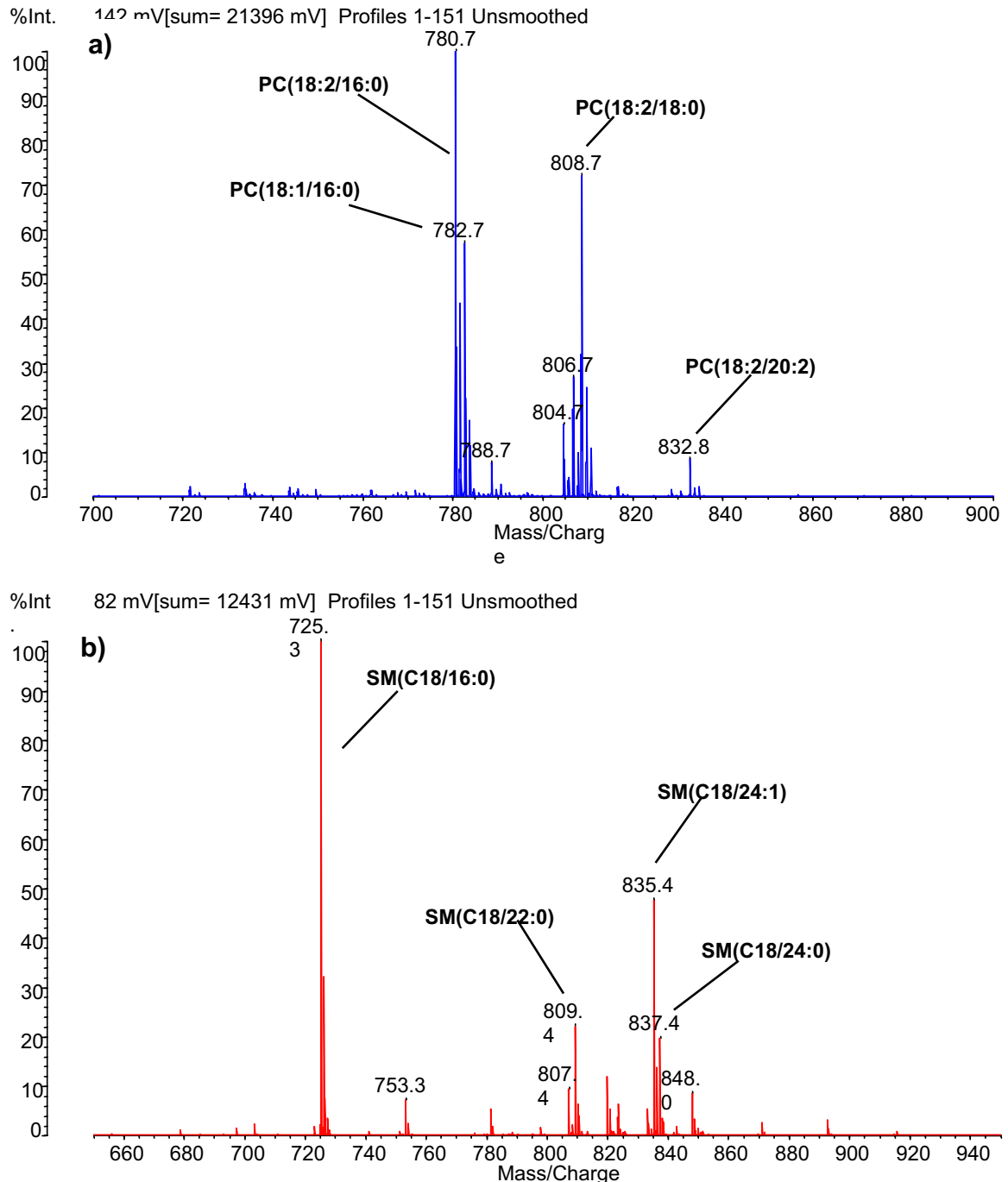


**Abb.28** Trennung von Lipidextrakt aus humanem Plasma und Lipidstandards auf Kieselgel 60 DC Platten. Spuren **S**: Lipidstandards. Spuren **1** bis **6**: Lipidextrakte aus jeweils 40 µl Humanplasma (vor (**1,3, 5**) und nach (**2, 4, 6**) einer Rapsöldiät (siehe Tab.7 Anh.)) aufgetragen. Detektion mittels Coomassie R-250.

**Anmerkung:** Spur **1**: in 2-facher Menge aufgetragen. Dabei konnte eine zusätzliche, schwache PE-Bande (Bande 4) und GL-Bande (Bande 1) detektiert werden.

Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung dieser Lipidextrakte, der Coomassie Anfärbung/Hintergrundentfärbung, wurden die entsprechenden Banden (1 bis 6) aus der DC Platte ausgekratzt und in 0.5 ml Glassgefäße

transferiert. Die Hauptlipidklassen wurden dann, gemäß ihrer Löslichkeit, selektiv mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert: GPLs (Chloroform:Methanol, 1:1, v/v), neutrale Lipide (Chloroform 100%) und GLs (Chloroform:Methanol, 1:9, v/v) und anschliessend mittels MALDI-MS auf der Matrix THAP analysiert. Verschiedenste Lipidspezies konnten in den einzelnen DC Banden mittels

