

Sandra Pötz

**„Entwicklung einer Methode zur Analyse von
oxidierten Phospholipiden mittels 2D HPLC und
Massenspektrometrie“**

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

der Studienrichtung Chemie

erreicht an der



Technischen Universität Graz

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Ernst Lankmayr

Institut für Analytische Chemie und Radiochemie

Technische Universität Graz

Mag. Dr.rer.nat Harald Köfeler

Zentrum für medizinische Grundlagenforschung Graz

2011

Man lebt zweimal:
Das erste Mal in der Wirklichkeit,
das zweite Mal in der Erinnerung.

Honore de Balzac

Im Gedenken an meinen Vater

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf dem Weg bis hierher begleitet und unterstützt haben.

Prof. Dr. Ernst Lankmayr danke ich für das Ermöglichen dieser Arbeit, für die freundliche Unterstützung und die weitgehenden Freiheiten bei der Durchführung selbiger.

Dr. Harald Köfeler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die großartige Betreuung. Ich fand stets ein freundliches Wort und immer ein offenes Ohr für jegliche Probleme und Wünsche.

Dr. Martin Trötzmüller und Dipl. Ing. Alexander Fauland danke ich für die umfassende, immer geduldige und kompetente Betreuung und die vielen wertvollen Ratschläge, die ich erhalten habe. Auch für die unermüdlichen Antworten auf meine unzähligen Fragen und die Motivationsarbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Ing. Birgit Reiter und Astrid Knopf bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde und für das angenehme Arbeitsklima.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, vor allem meiner Mutter Maria Christine, aber auch Elfriede, Ulrike & Peter, Veronika und Renate & Josef für die Unterstützung während meines Studiums und das Vertrauen, dass mir stets entgegengebracht wurde. Ohne euch hätte ich alles nicht so erfolgreich bewältigt!

Zusammenfassung

Phospholipide sind wichtige Bausteine der Zellmembran, sowie von Lipoproteinen und sie haben unterschiedliche Funktionen in biologischen Systemen. Zu diesen zählen einerseits strukturgebende und metabolische Aufgaben, aber sie stellen auch ein Reservoir für die Bildung von bioaktiven Mediatoren dar.

Oxidativer Stress in der Zelle wird hervorgerufen, wenn das System Oxidantien/Antioxidantien aus dem Gleichgewicht geraten ist und dieser führt zu Veränderungen an Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen, aber auch Lipiden. Radikalinduzierte Peroxidation der ungesättigten Fettsäuren von Phospholipiden führt zu einem komplexen Gemisch aus Oxidationsprodukten, welche mit unterschiedlichen Krankheitsbildern assoziiert werden.

Generell kann gesagt werden, dass Analysemethoden, basierend auf der Elektrospray – Ionisations – Massenspektrometrie (ESI – MS) die meisten Anforderungen zum Nachweis und zur Identifizierung der oxidativ modifizierten Phospholipide erfüllen. Insbesondere Tandem – Massenspektrometrie gekoppelt mit Hochleistungsflüssigchromatographie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung bei der Analytik von oxidierten Phospholipiden gewonnen.

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde eine HPLC – ESI – MS – Methode zur Abtrennung der oxidierten Phospholipide sowohl von der unoxidierten Spezies als auch von anderen Lipiden entwickelt. Dazu wurde eine Phosphatidylcholin – Standardsubstanz mit unterschiedlichen Oxidationsmethoden modifiziert und diese Methoden miteinander verglichen.

Die chromatographische Trennung erfolgte durch Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC), wobei unterschiedliche stationäre und mobile Phasen zum Einsatz gekommen sind.

Darüber hinaus wurden die exakten Massen und damit die Summenformeln und Strukturen der Produkte nach Oxidation der Phosphatidylcholin – Standardsubstanz mittels RP – UHPLC – ESI – FT – MS (Reversed Phase – Ultra High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionisation – Fourier Transformations – Massenspektrometrie) ermittelt.

Ziel dieser Masterarbeit schlussendlich war der Nachweis von oxidierten Phospholipiden in einer Realprobe, in diesem Fall menschliches LDL (Low Density Lipoprotein). Dazu wurde das LDL mit Hilfe zweier unterschiedlicher Oxidationsmethoden *in vitro* oxidiert und die dabei entstandenen Oxidationsprodukte mit den Oxidationsprodukten in natürlichem LDL verglichen. Die Ermittlung der exakten Massen dieser Produkte erfolgte sowohl mittels RP – UHPLC – FT – MS als auch mit Hilfe der zuvor entwickelten HILIC – FT – MS – Methode.

Abstract

Phospholipids are the major lipid constituents of cell membranes and lipoproteins and play different roles in biological systems such as fuels, signaling agents or surfactants. Oxidative stress that occurs in the cells, due to an imbalance between the prooxidant/antioxidant systems, causes damage to biomolecules such as nucleic acids, proteins and lipids. Among these targets, the peroxidation of lipids is damaging because the formation of lipid peroxidation products leads to a spread of free radical reactions. These changes result in a vast number of structurally different oxidation products, which may have different biological activities.

Optimal analytical methods for oxidative stress marker measurements are highly specific and sensitive, provide high sample throughput, achieve high accuracy and precision, and provide low limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ). In general, MS – based techniques meet these requirements. Mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) using the soft ionization methods (Electrospray and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) are amongst the most suitable approaches for the study of oxidized phospholipids. In particular, LC – MS/MS often provides the advantages of higher specificity, higher sensitivity and the capacity to determine multiple analytes when compared to other available methods.

The aim of this master thesis was the development of a suitable HPLC – ESI – MS – method for the separation of oxidized phospholipids from unoxidized species as well as from other phospholipids. Therefore a phosphatidylcholin reference substance was oxidized with different methods for comparison. Chromatographic separation of the oxidation products from unoxidized lipids was accomplished under HILIC – conditions and different stationary and mobile phases were used.

The exact masses of the oxidation products were determined using RP – UHPLC – ESI – FT – MS (Reversed Phase – Ultra High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionisation – Fourier Transformation – Mass Spectrometry).

Finally, the method was applied to human LDL. For this, LDL was oxidized using two different oxidation methods and the oxidation products were compared with the oxidation products in LDL without oxidation in vitro. The detection was done with RP – UHPLC – ESI – FT – MS and with the HILIC – MS method, which was developed before.

Inhaltsverzeichnis

Abstract/Kurzfassung

1. Einleitung	Seite 1
2. Charakterisierung der Analyten	Seite 3
2.1 Allgemeines über Phospholipide	Seite 3
2.2 Die Zellmembran	Seite 4
2.3 Lipoproteine	Seite 5
2.4 Oxidativer Stress	Seite 7
2.5 Produkte der Lipidperoxidation	Seite 9
2.6 Metabolismus und Entgiftung oxidierter Phospholipide	Seite 11
2.7 Beschreibung der eingesetzten Lipide	Seite 12
3. Stand der Analysetechnik	Seite 16
3.1 Oxidationsmöglichkeiten von ungesättigten Fettsäuren in vitro	Seite 16
3.1.1 Autoxidation eines Phospholipids.....	Seite 16
3.1.2 Peroxidation eines Phospholipids mit einem Metallion als Katalysator.....	Seite 16
3.1.3 Enzymatische Oxidation.....	Seite 17
3.1.4 Oxidation von Phospholipiden mit Radikalkettenstartern.....	Seite 17
3.1.5 Oxidation von LDL in vitro.....	Seite 18
3.2 Analyse und Identifikation von oxidierten Phospholipiden	Seite 18
3.3 Isolation von LDL und Lipidextraktion	Seite 20
4. Analytische Grundlagen	Seite 20
4.1. Extraktionsmethoden in der organischen Analytik	Seite 20
4.1.1 Fest/Flüssig – Extraktion.....	Seite 20
4.1.2 Flüssig/Flüssig – Extraktion.....	Seite 21
4.1.3 Festphasenextraktion.....	Seite 21
4.1.4 Dünnschichtchromatographie.....	Seite 22
4.1.5 Flüssigchromatographie.....	Seite 23
4.1.5.1 Normalphasen - Flüssigchromatographie.....	Seite 24
4.1.5.2 Umkehrphasen – Flüssigchromatographie.....	Seite 25
4.1.5.3 Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographie (HILIC).....	Seite 26
4.1.6 Gaschromatographie.....	Seite 30
4.2 Massenspektrometrie	Seite 31
4.2.1 Allgemeines.....	Seite 31
4.2.2 Einlasssysteme.....	Seite 32