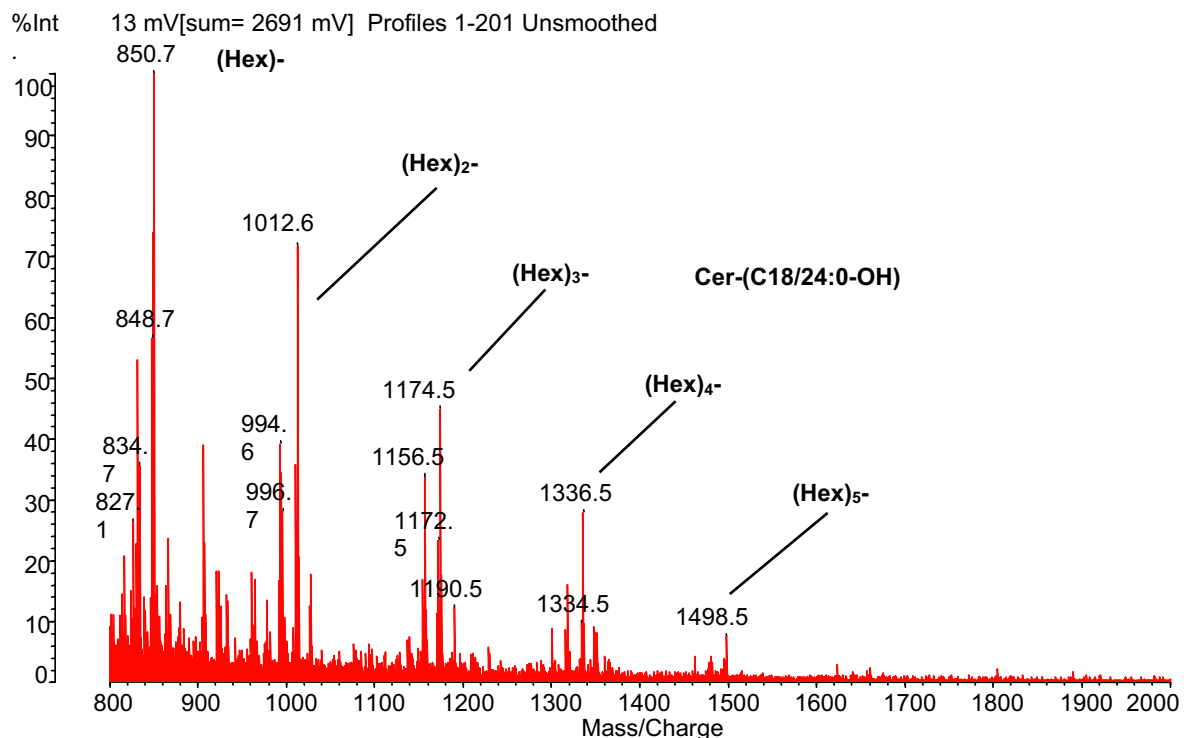


**Abb.29** MALDI-Massenspektrum des Extraktes der DC Bande 3 (PC Bande, Spur 1, Abb.28) (a) und der Bande 2 (SM Bande, Spur 1, Abb.28) (b).

MALDI-MS nachgewiesen werden. Neben den PCs aus Bande 3 (Abb 28, Spur 1) konnten besonders unterschiedliche SMs und GLs detektiert werden. Als Hauptkomponenten der Bande 3 wurden PC (C18:2/16:0) bei m/z 781, PC (C18:1/16:0) bei m/z 783 und PC (C18:2/18:0) bei m/z 809 identifiziert (siehe Abb.29a). Das MALDI-Massenspektrum des Extraktes aus Bande 2 (Abb 28, Spur 1) zeigte als vorherrschende Lipidkomponenten SM (C18/16:0) bei m/z 725, SM (C18/22:0) bei m/z 809 und SM (C18/24:1) bei m/z 835 (Abb.29b).

Die detaillierte Studie der, wie vorher exemplarisch gezeigten, MALDI-Massenspektren (aus Bande 3 in den Spuren 1 bis 6, Abb. 28) zeigte gewisse, aber nicht signifikante Molekülionenintensitätsveränderungen der Lipidkomponenten nach einer, mit Rapsöl, angereicherten Diät. Eine deutlichere Intensitätssteigerung bei verschiedenen Patienten konnte bei dem Molekülion mit m/z 833 erkannt werden. Dabei handelt es sich um PC (C18:2/20:2).

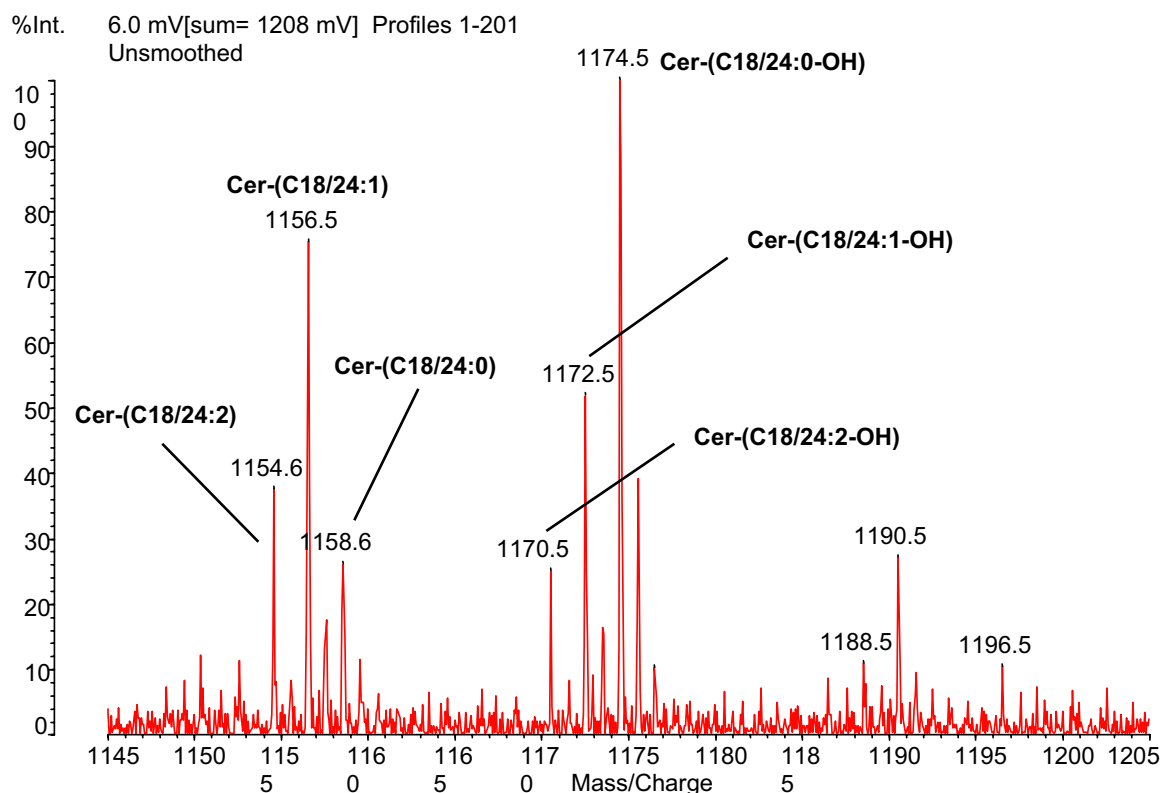
Weiters wurde auch die Bande 1 (Spur 1, Abb. 28) mittels MALDI-MS untersucht,



**Abb.30** MALDI-Massenspektrum des Extraktes der DC Bande 1 (GL Bande, nur Spur 1, Abb. 28). Die Peaks stellen  $[M+Na]^+$  Ionen von Hexosylceramiden mit 1 bis 5 Monosaccharideinheiten dar.

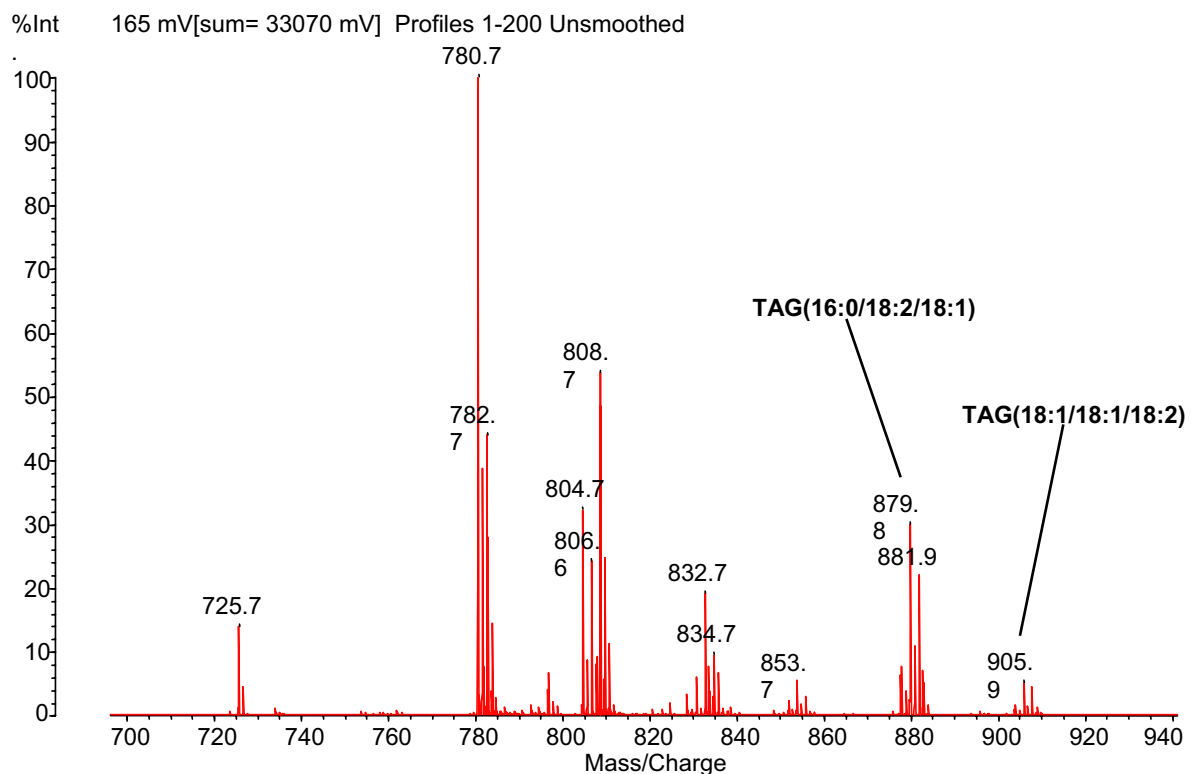
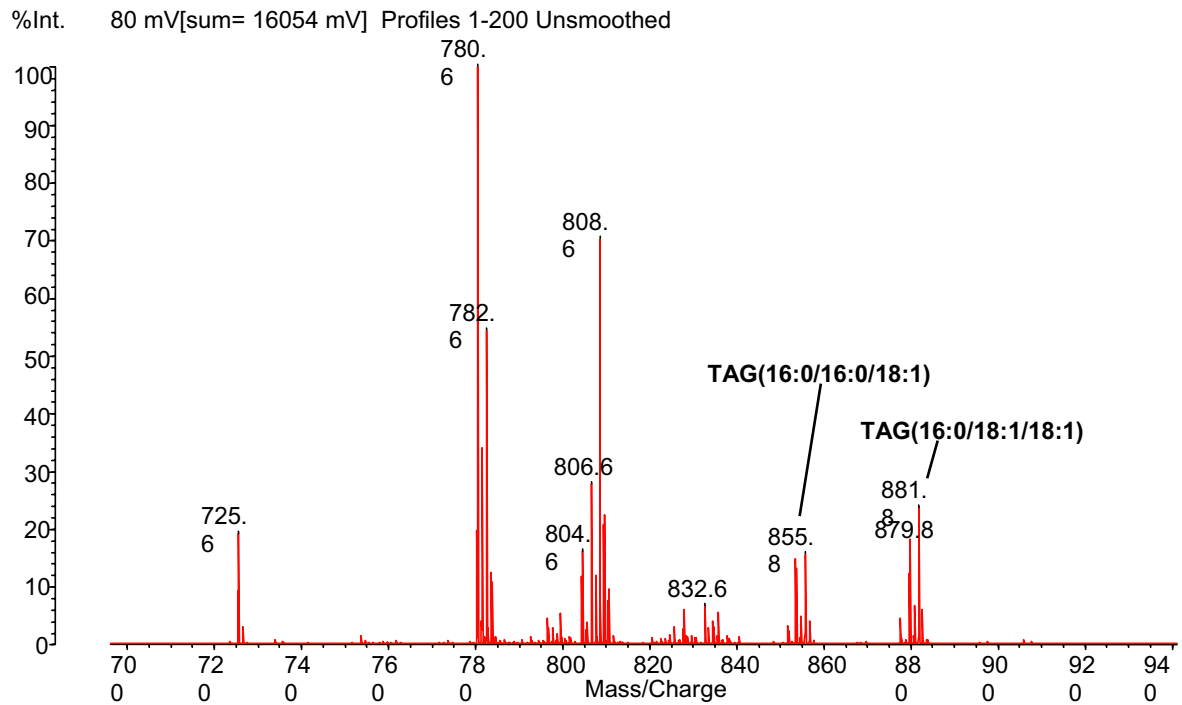
**Anmerkung:** Eine Intensitätsabnahme der Signale mit zunehmendem Molekulargewicht ist typischerweise zu beobachten.

wobei besonders anzumerken ist, dass diese Bande nur zu detektieren war, wenn die aufgetragene Probenmenge verdoppelt war. Nach Extraktion dieser GL Bande war eine Extraktreinigung und GL Anreicherung mittels ZipTip-Technologie (38) noch nötig. Diese, erstmals im Lipidbereich eingesetzte Mikroreinigungstechnik, basiert auf C18-modifiziertem Silikamaterial, welches in ein Polymer eingebettet ist. Dieses Silika/Polymermaterial ist dann an der Innenwand einer Einwegpipettenspitze fixiert. Im Prinzip funktioniert dieses System wie eine einfache RP-HPLC Säule ohne Pumpe. Nach Anwendung dieser Mikroreinigungstechnik zeigte das MALDI-Massenspektrum (Abb.30) verbesserte Signalintensitäten und eine Reduktion des Hintergrundrauschens, was besonders bei diesen, im niederen Konzentrationsbereich vorliegenden Komponenten von Bedeutung war. Bei den identifizierten GLs handelt es sich um Hydroxy-FAs (24:0-OH und 24:1-OH) hältige neutrale Glykoceramide mit ein bis



**Abb.31** Ausschnitt des MALDI-Massenspektrum des Extraktes der DC Bande 1 (GL Bande, nur Spur 1, Abb. 28), welcher den Bereich von Hexosylceramiden mit 3 Monosaccharideinheiten zeigt. Die zahlreichen Molekülionen zeigen die unterschiedliche FA-Zusammensetzung der einzelnen Moleküle an.

fünf Hexosen (Glukosen und/oder Galaktosen, daher 162 Da Massendifferenzen; Glucose von Galaktose nicht mittels MALDI-MS differenzierbar). Das Molekölion