4.2.3 Ionenquellen und Ionisation	Seite 33
4.2.3.1 Elektronenstoßionisation	Seite 34
4.2.3.2 Chemische Ionisation.....	Seite 34
4.2.3.3 Electrospray – Ionisation (ESI).....	Seite 35
4.2.3.4 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI).....	Seite 37
4.2.4 Massenanalysatoren.....	Seite 37
4.2.4.1 Quadrupol – Massenfilter	Seite 38
4.2.4.2 Triple Quadrupol.....	Seite 39
4.2.4.3 Fourier Transformations Massenspektrometrie (FT-ICR-MS).....	Seite 40
4.2.4.4 Flugzeitmassenspektrometer.....	Seite 41
4.2.5 Detektoren	Seite 41
4.3 Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie	Seite 42
4.4 Verwendetes HPLC - MS/MS System	Seite 43
4.5 Verwendetes HPLC – FT – MS – System.....	Seite 44
5. Experimenteller Teil.....	Seite 45
5.1 Oxidation des Phospholipid – Standards	Seite 45
5.1.1 Ergebnisse und Diskussion.....	Seite 46
5.2 HPLC – Methodenentwicklung für oxidierte Phospholipide	Seite 49
5.2.1 Ergebnisse.....	Seite 51
5.2.1.1 Unmodifiziertes Kieselgel als stationäre Phase (Betasil Silica)	Seite 51
5.2.1.2 Nucleosil – OH als stationäre Phase	Seite 55
5.2.1.3 Amino – modifizierte stationäre Phase.....	Seite 60
5.2.1.4 PVA – SIL als stationäre Phase	Seite 64
5.2.2 Diskussion	Seite 67
5.3 Bestimmung der exakten Massen der Oxidationsprodukte (FT – MS).....	Seite 72
5.3.1 Ergebnisse und Diskussion.....	Seite 73
5.4. Bestimmung der Oxidationsprodukte der Arachidonsäure in LDL	Seite 81
5.4.1 Probenvorbereitung	Seite 82
5.4.2 Optimierung des ESI – Triple – Quadrupol Systems	Seite 83
5.4.3 HPLC – MS/MS – Analyse der LDL – Proben.....	Seite 84
5.4.4 HPLC – FT – MS – Analyse der LDL – Proben	Seite 85
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	Seite 88
7. Chemikalien- und Geräteliste.....	Seite 90
8. Literatur	Seite 92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die verschiedenen Phospholipidklassen.....	3
Tabelle 2: Lipoproteinklassen	6
Tabelle 3: Atherogene Effekte von oxLDL – Auswahl.....	9
Tabelle 4: Vor- und Nachteile eines Quadrupol-Massenfilters	38
Tabelle 5: Vor- und Nachteile eines FT-ICR-MS	41
Tabelle 6: Eingesetzte Lipid – Standardsubstanzen	49
Tabelle 7: Zur Methodenentwicklung eingesetzte Laufmittel.....	50
Tabelle 8: Vorläuferionen- bzw. Neutralverlustanalyse von Phospholipiden	50
Tabelle 9: Neutralverlustanalyse von Triglyceriden	51
Tabelle 10: HPLC/MS – Methode, Silicaphase.....	51
Tabelle 11: HPLC/MS – Methode, Diolphase.....	55
Tabelle 12: Gradientenelution mit Laufmittel 1	56
Tabelle 13: Gradientenelution mit Laufmittel 4	57
Tabelle 14: Gradientenelution mit Laufmittel 6	58
Tabelle 15: HPLC/MS-Methode, Aminophase	60
Tabelle 16: Gradientenelution mit Laufmittel 6, Aminophase.....	63
Tabelle 17: HPLC/MS-Methode, PVA – SIL – Phase	64
Tabelle 18: HPLC/MS - Methode zur Fraktionierung.....	72
Tabelle 19: FT – MS – Methode	73
Tabelle 20: Exakte Massen, Summenformeln und Strukturen der oxidierten PL	73
Tabelle 21: Typische Fragmente bei MS/MS - Experimenten nach positiver Ionisation.....	77
Tabelle 22: Typische Fragmente bei MS/MS - Experimenten nach negativer Ionisation.....	78
Tabelle 23: Modifizierte Fettsäuren nach negativer Ionisation (FT – MS).....	79
Tabelle 24: Optimierte Normalphasenmethode für LDL	84
Tabelle 25: Optimierte Werte der MRM - Übergänge für oxidierte Phospholipide in LDL.....	84
Tabelle 26: HPLC-FT-MS Methode zur Bestimmung der Oxidationsprodukte von LDL.....	86
Tabelle 27: Gefundene Oxidationsprodukte–Vergleich der Oxidationsmethoden (FT–MS).....	86
Tabelle 28: Liste der verwendeten Chemikalien	90
Tabelle 29: Liste der verwendeten Geräte.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellmembran	5
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Lipoproteins.....	5
Abbildung 3: Gleichgewichtsverteilung bei oxidativem Stress	7
Abbildung 4: Arachidonsäure (20:4)	10
Abbildung 5: Reaktionsschema der radikalischen Lipidperoxidation von Arachidonsäure	11
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines HPLC – Systems.....	23
Abbildung 7: Unterschiedliche Arten von Silanol: I: freies Silanol, II: geminales Silanol, III: vicinales Silanol	27
Abbildung 8: Chemische Struktur einer Diol - modifizierten stationären Phase	28
Abbildung 9: Chemische Struktur einer Amidmodifizierten stationären Kieselgelphase	28
Abbildung 10: Chemische Struktur einer Amino - modifizierten stationären Phase	29
Abbildung 11: Die Struktur eines mit Sulfoalkylbetain - Gruppen modifizierten Kieselgels	30
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers	32
Abbildung 13: Elektrospray-Ionisation.....	36
Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Massenfilters	38
Abbildung 15: Schema der MS/MS-Experimente	40
Abbildung 16: Agilent 1100 Series HPLC - System (links) und AB 4000 Q Trap™	43
Abbildung 17: Schema einer AB 4000 Q Trap™	43
Abbildung 18: Thermo Scientific* LTQ FT Ultra MS mit Thermo Accela HPLC – System	44
Abbildung 19: Schema eines Thermo Scientific* LTQ FT Ultra MS	44
Abbildung 20: Chromatogramm der Oxidationsprodukte von PAPC nach Methode 2 (c = 3,3 µg/mL).....	47
Abbildung 21: Gemittelttes Massenspektrum der Oxidationsprodukte von PAPC nach Methode 2 (c = 3,3 µg/mL)	47
Abbildung 22: Chromatogramm der Oxidationsprodukte von PAPC nach Autoxidation (c = 1 µg/mL)	48
Abbildung 23: Gemittelttes Massenspektrum der Oxidationsprodukte von PAPC nach Autoxidation (c = 1µg/mL).....	48
Abbildung 24: Chromatogramm mit Silicasäule, Laufmittel 1: 90% A, 10%B.....	52
Abbildung 25: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 3: 97% A, 3% B	53
Abbildung 26: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 4: 15% A, 85% B	54
Abbildung 27: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 6, 5% A, 95% B	54
Abbildung 28: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 7, 50% A, 50% B	55
Abbildung 29: Chromatogramm mit Diol - Phase, Laufmittel 1, Gradient	56
Abbildung 30: Chromatogramm mit Diolsäule, Laufmittel 3, isokratisch, 99% A, 1% B	57

Abbildung 31: Chromatogramm mit Diol-Phase, Laufmittel 4, Gradient	58
Abbildung 32: Chromatogramm mit Diol - Phase, Laufmittel 6, Gradient	59
Abbildung 33: Chromatogramm mit Diol - Phase, Laufmittel 7, isokratisch, 20% A, 80% B.....	60
Abbildung 34: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 1, 80% A, 20% B	61
Abbildung 35: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 3, 95% A, 5% B	61
Abbildung 36: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 4, 10% A, 90% B	62
Abbildung 37: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 6, Gradient.....	63
Abbildung 38: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 7, 30% A, 70% B	64
Abbildung 39: Chromatogramm mit PVA – SIL - Säule, isokratisch, modifiziertes Laufmittel 4, 20% A, 80% B.....	65
Abbildung 40: Chromatogramm mit PVA-SIL-Säule, isokratisch, modifiziertes Laufmittel 6, 3% A, 97% B.....	66
Abbildung 41: Chromatogramm mit PVA-SIL-Säule, isokratisch, Laufmittel 7, 60%A, 40%B.....	67
Abbildung 42: Extracted Ion Chromatogramme von unoxidierten PC – Standardsubstanzen	68
Abbildung 43: Extracted Ion Chromatogramm von oxidierten PAPC - Species mit m/z > 782,6.....	68
Abbildung 44: Extracted Ion Chromatogramme von oxidierten PAPC - Spezies mit m/z < 782,6.....	69
Abbildung 45: Extracted Ion Chromatogramme der Lyso - PC`s.....	69
Abbildung 46: Extracted Ion Chromatogramme von unoxidierten PC – Standardsubstanzen	70
Abbildung 47: Extracted Ion Chromatogramme von oxidierten PAPC - Spezies mit m/z > 782,6	70
Abbildung 48: Extracted Ion Chromatogramme von oxidierten PAPC – Spezies mit m/z < 783,6	71
Abbildung 49: Extracted Ion Chromatogramme von den LPC`s (PVA - SIL).....	71
Abbildung 50: Beispiel eines Produktionenspektrums (positiver Modus, HOOA – PC)	78
Abbildung 51: Beispiel eines Produktionenspektrums (negative Ionisation, HOdiA – PC).....	80
Abbildung 52: Vergleich der Ergebnisse der MRM – Analysen	85
Abbildung 53: Produktionenspektrum von HETE – PC	87

Abkürzungsverzeichnis

4 – HHE.....	4-hydroxy-2-hexenal
5 – isoPGA ₂ – PC	5 – Isoprostaglandin A2 – Phosphatidylcholin
5 – isoPGD ₂ – PC	5 – Isoprostaglandin D2 – Phosphatidylcholin
5 – isoPGE ₂ – PC.....	5 – Isoprostaglandin E2 – Phosphatidylcholin
5 – isoPGF ₂ – PC.....	5 – Isoprostaglandin F2 – Phosphatidylcholin
5 – isoPGG ₂ – PC	5 – Isoprostaglandin G2 – Phosphatidylcholin
5 – isoPGH ₂ – PC	5 – Isoprostaglandin H2 – Phosphatidylcholin
5 – isoPGJ ₂ – PC	5 – Isoprostaglandin J2 – Phosphatidylcholin
AA	Arachidonic Acid
AAPH.....	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
Abb	Abbildung
AMVM.....	2,2'-azobis(2,2-dimethylvaleronitrile)
APCI.....	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
API	Atmospheric Pressure Ionisation
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionisation
ASE	Accelerated Solvent Extraction
bzw.	Beziehungsweise
CE.....	Collision Energy
CI.....	Chemical Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
CRM	Charged Residue Model
CUR.....	Curtain Gas
CXP	Collision Cell Exit Potential
DAG	Diacyl Glycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DP.....	Declustering Potential
ECD.....	Electron Capture Detection
EI	Elektronenstoß Ionisation
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
ELSD.....	Evaporative Light Scattering Detector
EP	Entrance Potential
ESI.....	Electrospray Ionisation
etc.	et cetera
eV	Elektronenvolt
FD.....	Feld Desorption
FEB.....	Fluidized – Bed Extraction
FID	Flammenionisations Detektor
FT-ICR-MS	Fourier-Transformations-Ionen-Zyctronresonanz-Massenspetrometrie
GC	Gaschromatographie
GS1, GS2.....	Gas 1 bzw. Gas 2
HDL.....	High Density Lipoprotein
HETE – PC.....	Hydroxyeicosatetraensäure – Phosphatidylcholin
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HNE.....	4-hydroxy-2-nonenal
HOdiA – PC	5-hydroxy-8-oxo-6-octenedioic acid ester von Lyso-PC
HOOA – PC	5-hydroxy-8-oxo-6-octenedioic acid ester von Lyso-PC
HPETE – PC.....	Hydroperoxyeicosatetraensäure – Phosphatidylcholin
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
IC.....	Ionenchromatographie
ICR	Ionen Zyctron Resonanz
i.d.	Innendurchmesser

IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IEM	Ion Evaporating Model
IS	Ionisationsspannung
isoLGD ₂ – PC	Isolevuglandin D2 - Phosphatidylcholin
isoLGE ₂ – PC	Isolevuglandin E2 - Phosphatidylcholin
IsoPs	Isoprostane
isoTxA ₂ – PC	Isothromboxan A2 – Phosphatidylcholin
isoTxB ₂ – PC	Isothromboxan B2 – Phosphatidylcholin
KODiA – PC	5-keto-6-octendioic acid ester von Lyso-PC
KOOA – PC	5-keto-8-oxo-6-octenoic acid ester von Lyso-PC
LC	Liquid Chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LPC	Lyso – Phosphatidylcholin
MAE	Microwave Assisted Extraction
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse – Ladungsverhältnis
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NL	Neutral Loss
nm	Nanometer
NP – LC	Normalphase Liquid Chromatographie
Ox	Oxidiert
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PA	Phosphatidsäure
p.a.	pro analysis
PAF	Platelet Activating Factor
PAPC	Palmitoyl – Arachidonoyl – Phosphatidylcholin
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PECPC	1-Palmitoyl-2-(5,6 –Epoxyisoprostan A2)-sn-Glycero-3-Phosphocholin
PEIPC	1-Palmitoyl-2-(5,6-Epoxyisoprostan E2)-sn-Glycero-3-Phosphocholin
PG	Phosphatidylglycerol
PGPC	1-Palmitoyl-2-Glutaryl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
PI	Phosphatidylinositolamin
PL	Phospholipid
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PONPC	1-Palmitoyl-2-(9'-Oxo-Nonanoyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholin
POVPC	1-Palmitoyl-2-(5'-Oxo-Valeroyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholin
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
Prec	Precursor
PS	Phosphatidylserin
PS – DVB	Polystyrol Divinylbenzol
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
PV – PPS	Polyvinyl Pyridin-Polystyrol
ROS	Reactive Oxygen Species
RP – LC	Reversed Phase Liquid Chromatography
rpm	rounds per minute
SEC	Size Exclusion Chromatography
SEV	Sekundärionenvervielfacher

SIM.....	Selected Ion Monitoring
SM.....	Sphingomyelin
SPE.....	Solid Phase Extraction
SRM.....	Selected Reaction Monitoring
Tab.....	Tabelle
TAG.....	Triacylglycerid
TEM.....	Temperatur
TIC.....	Total Ion Chromatogramm
TLC.....	Thin Layer Chromatography
TOF.....	Time of Flight
u.A.....	unter Anderem
u.Ä.....	und Ähnliches
UV.....	Ultraviolett
VHDL.....	Very High Density Lipoprotein
VLDL.....	Very Low Density Lipoprotein
WLD.....	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
z.B.....	zum Beispiel

1. Einleitung

Phospholipide sind wichtige Bausteine der Zellmembran und sie haben unterschiedliche Funktionen in biologischen Systemen wie strukturgebende und metabolische Aufgaben, sowie die Bildung bioaktiver Mediatoren. Oxidative Veränderungen an Phospholipiden können durch oxidativen Stress, enzymatisch oder auch nicht – enzymatisch erfolgen.

Oxidativer Stress in der Zelle wird hervorgerufen, wenn das System Oxidantien/Antioxidantien aus dem Gleichgewicht gerät und dieser führt zur Schädigung von Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen, aber auch Lipiden. Dabei führt die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte Lipidperoxidation zu einer Vielzahl von Radikalkettenreaktionen und somit zu einer großen Anzahl unterschiedlicher Oxidationsprodukte.

Oxidierete Phospholipide sind wichtige Lipidmediatoren in vielen Erkrankungen wie Artherosklerose, Metabolisches Syndrom, Autoimmunerkrankungen, Diabetes und entzündlicher Prozesse. Darüber hinaus wird auch eine regulatorische Wirkung in neurodegenerativen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Parkinson und Alzheimer vermutet.

Phosphatidylcholin (PC) ist jenes Phospholipid, das in Säugetierzellen am häufigsten vorkommt (40–50%), weshalb die meisten Oxidationsprodukte, die in Gewebe von Säugetieren gefunden werden, den Cholin-Rest tragen. Hauptangriffspunkte für Radikalkettenreaktionen sind die mit Phosphatidylcholin veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wo an den Doppelbindungen auf Grund der geringen Dissoziationsenergie sehr leicht Wasserstoffatome abgespalten werden können.

Voraussetzung für die Erforschung von oxidierten Phospholipiden ist auf Grund der niedrigen Konzentrationen eine leistungsstarke Analytik. Der Nachweis von oxidierten Phospholipiden gestaltet sich in komplexen biologischen Proben äußerst schwierig und die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Analysenmethoden sind oft die limitierenden Faktoren. Optimale Methoden für die Analytik von in vivo Markern für oxidativen Stress sind hoch spezifisch, sensitiv und ermöglichen einen hohen Probendurchsatz mit einem niedrigen Limit of Detection (LOD) und Limit of Quantitation (LOQ).

Im Allgemeinen erfüllen Massenspektrometrie basierte Analysenmethoden diese Anforderungen, weshalb seit Entwicklung der weichen Ionisationstechniken, wie Electrospray Ionisation und Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, diese immer größere Bedeutung in der Bioanalytik erlangen. Durch die weichen Ionisationstechniken wird die zerstörungsfreie Ionisierung von großen Molekülen möglich, wobei die Möglichkeit der Kopplung mit der Flüssigchromatographie einen weiteren Vorteil bietet, da dadurch komplexe Probengemische aufgetrennt werden können.

Auf Seite der massenspektroskopischen Detektion ermöglicht der Einsatz eines Triple Quadrupol Systems im Vorläuferionenmodus mit $m/z = 184$ eine Identifizierung von Phosphatidylcholinen.

Speziell LC – MS/MS – Techniken bieten im Vergleich zu anderen Analysemethoden den Vorteil einer größeren Sensitivität, Spezifität und die Möglichkeit der Detektion vieler Analyten gleichzeitig. Durch Fourier – Transformations – Massenspektrometrie (FT – MS) können mit großer Genauigkeit die exakten Massen und damit die Summenformeln der Oxidationsprodukte ermittelt werden. Einen weiteren Vorteil hierbei bietet die Möglichkeit der Aufnahme von Produktionenspektren, mit Hilfe derer durch das Vorhandensein spezifischer Fragmente das Ergebnis verifiziert werden kann.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden daher darin, eine reproduzierbare Methode für die Analytik von oxidierten Phospholipiden zu entwickeln, die Oxidationsprodukte von Phosphatidylcholin zu identifizieren und die Anwendbarkeit der hier entwickelten Methode auf eine biologische Probe zu demonstrieren.

2. Charakterisierung der Analyten

2.1 Allgemeines über Phospholipide:

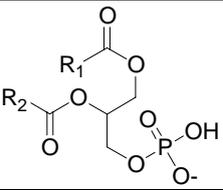
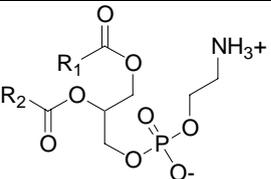
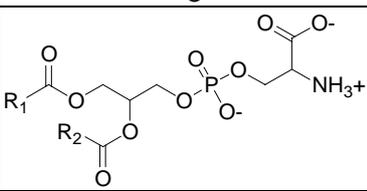
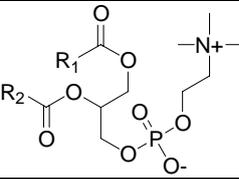
Phospholipide sind amphiphile Moleküle. Sie enthalten eine oder zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffketten und eine hydrophile Kopfgruppe, wobei es sich bei letzterer bei den Phospholipiden um einen Phosphodiester mit einem Alkohol oder Aminoalkohol handelt. Diese tragen mindestens eine negative Ladung am Phosphat und eine positive Ladung an der Aminogruppe.

Es gibt zwei Klassen von Phospholipiden: solche mit einem Glycerol-backbone, die sogenannten Glycerophospholipide, und solche mit einer Sphingosingruppe, die Sphingolipide.

Glycerophospholipide sind mittels Phosphatidylgruppe an ein Glycerolmolekül gebunden, welches mit zwei Fettsäuren verestert bzw. verethert ist. Je nachdem welche Alkylgruppe an die Phosphatidylgruppe gebunden ist, können die Glycerophospholipide in weitere Klassen unterteilt werden. Wird sie mit Cholin verestert entsteht Phosphatidylcholin (Lecithin), mit Ethanolamin entsteht Phosphatidylethanolamin, usw. [12]

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Glycerophospholipidklassen:

Tabelle 1: Die verschiedenen Phospholipidklassen

Phospholipid	Abkürzung	
Phosphatidsäure	PA	
Phosphatidylethanolamin	PE	
Phosphatidylserin	PS	
Phosphatidylcholin	PC	

Phosphatidylglycerol	PG	
Phosphatidylinositol	PI	

Phospholipide eukariotischer Zellen enthalten meist an der *sn*-1-Position des Glycerol-backbones eine gesättigte Fettsäure, während an die *sn*-2-Position häufig eine ungesättigte Fettsäure gebunden ist.

Die wichtigste Funktion der Glycerophospholipide besteht im Aufbau der Zellmembran. Diese besteht zu 30 – 80% aus Lipiden, wobei Phosphatidylcholin (PC) das in Säugetierzellen am häufigsten vorkommende Phospholipid ist, gefolgt von PE und den übrigen Phospholipidklassen [7].

2.2 Die Zellmembran

Eine Zellmembran ist ein 2-dimensionales Gebilde, bestehend aus Lipiden und Proteinen, wobei die Lipid - Doppelschicht die Basis für die Struktur der Zell- und Organellenmembranen darstellt. Eine Eigenschaft der Zellmembran ist deren Fluidität welche durch die Beweglichkeit der Moleküle in der Ebene der Membran zustande kommt.

Die Fluidität ist ein Maß für die Beweglichkeit der Moleküle und wird als die reziproke Viskosität der Membran ausgedrückt. Der halbflüssige Charakter der Membran ist verantwortlich für eine Vielzahl der Zellfunktionen, wobei schon kleine Veränderungen der Fluidität zu einer Veränderung dieser Funktionen führt.

Die Fluidität einer Membran wird hauptsächlich durch die Anwesenheit von ungesättigten Fettsäuren (engl.: Polyunsaturatet Fatty Acids, PUFA`s) bestimmt, wobei die PUFA`s Angriffspunkte für freie Radikale beim Prozess der Lipid – Peroxidation (siehe Abschnitt 2.4) darstellen und die Eigenschaften der Zellmembran dadurch erheblich verändert werden können [12].

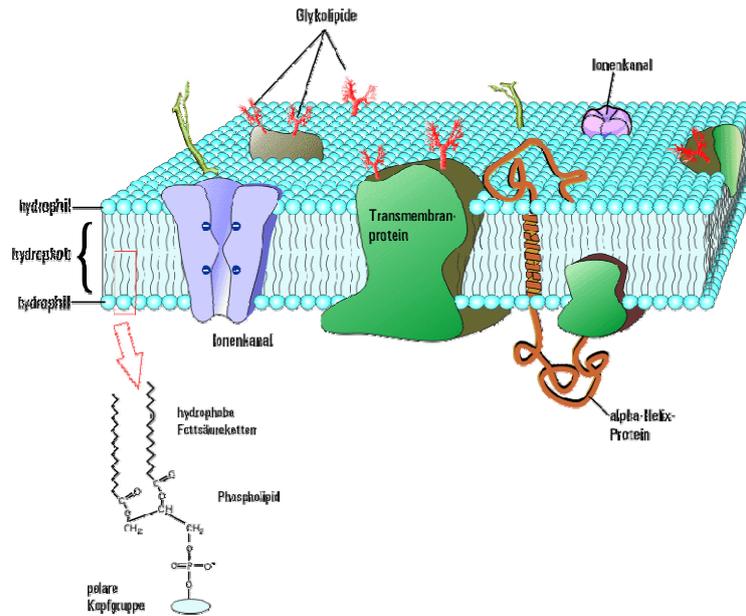


Abbildung 1: Zellmembran [29]

2.3 Lipoproteine:

Lipoproteine sind Aggregate aus Lipiden und Proteinen, welche mizellenähnliche Partikel mit einem unpolaren Kern aus Cholesterinestern und Triglyceriden und einer zur wässrigen Phase gerichteten Hülle aus polaren Anteilen, bestehend aus Protein, Phospholipiden und den Hydroxygruppen von unverestertem Cholesterin darstellen. Diese dienen in Säugetieren zum Transport der hydrophoben Lipide, mit Ausnahme freier Fettsäuren, sowie Cholesterin im Blut [37].