**Abb.32** MALDI-Massenspektren der Extrakte der DC Banden 6 (TAG Banden, Abb.28). Die beiden Lipidextrakte stammen aus dem Plasma eines Probanden vor (oben, Spur 1) und nach einer rapsöleichen Diät (unten, Spur 2).

bei m/z 851 stellt ein Gluko- oder Galaktoceramid vom Typ (C18/20:0-OH) und das Molekülion bei m/z 849 vom Typ (C18/20:1-OH) dar. Mit geringerer Intensität konnten auch Gluko/Galaktoceramide vom Typ (C18/20:0) bei m/z 835 und (C18/20:1) bei m/z 833 nachgewiesen werden (jeweils 16 Da Massendifferenz zu den Hydroxy-FA haltigen Molekülen). Ein ähnliches Fettsäuremuster konnte auch im MALDI-Massenspektrum für die höhermolekularen Komponenten bis m/z 1499 beobachtet werden (Abb.30). Bei den höhermolekularen Komponenten, z.B. Trihexosylceramiden, wurden noch weitere Verbindungen vom Typ (C18/20:2-OH) bzw. (C18/20:2) mittels MALDI-MS nachgewiesen, die bei den niedermolekularen Komponenten fehlten (Abb.31). Unterschiede in den Lipidextrakten verschiedener Patienten konnten für diese GL Klasse nicht festgestellt werden.

Die intensive DC Bande 6 (Abb.28), die sogenannte TAG Bande, wurde ebenso mittels MALDI-MS untersucht, wobei aber, im Gegensatz zur GL Bande, die einfache Chloroformextraktion der DC Bande als Reinigungs- und Extraktionsschritt vor der MS Analyse ausreichte. In Abb.32 sind die MALDI-Massenspektren von Extrakten zweier TAG Banden (Bande 6, Abb.28) dargestellt, wobei eine Lipidprobe aus dem Plasma eines Probanden vor (Abb.32 (oben); Spur 1, Bande 6, Abb.28) und die andere (des gleichen Probanden), nach einer rapsölreichen Diät (Abb.32 (unten); Spur 2, Bande 6, Abb.28) stammt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lipidproben in qualitativer Hinsicht mittels MALDI-MS festgestellt werden. Die bestimmten TAG-Muster beinhalten alle die gleichen Molekülionen und unterscheiden sich nur in der relativen Intensitätsverteilung der einzelnen TAG Spezies. Dieser quantitative Effekt war auch durch eine rapsölreiche Diät zu erwarten. Unabhängig von der individuell unterschiedlichen TAG Ausgangskonzentrationen, konnte besonders eine relative (zu 100% Intensität des TAG Molekülions bei m/z 781, in beiden Lipidproben) Zunahme der linol- und ölsäurehaltigen TAG Komponenten (Molekülionen bei m/z 882 und 880 (TAG (C16:0/18:2/18:1)), sowie auch m/z 904, 906 (TAG (C18:1/18:1/18:2)) und 908) beobachtet werden (Abb.32, m/z Bereich 870 - 920). Auf der anderen Seite nahmen die relativen Anteile der palmitinsäurehaltigen TAG Komponenten (Molekülionen bei m/z 854 und 856) als Folge der Diät stark ab (Abb.32, m/z-Bereich 845 - 860). Die rapsölreiche Diät führte somit zu einer nachweislichen quantitativen Änderung der TAG-

Zusammensetzung, wobei es zu einer eindeutigen Abnahme von TAGs mit kürzerkettigen gesättigten FAs (C16:0) zugunsten von längerkettig, ein- und mehrfach ungesättigten FAs (C18:1, 18:2) kam.

Diese Resultate erlauben nun das Ansprechen (Compliance) der Patienten auf eine rapsölreiche Diät genau und schnell zu verfolgen. Eine sehr gutes Ansprechen auf eine veränderte Ernährung ging dabei mit einer deutlichen Änderung des relativen TAG-Musters und möglicherweise einer Zunahme der Gesamtmenge an TAGs einher. Bei einem schlechten Ansprechen des Patienten konnte keine charakteristische Änderung im TAG-Muster mittels der DC / MALDI-MS Strategie beobachtet werden (Tab.7 Anh.). Aussagen über die statistische Signifikanz dieser Beobachtungen können aber anhand der derzeitig vorliegenden Daten noch nicht gemacht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine schnelle und brauchbare Analysenstrategie basierend auf stufenweiser Lipidextraktion aus humanem Plasma, gefolgt von einer einfachen chromatographischen Lipidklassentrennung und einer finalen MALDI-MS Bestimmung vorliegt. Der Einsatz einer nachgeschalteten MALDI PSD-Fragmentationanalyse erlaubt dann auch noch die eindeutige Strukturcharakterisierung der einzelnen Lipidkomponenten. Diese entwickelte Strategie eignet sich daher als rasche Screening-Methode für die Erfassung des Lipidmusters in humanen Blutproben, um z.B. diätbedingte Lipidmusteränderungen zu monitoren. Im Falle einer rapsölreichen Diät konnten z.B. die diätbedingten Änderungen am stärksten in der Klasse der TAGs beobachtet werden.



## 6. LITERATUR

1. D. B. Hausman *et al.*, Dietary fats and obesity, Food Sci. Tech. (New York), 88, (1998), 537-558.
2. P. Ducimetiere, Dietary fats and cardiovascular diseases, Corps Gras, Lipides, 6(3), (1999), 232-236.
3. I. Elmadfa *et al.*, Impact of diets with corn oil or olive/sunflower oils on DNA damage in healthy young men, Eur. J. Nutr., 38(6), (1999), 286-292.
4. S. Theobald, Fats in nutrition. Food group fats and oils, Med. Monatszeitschrift Pharmaz., 22(11), (1999), 349-359.
5. P. J. Wan, Introduction to Fats and Oils Technology, AOCS Press, (1991), Champaign, Ill., USA.
6. D. Firestone, Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, AOCS Press, (1999), Campaign Ill., USA.
7. M.C. Ramirez-Tortosa *et al.*, Effect of extra-virgin olive oil and fish-oil supplementation on plasma lipids and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative alteration in free-living Spanish male patients with peripheral vascular disease, Clin. Nutr., 18(3), (1999), 167-174.
8. A.M. Gotto, Triglyceride-The Forgotten Risk Factor, Circulation, 97, (1998), 1027-1028.
9. V. Fuster and A. M. Gotto, Risk Reduction, Circulation, 102, (2000), IV-94 – IV-102.
10. E.G. Hammond, Fatty Acids in Food and Their Health Implications (2<sup>nd</sup> Edition), Food Sci. Tech. (New York), 96, (2000), 357-374.
11. A. Green and P. Salisbury, Novel plant products from gene technology, Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference, Hobart, 2001.
12. P. Zöllner *et al.*, MALDI mass spectrometry of biomolecules and synthetic polymers using alkali hexacyanoferrat (II) complexes and glycerol as matrix, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 169/170, (1997), 99-109.
13. S. Kawabata *et al.*, Use of Cobalt Ultra Fine Powder for MALDI Analysis of Low Molecular Weight Samples, Proc. 46<sup>th</sup> ASMS Conf. Mass. Spectrom. and Allied Topics (1998), 1011 (1998).
14. T. Kinumi *et al.*, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis, J. Mass Spectrom. 35, (2000), 417-422
15. D. J. Harvey Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Phospholipids, J. Mass Spectrom., 30, (1995), 1333-1346.
16. S. Fukuoka *et al.*, Elucidation of the Structure of the Core Region and the Complete Structure of the R-type Lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora*, Eur. J. Biochem., 250, (1997), 55-62.
17. V. Hunnam *et al.*, Ionization and Fragmentation of Neutral and Acidic Glycerosphingolipids with a Q-TOF Mass Spectrometer fitted with a MALDI Ion Source, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, (2001), 1220-1225.