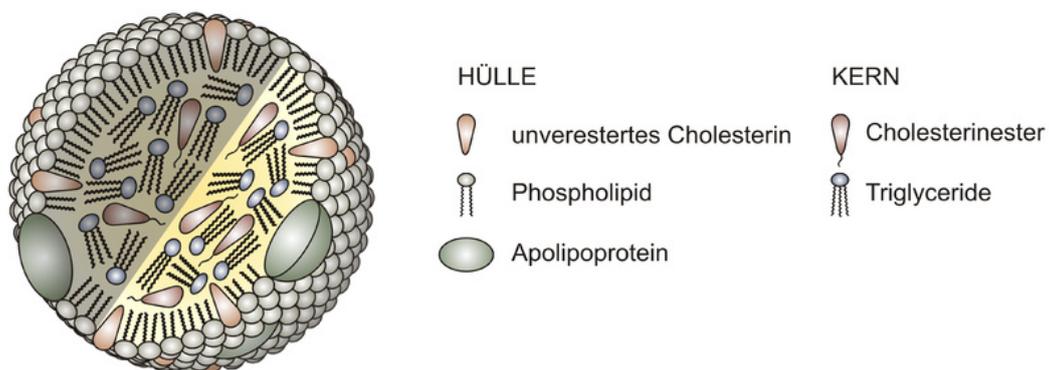


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Lipoproteins [37]

Nach ihrer Dichte werden die Lipoproteine in fünf Klassen eingeteilt:

Tabelle 2: Lipoproteinklassen [20]

Lipoprotein	Dichte [g/mL]	Masse [MDa]
VLDL (engl.: Very Low Density Lipoprotein)	< 1,006	5 – 130
IDL (engl.: Intermediate Density Lipoprotein)	1,006 – 1,019	3,5
LDL (engl.: Low Density Lipoprotein)	1,019 – 1,063	2,5
HDL (engl.: High Density Lipoprotein)	1,063 – 1,125	0,36
VHDL (engl.: Very High Density Lipoprotein)	1,125 – 1,210	0,20

Die einzelnen Klassen können somit auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt werden. Je größer der Anteil an Lipiden ist, desto geringer ist die Dichte [20].

1. VLDL

Die Größe dieser Lipoproteine liegt zwischen 25 und 100 nm. Sie enthalten weniger Triglyceride, dafür mehr Cholesterin und Phospholipide als Chylomikronen. Sie werden vorwiegend in der Leber, in geringerem Maße auch im Dünndarm synthetisiert [20].

2. IDL

Diese sind zwischen 30 und 50 nm groß und sind Zwischenprodukte bei der Konversion von VLDL zu LDL [20].

3. LDL

LDL sind jene Lipoproteine mit dem höchsten Cholesteringehalt wobei die durchschnittliche Größe bei 26 nm liegt. Pro LDL - Partikel findet sich ebenso wie in VLDL und IDL ein Apolipoprotein-B-100 Molekül.

Diese Lipoproteine sind die wichtigsten Cholesterin - Transporter des Blutes. Der stark hydrophobe Kern besteht zu 45 % aus Cholesterin welcher von einer Hülle aus Phospholipiden umgeben ist. Zur Versorgung der Gefäßwandzellen mit Cholesterin verlassen die LDL - Partikel das Blutplasma durch Filtration und vesikulärem Transport über das Endothel. Überschüssiges LDL wird von Makrophagen entfernt um Akkumulation und Alterung des LDL zu verhindern. Treten durch einen hohen Plasmaspiegel vermehrt LDL - Partikel in den subendothelialen Raum über, ist dieser Gleichgewichtszustand gefährdet. Durch eine längere Verweildauer des LDL in der Gefäßwand wird eine Oxidation der LDL - Partikel durch Radikale wahrscheinlicher [20, 4].

4. HDL bzw. VHDL

Diese werden auch als α - Lipoproteine bezeichnet und die Partikel weisen eine Größe von 8 – 10 nm auf [20].

2.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress in einer Zelle entsteht als Folge eines Ungleichgewichtes zwischen Antioxidantien und Oxidantien. Bei den Oxidationsmitteln handelt es sich vor allem um reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die sich durch eine hohe Reaktivität auszeichnen.

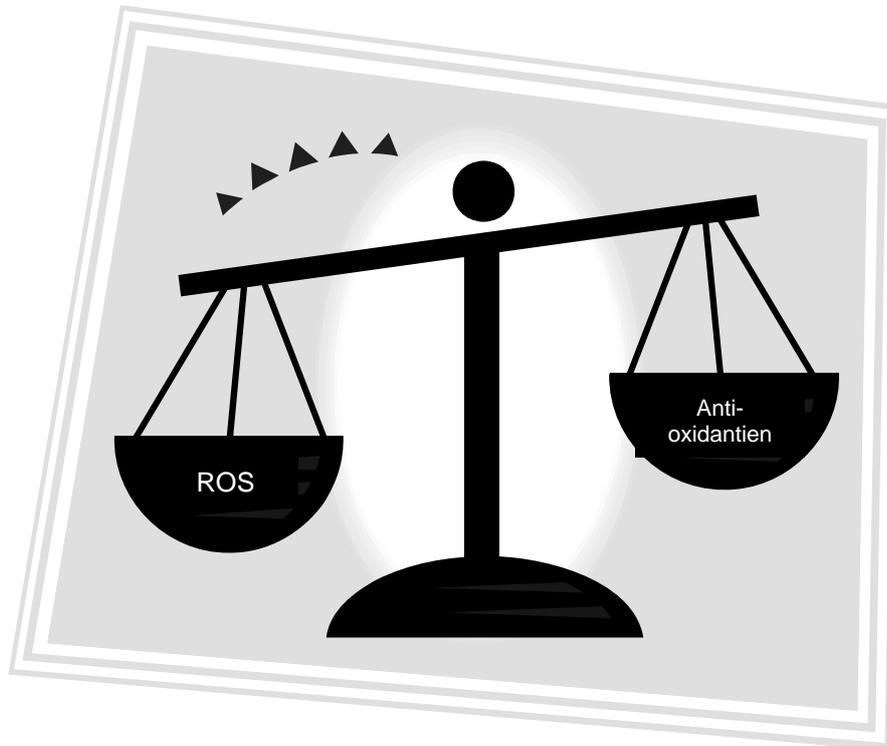


Abbildung 3: Gleichgewichtsverteilung bei oxidativem Stress

ROS und deren Nebenprodukte können zelltoxisch wirken, indem sie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide irreversibel oxidieren.

Oxidativer Stress wird mit der Pathogenese vieler Erkrankungen wie z.B. Artherosklerose, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und verschiedenen Krebsarten assoziiert.

ROS werden durch normale zelluläre Reaktionen in aeroben Organismen gebildet. Zu den Sauerstoffverbindungen mit ungepaarten Elektronen, den so genannten freien Radikalen, zählen das Superoxidanion (O_2^-), das Hydroxylradikal ($OH\cdot$), das Stickstoffmonoxidradikal ($NO\cdot$) und Lipidradikale. Weitere Sauerstoffderivate wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder die hypochlorige Säure ($HOCl$) sind zwar keine freien Radikale, werden aber wegen ihrer oxidierenden Eigenschaften zu den ROS gezählt.

Der allgemeine Prozess der Lipid - Peroxidation wird in drei Stufen eingeteilt:

1. Initiation (Start der Radikalkettenreaktion)
2. Propagation (Kettenfortpflanzung)
3. Termination (Kettenabbruch)

Lipidperoxidation:

R•.....freies Radikal

L.....Lipid

A.....Antioxidant

Ziel dieser ROS sind hauptsächlich die ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide in der Zellmembran und in LDL. Die Dissoziationsenergie der Kohlenstoff – Wasserstoffbindung bei Doppelbindungen ist sehr niedrig, weswegen an dieser Stelle sehr leicht ein Proton abgespalten und die Lipidperoxidation mittels Hydroxylradikalen initiiert werden kann. Dabei entsteht ein Lipidradikal ($L\cdot$), welches mit molekularem Sauerstoff (O_2) zum Lipidperoxyradikal ($LOO\cdot$) reagiert. Dieses Lipidperoxyradikal kann ein Wasserstoffatom von einer weiteren ungesättigten Fettsäure abstrahieren, so dass ein Lipid-Hydroperoxid ($LOOH$) und ein weiteres Lipidradikal entstehen.

Lipid - Hydroperoxid wird von Metallspezies wie Fe^{2+} oder Cu^{2+} unter Reduktion gespalten und es entsteht ein Lipid Alkoxy Radikal ($LO\cdot$). Sowohl Lipid Alkoxyradikale als auch Peroxyradikale stimulieren die Lipidperoxidation, indem sie von intakten ungesättigten Fettsäuren Wasserstoffatome abstrahieren und so weitere Radikale erzeugen. Zusätzlich zerfallen die Lipid - Hydroperoxide in Anwesenheit von den oben erwähnten reduzierten Metallspezies und es entstehen reaktive Aldehyde wie z.B. Malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) und 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) [3].

Durch die Peroxidation der ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide in der Zellmembran werden die Eigenschaften der Lipiddoppelschicht wie Fluidität und Permeabilität erheblich verändert. Es kommt zu Änderungen des Ionentransportes und zur Inhibierung von metabolischen Prozessen.

Modifizierungsreaktionen an LDL ermöglichen dessen verstärkte Aufnahme durch den sogenannten Scavenger – Rezeptor. Dieser weist eine hohe Affinität zu stark oxidativ modifiziertem LDL auf und ist neben weiteren möglichen oxLDL Rezeptoren (CD36-, F_c-Rezeptor) für die Anhäufung von LDL – Lipiden in Zellen verantwortlich. Die Bildung der „fatty streaks“, den sogenannten Fettstreifen in den Arterien, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung von komplizierten Plaqueablagerungen darstellen, wird über diesen Mechanismus erklärt.

Für die Entstehung von atherosklerotischen Plaques wird ein 2-Stufen Modell angenommen, dessen erste Stufe, die Entwicklung der „fatty streaks“ durch das Vorhandensein von LDL ermöglicht wird, dass aber die Umwandlung zu fibrösen Plaques im zweiten Schritt durch die Risikofaktoren Rauchen, Bluthochdruck und Diabetes gefördert wird [4].

Den Modifizierungsreaktionen von LDL wird damit eine große Bedeutung in der Atherogenese zugesprochen. Modifiziertes LDL wird von Makrophagen aufgenommen die sich dann in Schaumzellen umwandeln [4].

Oxidiertes LDL und seine Bestandteile haben, abhängig vom Ausmaß der Oxidation eine Vielzahl von Auswirkungen auf die an der Atherogenese beteiligten Zellen und deren Funktionen [4]:

Tabelle 3: Atherogene Effekte von oxLDL - Auswahl [4]

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• OxLDL wird schnell von Makrophagen aufgenommen und führt zur Anreicherung von Cholesterin und zur Schaumzellbildung• OxLDL ist zytotoxisch• OxLDL hemmt die Beweglichkeit von Gewebsmakrophagen• OxLDL fördert den Gerinnungsablauf• OxLDL ist immunogen und induziert Antikörperbildung |
|--|

2.5 Produkte der Lipidperoxidation

Die Oxidation von Lipiden kann sowohl enzymatisch, als auch nicht - enzymatisch erfolgen. Zu den Lipid - oxidierenden Enzymen zählen unter anderem die Lipoxygenase, die Myeloperoxidase und die NADPH Oxidase. Eine beträchtliche Menge von Lipidoxidationsprodukten entsteht jedoch durch nicht - enzymatische Oxidation, welche durch die Anwesenheit von ROS ausgelöst wird [9].

Wie bereits erwähnt, werden bei der Lipidperoxidation hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren angegriffen.

Die in der Zellmembran von Säugetieren am häufigsten vorkommenden ungesättigten Fettsäuren sind die Linolsäure (9Z, 12Z - Octadecadiensäure) und die Arachidonsäure (5Z, 8Z, 11Z, 14Z - Eicosatetraensäure).

Die Produkte, welche bei der Lipidperoxidation entstehen, lassen sich zunächst in zwei Gruppen einteilen:

Zum einen in Oxidationsprodukte mit einer niedrigeren Masse, welche durch Spaltung der ungesättigten Fettsäureketten entstehen, zum anderen in Produkte mit einer höheren Masse als die des ursprünglichen Phospholipids, welche durch Modifikation und Addition von Sauerstoffatomen an die ungesättigte Fettsäure des Phospholipids entstehen. Diese lassen sich wiederum einteilen, je nachdem wie viele Sauerstoffatome an die ungesättigte Fettsäure addiert wurden.

Da Phosphatidylcholin das in der Zellmembran von Säugetieren am häufigsten vorkommende Phospholipid ist, tragen die meisten bereits identifizierten Oxidationsprodukte aus Gewebeproben von Säugetieren den Cholinrest.

Wichtige in vitro Marker für oxidativen Stress sind die sogenannten Isoprostane (IsoPs) welche durch Peroxidation der mit dem Phosphatidylcholinrest veresterten Arachidonsäure (20:4) entstehen.

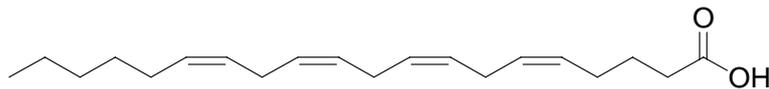


Abbildung 4: Arachidonsäure (20:4)

Sämtliche dieser Produkte der Lipid - Peroxidation (Abb. 5) werden in artherosklerotischen Ablagerungen in erhöhter Konzentration vorgefunden [9].

Isoprostane sind Prostaglandin - ähnliche Komponenten, die in vivo durch Peroxidation mit ROS, unabhängig von enzymatischer Oxidation, gebildet werden. Diese zählen zur Gruppe der Oxidationsprodukte, welche eine größere Masse als das Ausgangsphospholipid aufweisen [3].

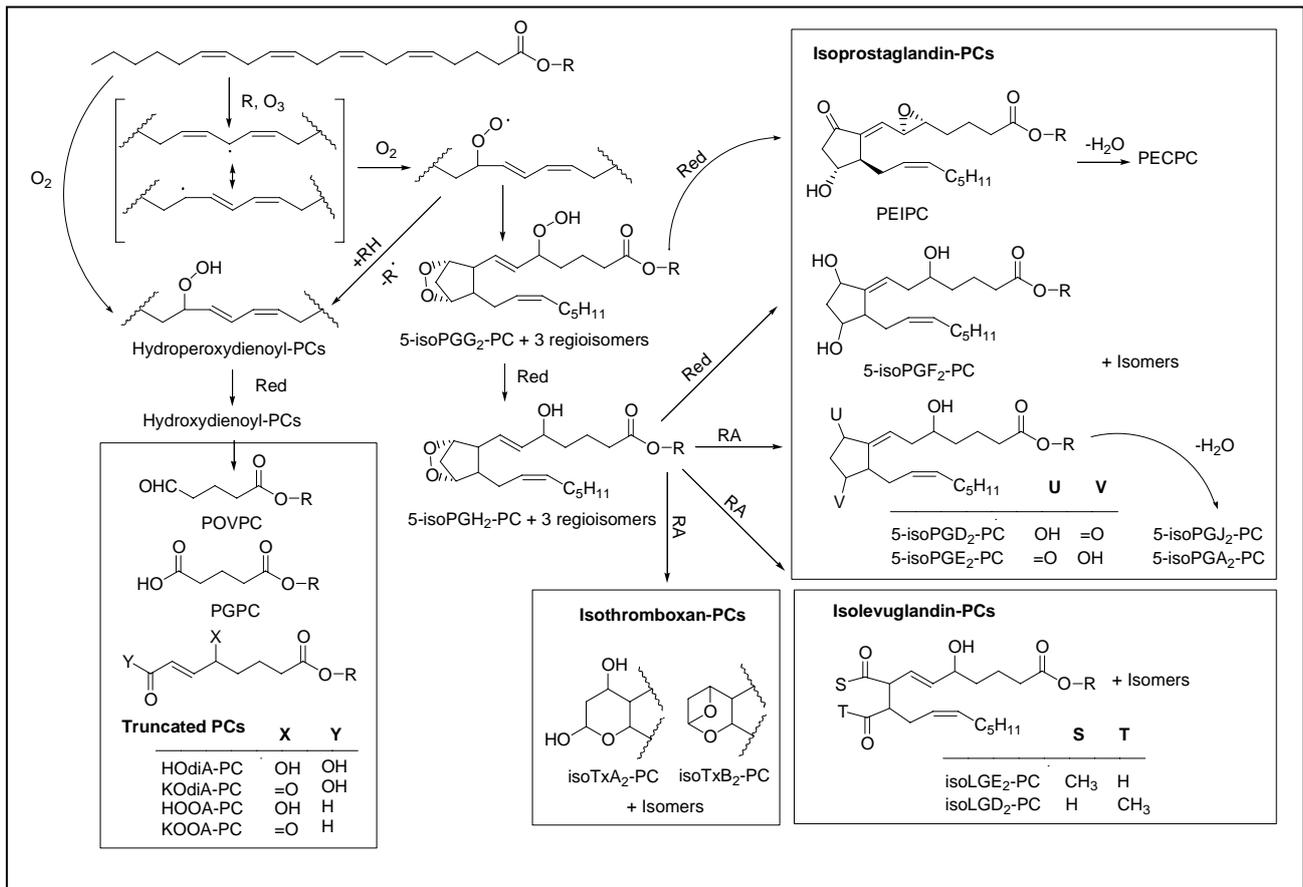


Abbildung 5: Reaktionsschema der radikalischen Lipidperoxidation von Arachidonsäure [9]

2.6 Metabolismus und Entgiftung der oxidierten Phospholipide

Was passiert eigentlich im Organismus mit den entstandenen Phospholipiden? Gibt es einen Mechanismus zur Entgiftung bzw. den Abbau dieser?

Es sind einige Enzyme bekannt, welche mit oxidierten Phospholipiden interagieren können. Eines dieser Enzyme ist die Phospholipase A₂ (PLA₂), welche spezifisch die Fettsäure (auch durch Oxidation modifizierte Acylgruppen) von Phospholipiden an der *sn*2-Position hydrolysiert.

Es gibt drei Hauptgruppen von PLA₂:

- Ca²⁺ - abhängige cytosolische PLA₂ (cPLA₂)
- Ca²⁺ - abhängige sekretorische PLA₂ (sPLA₂)
- Ca²⁺ - unabhängige intrazelluläre PLA₂ (iPLA₂)

Alle diese Enzyme können mit einer oxidierten Fettsäure an der *sn*-2 Position des Phospholipids reagieren. Es wurden Enzyme mit A₂ - Aktivität, welche die Hydrolyse der oxidierten Fettsäuren katalysieren sowohl in Zellmembranen als auch in LDL und HDL gefunden.

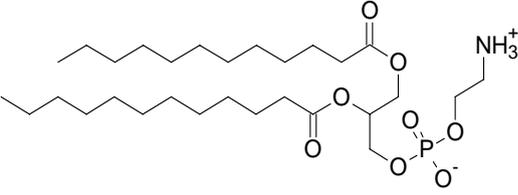
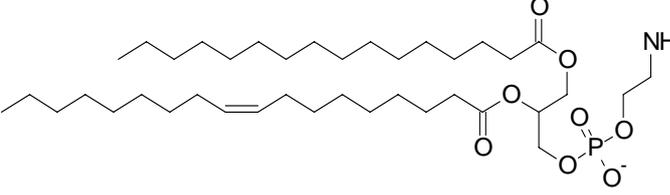
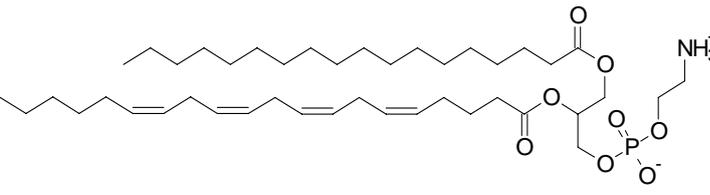
Bei der Lipidperoxidation entstehen auch eine Reihe von Aldehyden, welche mittels Aldolase Reductase abgebaut werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Entgiftung von einigen Spezies der oxidierten Phospholipide bereits eingehend untersucht wurde, dass aber noch sehr viel Forschungsarbeit notwendig ist, um ein vollständiges Bild des Metabolismus dieser in der Zelle zu erhalten [21].