18. J. Schiller *et al.*, Lipid Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry: A Methodological Approach, *Anal. Biochem.*, 267, (1999), 46-56.
19. P. Domingues *et al.*, Characterization of sodiated glycerol phosphatidylcholine phospholipids by mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15, (2001), 799-804.
20. F.-F. Hsu and J. Turk, Characterization of phosphatidylethanolamine as a lithiated adduct by triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization, *J. Mass Spectrom.*, 35, (2000), 596-606.
21. D. J. Harvey, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Carbohydrates, *Mass Specrom Rev.*, 18, (1999), 349-451.
22. B. Domon and C. E. Costello, Structure elucidation of glycosingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry, *Biochemistry*, 27(5), (1988), 1534-1543.
23. V.M. Kapoulas and N.K. Andrikopoulos, Detection of olive oil Adulteration with Linoleic acid-rich Oils by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chrom.*, 18, (1986), 311-322.
24. P.T. Pei *et al.*, New application of high pressure reversed-phase liquid chromatography in lipids, *Lipids*, 10(3), (1975), 152-156.
25. O. Podlaha and B. Töregard, A System for Identification of Triglycerides in Reversed Phase HPLC Chromatograms Based on Equivalent Carbon Numbers, *J. High Res. Chrom. & Chrom. Commun.*, 5, (1982), 553-558.
26. J. S. Showell *et al.*, Quantitative Variability in the <sup>252</sup>Cf Plasma Desorption Mass Spectra of Triglycerides and Waxes, *Org. Mass Spectrom.*, 24, 632-636 (1989).
27. T. J. Cornish and R. J. Cotter, A curved-field Reflectron for Improved Energy Focusing of Product Ions in Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7, (1993), 1037-1040.
28. H. R. Mottram *et al.*, Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 11, (1997), 1240-1252.
29. F.-F. Hsu and J. Turk, Structural Characterization of Triacylglycerols as Lithiated Adducts by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Low-Energy Collisionally Activated Dissociation on a Triple Stage Quadrupole Instrument, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, (1999), 587-599.
30. E. Hvattum, Analysis of triacylglycerols with non-aqueous reversed-phase liquid chromatography and positive ion electrospray tandem mass spectrometry *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 15, (2000), 187-190.
31. X. Han and R. W. Gross, Structural Determination of Picomole Amounts of Phospholipids Via Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6. (1995), 1202-1210.
32. F.-F. Hsu *et al.*, Formation of Lithiated adducts of Glycerophosphocholine Lipids Faciliates their Identification by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, (1998), 516-526.

33. W. W. Christie and G. Dobson, Thin-layer chromatography revisited, *Lipid Technol.* 11(3), (1999), 64-66.
34. J. Guittard *et al.*, Direct Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Glycosphingolipids on Thin Layer Chromatographic Plates and Transfer Membranes, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 13, (1999), 1838-1849.
35. J.K. Yao and G.M. Rastetter, Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography, *Anal. Biochem.*, 150(1), (1985), 111-116.
36. K. Nakamura and S. Handa, Coomassie Brilliant Blue Staining of Lipids on Thin-Layer Plates, *Anal. Biochem.* 142, 406-410 (1984).
37. M. Petkovic *et al.*, Detection of Individual Phospholipids in Lipid Mixtures by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Phosphatidylcholine Prevents the Detection of Further Species, *Anal. Biochem.*, 289, (2001), 202-216.
38. M. G. Pluskal, Microscale sample preparation, *Nature Biotechnol.*, 18, (2000), 104-105.

## ANHANG (TABELLEN)

**Tab.1** Liste der getestete MALDI-Matrices für die verschiedenen Lipidklassen. (-) schlechte Anwendbarkeit; (+/-) brauchbare Anwendbarkeit; (+) gute Anwendbarkeit; (++) exzellente Anwendbarkeit mit hohe Empfindlichkeit; n/a nicht untersucht;

**Tab.2** Bevorzugt generierte Adduktionen der untersuchten Lipidklassen auf unterschiedlichen Matrixsystemen. (\*) niedrige Signalintensität; (\*\*) hohe Empfindlichkeit; n/a nicht untersucht.

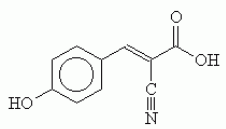
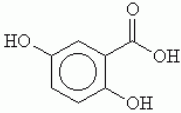
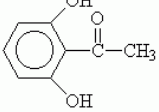
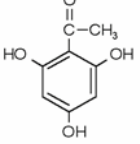
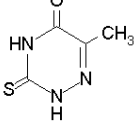
**Tab.3** Dominante TAG-Komponenten aus den untersuchten Pflanzenölen. Die FA-Zusammensetzung resultierend aus PSD-Analyse der TAGs von verschiedenen HPLC-Fractionen ist angeführt. + eindeutige Nachweisbarkeit (+) eingeschränkte Nachweisbarkeit.

**Tab.4** Klassenspezifische Fragmente von PLs ermittelt durch PSD-Analyse. Die verschiedenen ausgewählten Vorläuferionen sind angeführt. Fragmentationen geringer Intensität sind in Klammer angegeben. (1) Neutralteilchenverlust (Da); (2) Ion (m/z Wert); gefundener (+) und nicht gefundener (-) Acylverlust; n/a nicht untersucht.

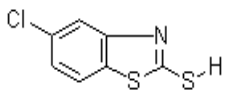
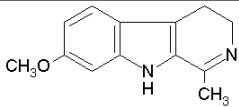
**Tab.5** Mögliche Strukturen von Fragmentationen gefunden in PSD-Analysen. Die Vorschläge beruhen hauptsächlich auf dem Vergleich mit literaturbekannten ESI-CID-MS Daten.

**Tab.6** Vergleich der PSD-Fragmentierung von PG ausgehend von den Vorläuferionentypen  $[M+Na]^+$  und  $[M-H+2Na]^+$ . \* Ionen sehr geringer Intensität.

**Tab.7** Anteile der verschiedenen Lipidklassen im unaufgetrennten Gesamtlipidextrakt gewonnen aus humanem Plasma vor und nach einer Rapsöldiät. 100 % entspricht der Gesamtintensität aller angeführten Lipidspecies in den MALDI-Massenspektren.

Matrixsysteme	Chemische Struktur	Aggregatzustand	GPLs	SLs	GLs	TAGs
<b>CHCA</b> $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure		kristallin, (MW 190.2)	-	-	+/- (intensive Fragmentierung)	-
<b>DHB</b> 2,5-Dihydroxybenzoesäure		kristallin, (MW 155.1)	+ (K <sup>+</sup> Addukte)	+	++ (neg. MALDI)	++ (K <sup>+</sup> Addukte)
<b>DHAP</b> 2,6-Dihydroxyacetophenon		kristallin, (MW 153.2)	-	n/a	n/a	n/a
<b>THAP</b> 2,4,6-Trihydroxyacetophenon		kristallin, (MW 186.2)	++	++	++	++ (K <sup>+</sup> Addukte)
<b>ATT</b> 6-Aza-2-Thiothymidin		kristallin, (MW 143.2)	n/a	n/a	+/-	n/a

*Fortsetzung*

<b>CMBT</b> 5-Chloro-2-Mercaptobenzothiazol		kristallin, (MW 201.7)	-	n/a	n/a	-
<b>Harmalin</b> 3,4-Dihydro-7-methoxy-1-methyl- $\beta$ -carbolin		kristallin, (MW 214.3)	- (+ neg. MALDI)	n/a	+/- (neg. MALDI)	-
<b>Natriumhexacyanoferrat (II), Na(II) / Glycerin</b>	Na <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ].10H <sub>2</sub> O	Suspension	+/- (PE, PG)	+/- (PE, PC)	+ (Cerebroside m/z < 1000)	++
<b>Co-UFP / Glycerin</b>	Co Partikel < 20nm	Suspension	+/- (PE, PC)	+ (Ceramide)	+ (Cerebroside)	+
<b>Titannitrid /Glycerin</b>	TiN Partikel 35nm	Suspension	+/- (PE, PC)	+ (Ceramide)	+ (Cerebroside)	-

Tab.1

Lipidklasse	Dominierende Molekülionen				
	Na(II)/Glycerin	THAP (1) +(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> hydrogencitrat (2) +Natriumacetat (3) + Lithiumacetat	DHB	Co-UFP	TiN
<b>TAG</b>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup>	—
<b>PE</b>	[M+Na] <sup>+</sup>	(1) [M+Na] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	(*) [M+K] <sup>+</sup>
<b>PE-Monomethyl</b>	[M-H+2Na] <sup>+</sup>	(2) [M-H+2Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M-H+Na+K] <sup>+</sup>	[M-H+Na+K] <sup>+</sup>
<b>PE-Dimethyl</b>			[M+K] <sup>+</sup>		[M-H+2Na] <sup>+</sup>
<b>PC</b>	(*) [M+Na] <sup>+</sup>	(1) [M+H] <sup>+</sup> (2) [M+Na] <sup>+</sup> (3) [M+Li] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>
<b>PS</b>	—	(1) [M+Na] <sup>+</sup> (2) [M-H+2Na] <sup>+</sup> (2) [M-2H+3Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup> [M-H+2Na] <sup>+</sup>	n/a	n/a
<b>*PI</b>	—	(1) (*) [M+Na] <sup>+</sup>	(*) [M+Na] <sup>+</sup>	(*) [M+K] <sup>+</sup>	—
<b>**PI-MonoPO<sub>3</sub></b>		(2) (*) [M-H+2Na] <sup>+</sup>	(*) [M-H+2Na] <sup>+</sup>	[M-H+Na+K] <sup>+</sup>	
<b>***PI-BisPO<sub>3</sub></b>		(2) (**) [M-2H+3Na] <sup>+</sup> (2) (**) [M-3H+4Na] <sup>+</sup>			
<b>PG</b>	[M+Na] <sup>+</sup> [M-H+2Na] <sup>+</sup>	(1) [M+Na] <sup>+</sup> (2) [M-H+2Na] <sup>+</sup>	n/a	n/a	n/a
<b>PA</b>	(*)[M+Na] <sup>+</sup>	(1) [M+Na] <sup>+</sup> (2) [M-H+2Na] <sup>+</sup> (2) [M-2H+3Na] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup> [M-H+2Na] <sup>+</sup>	—	—

Fortsetzung

<b>Cardiolipin (Bisphosphatidylglycerol)</b>	—	(1) $[M+Na]^+$ (1) $[M-H+2Na]^+$ (1/2) $[M-2H+3Na]^+$	(**) $[M+Na]^+$ $[M-H+2Na]^+$ $[M-2H+3Na]^+$	—	—
<b>SM</b>	(*) $[M+Na]^+$	$[M+H]^+$ (2) $[M+Na]^+$	$[M+H]^+$	—	—
<b>Ceramide</b>	$[M+Na]^+$	(1/2) $[M+Na]^+$ $[M+K]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+Na]^+$
<b>Ganglioside (saure Glycolipide)</b>	—	(1) $[M+Na]^+$ $[M-H+2Na]^+$ $[M-H+Na+K]^+$ $[M-2H+3Na]^+$	(**) $[M+Na]^+$ $[M-H+2Na]^+$	—	—
<b>Cerebroside (neutrale Glycolipide)</b>	m/z < 1000 $[M+Na]^+$	(1/2) $[M+Na]^+$ $[M+K]^+$	$[M+Na]^+$	m/z < 1000 $[M+Na]^+$	m/z < 1000 $[M+Na]^+$

Tab.2



Rt. (min)	[ M+Na ] <sup>+</sup> m/z	TAG (sn-1, 2, 3)	Code	Sonnen- blume	Sorte: PROLEIC	Sorte: OLBARIL	Hasel- nuss	Olive	Maca- damia	Soja	Kürbis	Raps
16.4	847.5	16:1/16:1/18:3	PoPoLn	+					+			
16.5	899.8	18:2/18:2/18:3	LLLn				+			+		+
	873.7	18:3/18:3/16:0	LnLnP							+		+
19.9	901.7	18:2/18:2/18:2	LLL	+	+	+	+	+	+	+	+	
20.7	849.7	16:1/16:1/18:2	PoPoL					+	+			
21.1	823.6	16:1/16:1/16:1	PoPoPo						+			
	901.8	18:3/18:1/18:2	LnOL				+	(+)				+
21.4	875.6	16:0/18:2/18:3	PLLn	+				+		+		+
25.2	903.7	18:2/18:1/18:2	LOL	+	+	+	+	+		+	+	+
26.0	851.7	16:1/18:1/16:1	PoOPo						+			
26.4	877.5	18:2/18:2/16:0	LLP	+	+	+	+			+	+	
	877.8	16:1/18:1/18:2	PoOL					+				
	877.6	16:0/18:1/18:3	POLn									+
26.8	851.7	16:0/16:1/18:2	PPoL						(+)			
27.3	825.6	16:1/16:1/16:0	PoPoP						+			
28.0	851.7	16:0/18:3/16:0	PLnP					+		+		
28.9	891.7	17:1/18:2/18:1	17:1LO				+					
31.1	931.5	18:2/18:2/20:1	LLG	+								
32.2	905.7	18:1/18:1/18:2	OOL	+	+	+	+	+			+	+
32.3	879.6	18:1/18:1/16:1	OOPo			+			+			
33.1	879.7	16:0/18:2/18:1	POL	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+
34.1	853.6	16:1/18:1/16:0	PoOP			+			+			
35.1	893.7	18:1/18:1/17:1	OO17:1						+			
35.5	853.7	16:0/18:2/16:0	PLP	+			+	+				