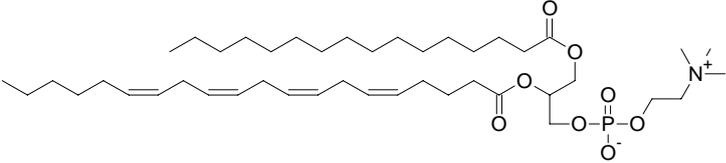
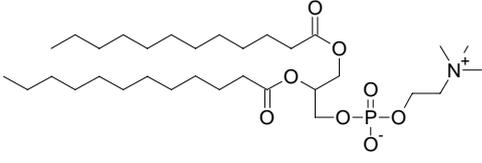
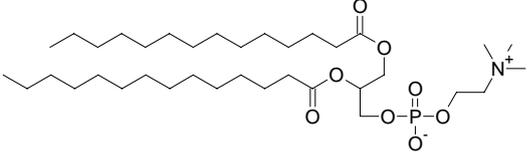
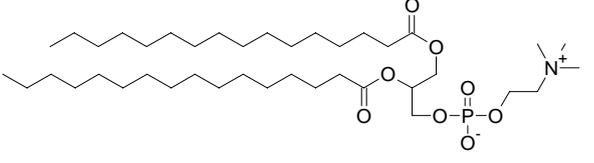
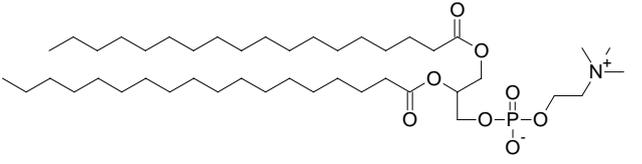
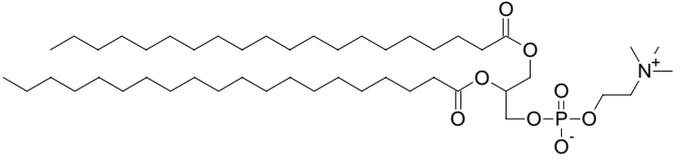
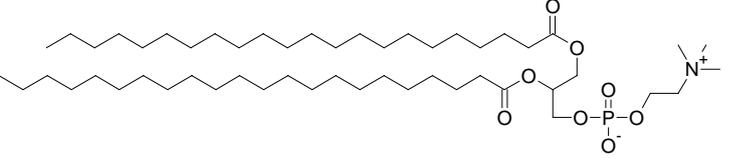
2.7 Beschreibung der eingesetzten Lipide:

In folgendem Abschnitt werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lipide kurz beschrieben:

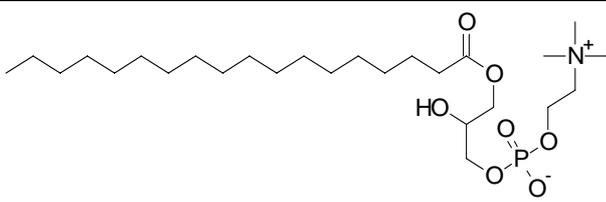
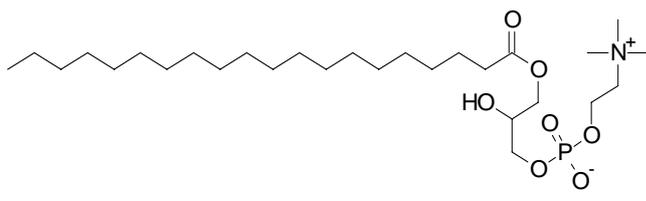
- **Phosphatidylethanolamine:**

Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{29}H_{58}NO_8P$ Exakte Masse: 579,39 g/mol PE 24:0	1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
	Summenformel: $C_{39}H_{76}NO_8P$ Exakte Masse: 717,53 g/mol PE 34:1	1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecaenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
	Summenformel: $C_{43}H_{78}NO_8P$ Exakte Masse: 767,55 g/mol PE 38:4	1-octadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

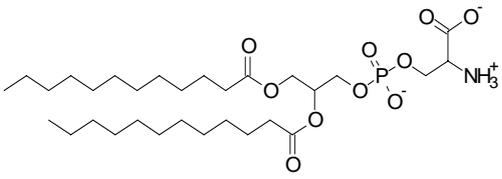
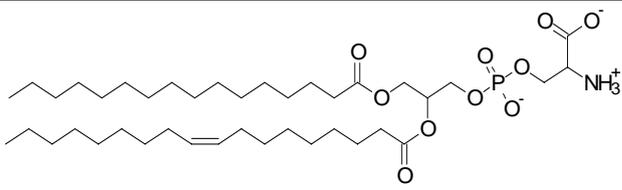
- Phosphatidylcholine:**

Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{44}H_{81}NO_8P$ Exakte Masse: 781,56 g/mol PC 36:4	1-hexadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{32}H_{64}NO_8P$ Exakte Masse: 621,44 g/mol PC 24:0	1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{36}H_{72}NO_8P$ Exakte Masse: 677,50 g/mol PC 28:0	1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{40}H_{80}NO_8P$ Exakte Masse: 733,56 g/mol PC 32:0	1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{44}H_{88}NO_8P$ Exakte Masse: 789,62 g/mol PC 36:0	1,2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{48}H_{96}NO_8P$ Exakte Masse: 845,69 g/mol PC 40:0	1,2-dieicosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{52}H_{104}NO_8P$ Exakte Masse: 901,75 g/mol PC 44:0	1,2-didocosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

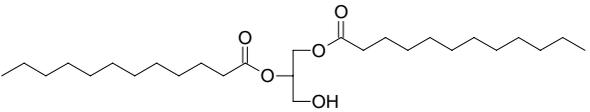
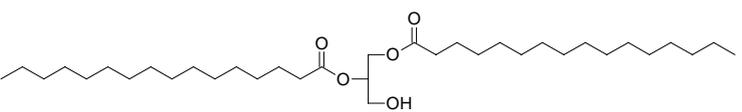
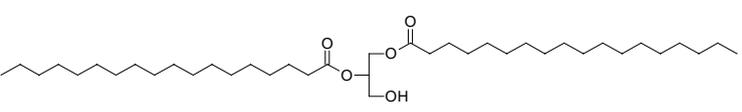
- **Lyso-Phosphatidylcholine:**

Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{26}H_{54}NO_7P$ Exakte Masse: 523,36 g/mol LPC 18:0	1-octadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine
	Summenformel: $C_{28}H_{58}NO_7P$ Exakte Masse: 551,40 g/mol LPC 20:0	1-eicosanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine

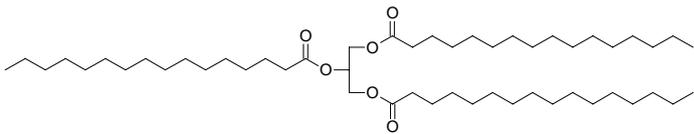
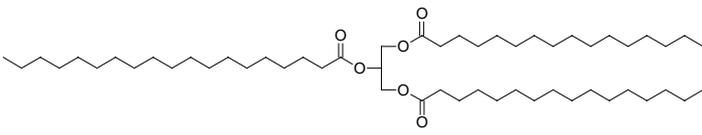
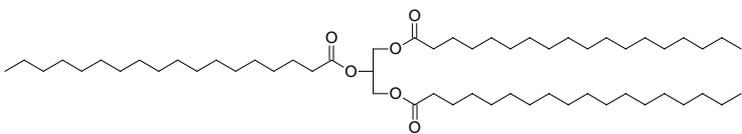
- **Phosphatidylserine:**

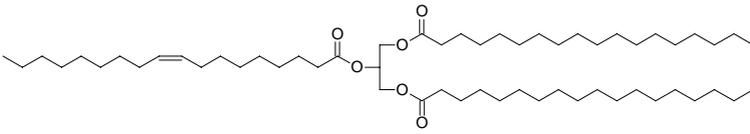
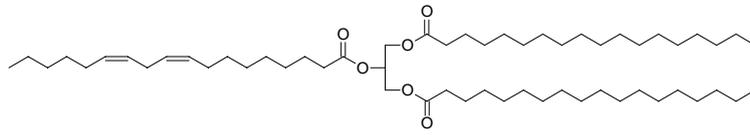
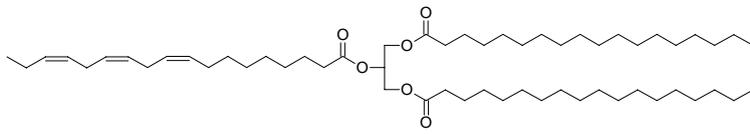
Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{30}H_{57}NO_{10}P$ Exakte Masse: 622,37 g/mol PS 24:0	1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphoserine
	Summenformel: $C_{40}H_{75}NO_{10}P$ Exakte Masse: 760,51 g/mol PS 34:1	1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecaenoyl)-sn-glycero-3-phosphoserine

- **Diglyceride:**

Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{27}H_{52}O_5$ Exakte Masse: 456,38 g/mol DAG 24:0	1,2-didodecanoyl-sn-glycerol
	Summenformel: $C_{35}H_{68}O_5$ Exakte Masse: 568,51 g/mol DAG 32:0	1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol
	Summenformel: $C_{39}H_{76}O_5$ Exakte Masse: 624,57 g/mol DAG 36:0	1,2-dioctadecanoyl-sn-glycerol

- **Triglyceride:**

Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{51}H_{98}O_6$ Exakte Masse: 806,74 g/mol TAG 48:0	1,2,3-trihexadecanoyl-sn-glycerol
	Summenformel: $C_{54}H_{104}O_6$ Exakte Masse: 848,78 g/mol TAG 51:0	1,2-dihexadecanoyl-3-nonadecanoyl-sn-glycerol
	Summenformel: $C_{57}H_{110}O_6$ Exakte Masse: 890,83 g/mol TAG 54:0	1,2,3-trioctadecanoyl-sn-glycerol

Struktur	Daten	IUPAC
	Summenformel: $C_{57}H_{108}O_6$ Exakte Masse: 888,81 g/mol TAG 54:1	1,3-dioctadecanoyl-2-(9Z-octadecaenoyl)-sn-glycerol
	Summenformel: $C_{57}H_{106}O_6$ Exakte Masse: 886,80 g/mol TAG 54:2	1,3-dioctadecanoyl-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-sn-glycerol
	Summenformel: $C_{57}H_{104}O_6$ Exakte Masse: 884,78 g/mol TAG 54:3	1,3-dioctadecanoyl-2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-sn-glycerol

3. Stand der Analystechnik

3.1 Oxidationsmöglichkeiten von ungesättigten Fettsäuren in vitro:

In der Literatur sind einige Methoden zur in vitro Oxidation von Lipiden beschrieben:

3.1.1 Autoxidation eines Phospholipids :

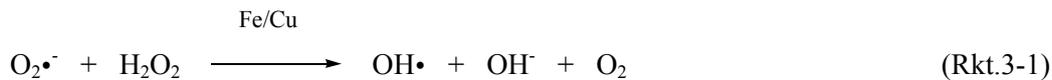
Ein Phospholipid, welches mit einer einfach ungesättigten Fettsäure bzw. mit einer PUFA verestert ist, wird an der Luft bei Raumtemperatur oxidiert [26].

3.1.2 Peroxidation eines Phospholipids mit einem Metallion als Katalysator:

Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} und Cu^{2+} sind wichtige Katalysatoren bei der nicht - enzymatischen Lipidperoxidation in vivo.

Da das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in vivo produziert werden, wird angenommen, dass durch Metallkatalyse diese beiden reaktiven Spezies über die Haber – Weiss - Reaktion in das sehr viel reaktivere Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) umgewandelt werden. In vitro wird die Oxidation von Phospholipiden durch Zugabe von H_2O_2/Fe^{2+} oder Cu^{2+} eingeleitet [11].

Lipidperoxidation mit Metallen (Haber – Weiss - Reaktion) [11]:

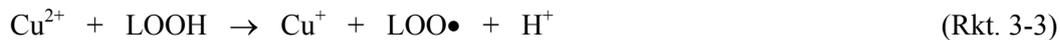


Ein Beispiel für die Oxidation von Fe^{2+} mit H_2O_2 ist die Fenton – Reaktion [11]:



Das so entstandene Hydroxylradikal wirkt als Initiator bei der Lipidperoxidation, die in Abschnitt 2.4 näher beschrieben ist.