Fortsetzung

36.0	827.5	16:0/16:0/16:1	PPPo									+
39.7	907.7	18:1/18:1/18:1	OOO	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	933.6	18:2/18:2/20:0	LLA	+								+
41.7	905.7	18:2/18:2/18:0	LLS	+	+							
	853.8	18:2/16:0/16:0	LPP		+						+	+
42.6	907.7	18:2/18:1/18:0	LOS	+	+		+				+	+
	881.7	18:1/18:1/16:0	OOP		+	+	+	+	+	+	+	+
44.8	881.7	16:0/18:2/18:0	PLS	+	+			+		+	+	
45.2	855.5	16:0/18:1/16:0	POP		+		+	+	+			+
50.7	935.6	18:1/18:1/20:1	OOG		+	+	+			+		+
52.5	961.6	18:2/22:0/18:2	LBL	+							+	+
	935.7	18:2/18:1/20:0	LOA				+	+				+
54.3	909.6	18:1/18:1/18:0	OOS	(+)		+	+	+	+		+	+
55.3	961.6	18:2/18:2/22:0	LLB		+							
56.8	909.8	18:0/18:0/18:2	SSL	+	+						+	+
57.4	883.8	16:0/18:1/18:0	POS	(+)	+	+	+	+	+			
63.5	963.6	18:1/18:1/22:1	OOC								+	
67.8	963.5	18:2/18:1/22:0	LOB		(+)	+						
68.8	937.8	18:1/18:1/20:0	OOA		(+)	+				+		+
70.1	989.8	18:2/18:2/24:0	LLLc	(+)								(+)
71.5	963.8	22:0/18:1/18:0	BOS	(+)								
72.7	911.6	16:0/18:1/20:0	POA							+		
76.0	911.8	18:0/18:1/18:0	SOS		(+)	(+)	(+)	(+)				
85.2	991.8	18:2/18:1/24:0	LOLc	(+)								(+)
87.0	965.7	18:1/18:1/22:0	OOB	(+)	(+)	+		(+)	+			

Tab.3

Lipidklasse	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+Li] <sup>+</sup>	[M-H+2Na] <sup>+</sup>	[M-H+2Li] <sup>+</sup>	[M-2H+3Na] <sup>+</sup>
<b>PE</b>	n / a	<b>43</b> (1) <b>141</b> (1) <b>(163)</b> (1) <b>164</b> (2) Acylverlust (-)	n / a	<b>43</b> (1) <b>186</b> (2) <b>168</b> (2) Acylverlust (+)	<b>43</b> (1) <b>129</b> (1) <b>(154)</b> (2) <b>136</b> (2) Acylverlust (+)	—
<b>MMPE</b>	n / a	n / a	n / a	<b>57</b> (1) <b>182</b> (2) <b>143</b> (2) <b>(125)</b> (2) Acylverlust (+)	n / a	—
<b>DMPE</b>	n / a	n / a	n / a	<b>71</b> (1) <b>214</b> (2) <b>(174)</b> (2) <b>(125)</b> (2) <b>72</b> (2) Acylverlust (+)	<b>71</b> (1) <b>(151)</b> (1) <b>(182)</b> (2) <b>72</b> (2) Acylverlust (+)	—
<b>PC</b>	<b>184</b> (2)	<b>59</b> (1) <b>183</b> (1) <b>(205)</b> (1) <b>147</b> (2) <b>(86)</b> (2) Acylverlust (-)	<b>(59)</b> (1) <b>183</b> (1) <b>189</b> (1) <b>(200)</b> (2) <b>(131)</b> (2) <b>(86)</b> (2) Acylverlust (+)	—	—	—

Fortsetzung

<b>PS</b>	n / a	<b>87 (1)</b> <b>(185) (1)</b> <b>207 (1)</b> <b>208 (2)</b> Acylverlust (-)	n / a	<b>87 (1)</b> <b>(229) (1)</b> <b>(230) (2)</b> Acylverlust (+)	n / a	<b>87 (1)</b> <b>(109) (1)</b> <b>(253) (2)</b> <b>(235) (2)</b> Acylverlust (+)
<b>PG</b>	n / a	<b>(154) (1)</b> <b>172 (1)</b> <b>194 (1)</b> <b>195 (2)</b> Acylverlust (+/-)	n / a	<b>74 (1)</b> <b>(217) (2)</b> <b>199 (1)</b> <b>(177) (2)</b> <b>(125) (2)</b> Acylverlust (+)	<b>(74) (1)</b> <b>(154) (1)</b> <b>(160) (1)</b> <b>(185) (2)</b> <b>167 (2)</b> Acylverlust (+)	—
<b>PA</b>	—	n / a	n / a	Acylverlust	Acylverlust	Acylverlust
<b>Cardiolipin</b>	n / a	<b>598 (1)</b> <b>599 (2)</b> <b>(275) (2)</b> Acylverlust (-)	n / a	<b>598 (1)</b> <b>617 (1)</b> <b>(740) (2)</b> <b>599 (2)</b> <b>(297) (2)</b> <b>(278) (2)</b> Acylverlust (+/-)	n / a	<b>616 (1)</b> <b>(797) (1)</b> <b>(619) (2)</b> <b>597 (2)</b> <b>(461) (2)</b> Acylverlust (+)
<b>PI</b>	n / a	<b>260 (1)</b> <b>(282) (1)</b> <b>283 (2)</b> Acylverlust (-)	n / a	<b>162 (1)</b> <b>(305) (2)</b> <b>287 (2)</b> <b>269 (2)</b> Acylverlust (+)	n / a	—