Bei der durch Kupferionen induzierten Lipidperoxidation wird angenommen, dass Cu^{2+} bzw. Cu^+ - Ionen Lipidhydroperoxide (LOOH) oxidieren:



Die dabei entstehenden Peroxyl- ($\text{LOO}\bullet$) bzw. Alkoxy- ($\text{LO}\bullet$) Radikale initiieren des Weiteren die Oxidation von PUFA's durch Wasserstoff – Abstraktion (siehe Abschnitt 2.4, Rkt. 2-1 – 2-5) [2].

3.1.3 Enzymatische Oxidation:

Es gibt einige Enzyme, die die Oxidation von Phospholipiden katalysieren. Die Oxidationsprodukte, welche aus enzymatischen Oxidationsreaktionen resultieren, unterscheiden sich oft von den Oxidationsprodukten aus nicht - enzymatischen Oxidationsreaktionen.

Zu den Enzymen, die für die Lipidoxidation in vitro eingesetzt werden, zählen unter anderem die Lipoxygenase [7].

3.1.4 Oxidation von Phospholipiden mit Radikalkettenstartern:

Eine Möglichkeit für die in – vitro Oxidation von Phospholipiden besteht auch durch Initiation mittels Radikalkettenstartern wie 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) [14].

3.1.5 Oxidation von LDL in vitro:

Auch die in vitro Oxidation von LDL wurde bereits eingehend mit den unterschiedlichsten Initiatoren untersucht. Zu diesen Initiatoren zählen 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,2'-azobis(2,2-dimethylvaleronitrile) (AMVM), Kupferionen, Ceruloplasmin, Metmyoglobin/Myeloperoxidase/H₂O₂, Horseradish Peroxidase/H₂O₂, Myeloperoxidase/H₂O₂, Lactoperoxidase/H₂O₂, 15-Lipoxygenase und HOCl [2].

3.2 Analyse und Identifikation von oxidierten Phospholipiden:

Da die Analyse und Identifikation von oxidierten Phospholipiden in unterschiedlichen Gebieten immer größere Bedeutung erlangt, ist die Entwicklung einer leistungsstarken Analysenmethode mit möglichst geringem Probenvorbereitungsaufwand unerlässlich.

Zur Analyse dieser Spezies müssen diese in natürlichen Proben erst von anderen Lipiden, wie Triglyceriden, unoxidierten Phospholipiden oder Cholesterolen abgetrennt werden. Dazu werden chromatographische Techniken, wie die Dünnschichtchromatographie (engl.: Thin-Layer Chromatography, TLC), Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction, SPE) oder die Hochleistungs - Flüssigchromatographie (engl.: High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) eingesetzt.

Die HPLC kann weiters unterteilt werden in Normalphasen-LC (NP-LC) und in Umkehrphasen-LC (engl.: Reversed Phase LC, RP-LC). Die Auftrennung der Analyten bei der NP-LC erfolgt nach den Phosphadityl - Kopfgruppen, während die Auftrennung bei der RP-LC nach der Länge der Fettsäureketten an den Phospholipiden erfolgt [21].

Die Detektion der Phospholipide erfolgt z.B. mit UV - Detektoren oder mittels Lichtstreuendetektor (engl.: Evaporative Light - Scattering Detection, ELSD). Ein Nachteil der UV - Detektion ist, dass Phospholipide bei etwa 200 nm mit einem sehr geringen Extinktionskoeffizienten absorbieren. Der ELSD - Detektor hat den Nachteil, dass er eine geringe Selektivität aufweist und die Identifikation der oxidierten Phospholipide auf Grund des Retentionsverhaltens der einzelnen Spezies im Vergleich zu einem bekannten Standard erfolgt [24].

Die Massenspektrometrie (MS) ist jene Detektionsmethode, die am häufigsten zur Analyse von Biomolekülen eingesetzt wird. Diese Tatsache ist auf die Entdeckung schonender Ionisationstechniken wie die Electrospray Ionisation (ESI) und die Matrix - Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) zurückzuführen, welche die Ionisation von thermolabilen und nicht - flüchtigen Analyten ermöglichen. Vorteile der Massenspektrometrie gekoppelt mit der Flüssigchromatographie (LC/MS) sind, dass

unterschiedliche Spezies simultan detektiert und anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses ohne den Gebrauch von Standardsubstanzen identifiziert werden können [21].

Bei den oben genannten Ionisationstechniken erfolgt keine Fragmentierung der Lipide, so dass Informationen über die Masse des intakten Moleküls erhalten werden können.

Zusätzlich dazu können Informationen über die Struktur des Analyten durch den Einsatz der Tandem - Massenspektrometrie (MS^n) erhalten werden. Bei dieser Technik wird eine bestimmte Masse der ionisierten Probenmoleküle selektiert, in einer Kollisionszelle fragmentiert und die Produktionen werden detektiert. Diese Fragmentierung wird auch als Collision Induced Dissociation (CID) bezeichnet und erfolgt üblicherweise mit einem Inertgas [7].

Je nach Art der Ladung der ionisierten Probenmoleküle erfolgt die Detektion im positiven oder negativen Modus. Im positiven Modus können auf Grund der positiven Ladung am quartären Ammonium Phosphatidylcholine und Sphingomyeline detektiert werden, während PI und PG ausschließlich im negativen Modus detektiert werden. PS und PE können sowohl im positiven als auch im negativen Modus analysiert werden [21].

Zur Bestimmung der exakten Masse der oxidierten PL setzt man zur Detektion Ionenfallen-Massenspektrometer bzw. Fouriertransformations - Massenspektrometer (FT - MS) ein. Da bei ESI - MS Experimenten ausschließlich Informationen über die Molekülmasse des Analyten erhalten werden, kann deshalb nur eine Aussage über die exakte Masse des Oxidationsproduktes gemacht werden. Mehr Informationen über die Struktur dagegen erhält man durch die Aufnahme von Produktionenspektren (MS/MS).

Durch Selektion einer bestimmten Masse und Fragmentierung dieser in einer Kollisionszelle können die Oxidationsprodukte durch Bestimmung der exakten Masse und der Produktionen mittels FT - MS identifiziert werden.

In der Kollisionszelle entstehen charakteristische Fragmentationen. So können z.B. im positiven Modus Fragmentationen detektiert werden, welche Aufschluss über die Kopfgruppe des Phospholipids geben oder es entstehen Fragmentationen durch Verlust der Fettsäuren bzw. der oxidierten Fettsäuren. Typische Addukte im positiven Modus sind die Quasimoleküllionen $[M+H]^+$ oder $[M+NH_4]^+$ bzw. $[M+Na]^+$.

Im negativen Modus können die Massen der freien Fettsäuren bzw. der durch Oxidation modifizierten Fettsäuren, welche sich in der Kollisionszelle abgespalten haben, detektiert werden. Bei den Addukten, die im negativen Modus entstehen, handelt es sich üblicherweise um $[M-H]^-$ oder $[M-CH_3]^-$ [7].

3.3 Isolation von LDL und Lipidextraktion:

Die LDL – Fraktion ($1,019 - 1,063 \text{ g/cm}^3$, siehe Abschnitt 2.3) wird durch Ultrazentrifugation von Humanplasma gewonnen. Zur Abtrennung der dabei zugegebenen Salze wird das LDL vor der Extraktion der Lipide dialysiert [5].

Gängige Methoden zur Flüssig/Flüssig – Extraktion der Lipide aus LDL ist die Extraktion nach Bligh und Dyer [1] sowie die Extraktion nach Folch [8]. Bei diesen Methoden wird die Löslichkeit der Alkylketten der Lipide in organischen Lösungsmitteln ausgenutzt. Die Extraktion nach den oben genannten Methoden erfolgt mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) nach Folch bzw. mit dem Verhältnis Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) nach Bligh and Dyer.

Die Grundlagen der einzelnen Analysenmethoden sollen in folgendem Abschnitt genauer besprochen werden.

4. Analytische Grundlagen

4.1 Extraktionsmethoden in der organischen Analytik:

Für die Analyse organischer Moleküle ist meist eine Abtrennung der Analyten von der Matrix erforderlich. Ein gängiges Verfahren dafür ist die Extraktion (lat.: extrahere = herausziehen), bei dem aus festen oder flüssigen Substanzgemischen mit Hilfe geeigneter Extraktionsmittel die Analyten herausgelöst werden.

Dazu gibt es unterschiedliche Extraktions- bzw. Trennmethoden:

- Fest/Flüssig-Extraktion
- Flüssig/Flüssig-Extraktion
- Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction, SPE)
- Dünnschichtchromatographie (engl.: Thin Layer Chromatography, TLC)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- Gaschromatography (GC)

4.1.1 Fest/Flüssig-Extraktion:

Die Extraktion der Analyten aus festen Proben kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

Neben den klassischen Extraktionsmethoden wie Batch- und Soxlethextraktion, welche meist zeitaufwändig und ineffizient sind, kommen heute sehr oft automatisierbare Methoden mit erhöhtem Probendurchsatz wie die Wirbelschichtextraktion (engl.: Fluidized-Bed Extraction, FEB), Mikrowellenunterstützte Extraktion (engl.: Microwave Assisted Extraction, MAE) und die beschleunigte Lösemittelextraktion (engl.: Accelerated Solvent Extraction, ASE) zur Anwendung [22].

4.1.2 Flüssig/Flüssig-Extraktion:

Grundlage der Flüssig/Flüssig-Extraktion ist die Verteilung von Stoffen zwischen zwei nicht -mischbaren Flüssigkeiten, welche miteinander in Kontakt gebracht werden. Die Stofftrennung basiert auf der Löslichkeit eines Stoffes in einem Lösungsmittel und folgt dabei dem Nernst'schen Verteilungssatz:

$$K = \frac{c_{B1}}{c_{A1}} \quad (\text{Gl. 3-1})$$

K.....Gleichgewichtskonstante

c_{A1}, c_{B1}Konzentrationen der Substanz nach Einstellung des Gleichgewichtes [22]

4.1.3 Festphasenextraktion:

Bei der Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction, SPE) handelt es sich um eine Probenvorbereitungsmethode, die von der klassischen Chromatographie abgeleitet wurde.

Die SPE ermöglicht es, Analyten aus einer Probe zu isolieren und anzureichern. Ferner ermöglicht sie die Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen. Für die Extraktion werden Kartuschen aus Kunststoff oder Glas verwendet, die zwischen zwei Fritten ein festes Sorbens enthalten. Die Auswahl des Festphasenmaterials wird durch die Polarität der zu extrahierenden Stoffe und die Art der Matrix bestimmt. Als Materialien werden beispielsweise Kieselgel, Aluminiumoxid, modifizierte Kieselgele, Ionenaustauscher, Polymere oder ähnliche aus der Flüssigchromatographie bekannte Festphasen verwendet. Die Trennmechanismen bzw. Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen und dem Sorbens beruhen dabei auf den gleichen Prinzipien wie in der Flüssigkeitschromatographie, z.B. Van – der - Waals-, Dipol-Dipol-, elektrostatische Wechselwirkungen (Coulomb - Wechselwirkungen) oder auch Wasserstoffbrückenbindungen. Allgemein gilt hierfür, dass die schwachen Van – der – Waals - Wechselwirkungen zu unselektiver Retention und stärkere Wechselwirkungen wie beispielsweise die Coulomb - Wechselwirkungen zu eher selektiver Retention der Verbindungen einer Probe führen. Die Menge an Festphasenmaterial und die Dimension der Kartusche richtet sich nach der eingesetzten

Proben- bzw. Analytmenge. Eine Vielzahl an SPE - Kartuschen ist bereits für verschiedenste Trennprobleme kommerziell erhältlich.