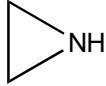
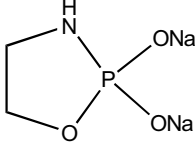
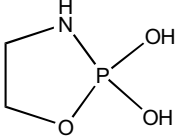
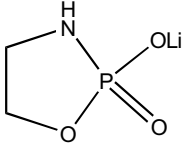
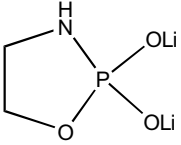
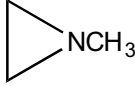
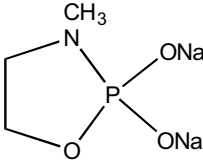
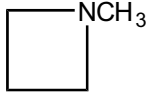
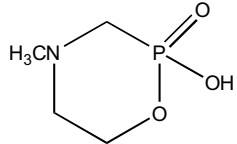
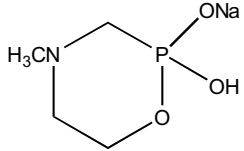
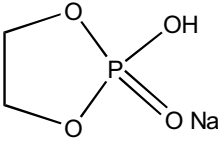
*Fortsetzung*

<b>PIP</b>	n / a	<b>340</b> (1) <b>362</b> (1) <b>363</b> (2) <b>(345)</b> (2) Acylverlust (-)	n / a		n / a
<b>SM</b>	<b>184</b> (2)	<b>59</b> (1) <b>183</b> (1) <b>(147)</b> (2) <b>(86)</b> (2)	<b>59</b> (1) <b>183</b> (1)	—	—

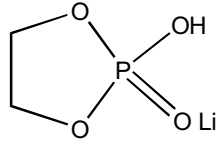
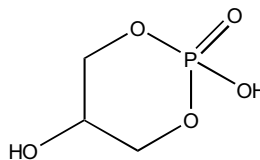

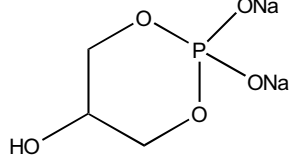
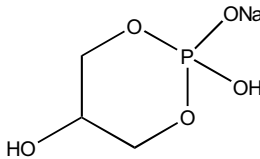
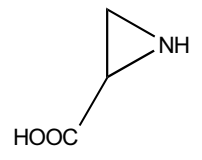
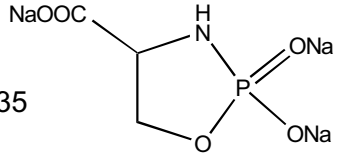
Tab.4

Lipidklasse Vorläuferion

PSD - Fragmentationen

PE	$[M-H+2Na]^+$	m/z 43		m/z 168		m/z 125	
PE	$[M-H+2Li]^+$	m/z 129		m/z 136			
MMPE	$[M-H+2Na]^+$	m/z 57		m/z 182			
DMPE	$[M-H+2Na]^+$	m/z 71		m/z 151		m/z 174	
PC	$[M+Na]^+$	m/z 147					

Fortsetzung

<b>PC</b>	<b>[M+Li]<sup>+</sup></b>	m/z 131	
<b>PG</b>	<b>[M+Na]<sup>+</sup></b>	m/z 154	
<b>PG</b>	<b>[M-H+2Na]<sup>+</sup></b>	m/z 74	
		m/z 199	
		m/z 177	
<b>PS</b>	<b>[M-2H+3Na]<sup>+</sup></b>	m/z 87	
		m/z 235	

Tab.5

<b>[M+Na]<sup>+</sup></b> (m/z 744.83) PG (16:0/16:0)	<b>Δm zu</b> <b>Vorläuferion</b>	<b>Fragmention</b>	<b>[M-H+2Na]<sup>+</sup></b> (m/z 793.27) PG (18:1/16:0)	<b>Δm zu</b> <b>Vorläuferion</b>	<b>Fragmention</b>
—	—	—	719.14	<b>74.13</b>	[M-H+2Na-(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O-CH <sub>2</sub> OH)] <sup>+</sup>
(590.60)*	(154.23)	[M+Na-(HPO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> OH)] <sup>+</sup>	—	—	—
572.57	<b>172.26</b>	[M+Na-(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> -(OH) <sub>2</sub> )] <sup>+</sup> (Glycerinphosphat)	—	—	—
550.61	<b>194.22</b>	[M+Na-(NaHPO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> -(OH) <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	—	—	—
(488.55)*	(256.28)	[M+Na-(RCOOH)] <sup>+</sup>	536.59 (100% rel.Int)	<b>256.68</b> (sn-1- Fettsäure)	<b>[M-H+2Na-(R<sub>1</sub>COOH)]<sup>+</sup></b>
—	—	—	514.90	278.37	<b>[M-H+2Na-(R<sub>1</sub>COONa)]<sup>+</sup></b>
—	—	—	510.97 (40% rel.Int)	<b>282.30</b> (sn-2- Fettsäure)	[M-H+2Na-(R <sub>2</sub> COOH)] <sup>+</sup>
—	—	—	488.97	304.30	[M-H+2Na-(R <sub>2</sub> COONa)] <sup>+</sup>
—	—	—	463.12	330.30	[M-H+2Na-(R <sub>1</sub> COOH)-74] <sup>+</sup>
—	—	—	437.17	356.10	[M-H+2Na-(R <sub>2</sub> COOH)-74] <sup>+</sup>
—	—	—	327.12		[(R <sub>2</sub> COONa)+Na] <sup>+</sup>
—	—	—	301.12		[(R <sub>1</sub> COONa)+Na] <sup>+</sup>
<b>194.62</b>		[NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> -(OH) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (Glycerinphosphat)	217.00		[Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> -(OH) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (Glycerinphosphat)
—	—	—	<b>199.00</b>		[Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> OH] <sup>+</sup>
—	—	—	(177.02)*		[NaHPO <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> OH] <sup>+</sup>

Tab.6



Extrakt	Gef. m/z Wert (Molekülion)	725	781	783	805	807	809	829	833	835	854	856	878	880	882	906	908	
		Lipidklasse	SM	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	SM	TAG	TAG	TAG	TAG	TAG	TAG	TAG
		FA-Komposition	16:0	16:0	16:0	18:2	18:1	18:0	18:2	18:2	24:1	16:0	16:0	16:0	16:0	16:0	18:1	18:1
1	Probe1 (vor Diät)	5.0	24.7	13.6	7.1	8.3	16.6	0	4.1	0.7	4.4	4.5	0	5.4	6.3	0	0	
2	Probe1 (nach Diät)	5.0	26.5	13.8	6.8	6.3	15.5	0	6.1	1.5	0.8	0	1.6	7.2	5.6	0.7	0.5	
3	Probe2 (vor Diät)	7.1	27.6	14.0	9.5	10.0	16.7	1.0	5.5	3.4	0	0	0	1.0	1.2	0	0	
4	Probe2 (nach Diät)	4.6	24.9	12.8	10.2	9.3	14.1	2.9	7.1	2.8	0	0	0	5.0	3.2	0	0	
5	Probe3 (vor Diät)	8.7	28.8	19.6	5.8	7.6	18.7	0	2.9	4.3	0	0	0	0	0	0	0	
6	Probe3 (nach Diät)	8.9	29.2	14.4	6.5	8.3	18.9	0.5	4.2	3.9	0	0	0	0.9	1.1	0	0	

Tab.7