Bevor die zu analysierende Komponente durch das Sorbens geleitet wird, muss die Säule zunächst konditioniert werden. Bei der Extraktion des Analyten findet ein Sorptionsprozess zwischen der festen stationären Phase und der flüssigen mobilen Phase statt. Hierbei können die Wechselwirkungskräfte des Analyten mit der festen Phase stärker oder schwächer als mit dem Elutionsmittel sein. Es können die zu bestimmenden Analyten somit zurückgehalten und die Interferenzen eluiert werden, aber es ist auch möglich die Interferenzen zu eluieren und die Analyten auf der Säule zurückzuhalten.

Die Vorteile der Festphasenextraktion gegenüber der Flüssig/Flüssig - Extraktion sind einfache Handhabung, schnelle Extraktion, je nach eingesetztem Sorbens hohe Selektivität, Verbrauch von geringen Mengen an organischen Lösungsmitteln und damit verbunden hohe Anreicherungsfaktoren. Die Möglichkeit der Automatisierung sowie der direkten Kopplung mit der Hochleistungs-Flüssigchromatographie sind weitere Vorteile dieser Methode. Die Festphasenextraktion stößt allerdings, trotz Anwendungsmöglichkeit von Spezialphasen bei extrem polaren, gut wasserlöslichen Analyten an ihre Grenzen [22].

4.1.4 Dünnschichtchromatographie:

Unter Dünnschichtchromatographie versteht man ein analytisches bzw. auch präparatives chromatographisches Trennverfahren welches im Prinzip eine spezielle Ausführungsart der Flüssigchromatographie darstellt. Dabei wandert ein Lösungsmittel durch Kapillarkräfte an einem festen, feinporigen Trägermaterial (z.B. Kieselgel) aufwärts. In der Regel wird ein Gemisch aus unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln verwendet. Sind in der Probe unterschiedliche Substanzen mit verschiedenen funktionellen Gruppen vorhanden, so gibt es Adsorptionswechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit dem Trägermaterial.

Sowohl in der GC als auch in der HPLC wird die mobile Phase durch Vorgabe einer externen Druckdifferenz durch die Trennsäule transportiert. Im Gegensatz dazu bewegt sich das Elutionsmittel in der DC aufgrund vorherrschender Kapillarkräfte über die Platte. Während GC- und HPLC - Chromatogramme eine zeitliche Auflösung der getrennten Verbindungen ergeben, erhält man nach der Entwicklung einer DC - Platte eine räumliche Auflösung des Substanzgemisches. Nach der Entwicklung und Trocknung müssen die getrennten Substanzen auf der DC - Platte detektiert werden. Hierbei ist die direkte optische Auswertung in der Regel nicht durchführbar, da nur wenige Verbindungsklassen eine ausreichende Eigenfärbung besitzen. Deswegen wird in den meisten Fällen die Plattenoberfläche mittels spezieller Reagenzien behandelt, sodass farbige Spots resultieren. Hierbei ist bei geeigneter Wahl der Sprüh- oder Tauchreagenzlösungen eine Selektivität für gewisse Verbindungsklassen erreichbar [22].

4.1.5 Flüssigchromatographie:

Das Prinzip der Flüssigchromatographie beruht auf der Wechselwirkung zwischen einer festen stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase.

Man unterscheidet verschiedene Arten der Flüssigchromatographie:

- NP- bzw. RP - Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
- Größenausschlusschromatographie (engl.: Size Exclusion Chromatographie, SEC)
- Affinitätschromatographie
- Ionenchromatographie (IC)
- Kapillarelektrophorese (CE)

Ein großer Vorteil der Hochleistungsflüssigchromatographie im Vergleich zur Gaschromatographie besteht darin, dass die Analyten nicht flüchtig bzw. thermostabil sein müssen. Für die HPLC ist nur die Bedingung gegeben, dass sich die Analyten in einem Lösungsmittel lösen.

Wichtige Parameter einer HPLC - Säule sind die Anzahl der theoretischen Böden und die Trennstufenzahl N . Je größer dabei die Zahl der theoretischen Böden ist, desto mehr Gleichgewichtseinstellungen sind während der Wanderung entlang der Trennstrecke möglich. Die Trennstufenzahl N ist somit ein unmittelbares, anschauliches Maß für die Effektivität oder Trennwirksamkeit des chromatographischen Phasensystems [15, 22].

Schematischer Aufbau einer HPLC - Anlage:

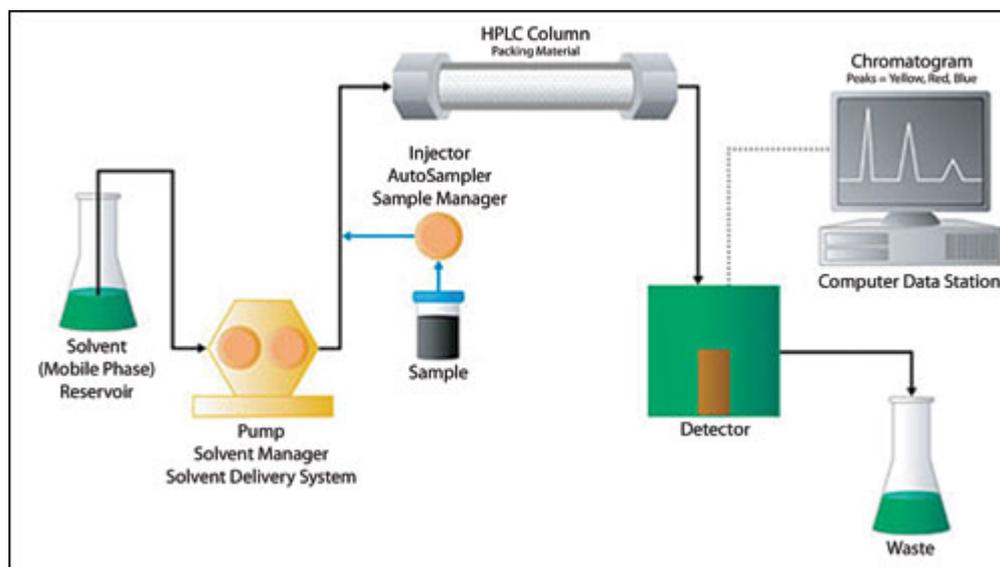


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines HPLC - Systems [36]

Die Lösungsmittel (die mobile Phase) werden nach Entgasung in den Vorratsgefäßen durch eine oder mehrere Pumpen gefördert. Mit Hilfe eines 6-Wege-Ventils wird eine Probenlösung in einem mit der mobilen Phase mischbaren Lösungsmittel injiziert. Der Trennvorgang findet auf der chromatographischen Säule statt, die bei Bedarf durch einen Säulenofen temperiert werden kann. Die getrennten Probenbestandteile werden anschließend mittels eines geeigneten Detektors, beispielsweise eines UV - Detektors nachgewiesen.

Weitere Detektionsmethoden wie beispielsweise Verdampfungs-, Lichtstreu-, Brechungsindex-, Fluoreszenz- oder elektrochemische Detektion werden je nach Fragestellung und Verfügbarkeit eingesetzt. Des Weiteren ist die Kopplung mit einem Massenspektrometer in der HPLC von großem Interesse, da eine weitgehende Identifizierung und eine hochselektive Bestimmung von Komponenten dadurch ermöglicht wird [22].

Je nach Polarität der stationären Phase unterscheidet man zwischen:

- Normalphasen-Flüssigchromatographie (NP - LC)
- Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RP - LC)
- Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC)

Weiters kann man die stationären Phasen nach dem Material einteilen, das ihnen zu Grunde liegt:

- Kieselgel
- Polymere (z.B. Polystyrol Divinylbenzol (PS - DVB), Polyvinyl Pyridin-Polystyrol (PV-PPS))
- Aluminiumoxid

Kieselgelsäulen bestehen aus sphärischen, sehr porösen Kieselgelpartikeln mit einem Durchmesser von meist 1.7 – 5 µm. Die Hydroxylgruppen an der Oberfläche der Partikel können leicht durch andere funktionelle Gruppen für die unterschiedlichsten Anwendungen substituiert werden. Weiters sind stationäre Phasen mit monolithischem Kieselgel erhältlich. Diese zeichnen sich durch eine hohe Porosität aus, wodurch eine höhere Trenneffizienz und schnellere Trennung von Gemischen mit einem geringeren Gegendruck erzielt wird.

Stationäre Phasen auf Polymerbasis besitzen im Gegensatz zu den stationären Phasen auf Kieselgelbasis eine höhere pH - Stabilität (bis pH = 14). Nichts desto trotz kommen diese auf Grund gewisser Nachteile, wie die schwierige Herstellung der Polymere und geringere Säuleneffizienz, weit weniger zur Anwendung als Erstere [27].

4.1.5.1 Normalphasen-Flüssigchromatographie:

Die NP-LC ist die älteste der oben genannten Methoden. Bei der stationären Phase handelt es sich um polare Materialien wie Kieselgel bzw. um mit Diol-, Cyano-, Aminogruppen, etc. modifiziertes Kieselgel. Die mobile Phase besteht aus organischen Lösungsmitteln mit geringer Polarität. Dabei

handelt es sich um Lösungsmittelgemische aus unpolaren Lösungsmitteln wie n-Hexan oder Heptan und im Vergleich dazu polarerer Lösungsmitteln wie Chloroform oder Alkohole, wobei die polaren Analyten auf der stationären Phase adsorbiert werden. Es gilt, je polarer der Analyt bzw. je unpolarer die mobile Phase, desto stärker die Retention.

Es wird angenommen, dass bei der NP-LC der Retentionsmechanismus auf Konkurrenzreaktionen um die Adsorptionsstellen an der stationären Phase zwischen den Analyten und den Lösungsmittelmolekülen basiert.

Ein Vorteil der NP-LC liegt darin, dass organische Lösungsmittel oft eine geringe Viskosität aufweisen und der Säulenwiderstand und somit der Druck dadurch geringer sind. Ein Nachteil der NP-LC ist jedoch, dass polare und/oder Moleküle mit einem hohen Molekulargewicht oft schwer in der unpolaren mobilen Phase zu lösen sind.

Für die Auftrennung mittels NP-LC eignen sich daher eher mäßig polare Analyten. Ein Problem bei sehr polaren Analyten liegt aber auch in der zu starken bis hin zur irreversiblen Retention [27].

4.1.5.2 Umkehrphasen-Flüssigchromatographie:

Auf Grund ihrer Vielseitigkeit ist die Umkehrphase die in der Praxis am häufigsten angewendete stationäre Phase. Es können damit sowohl große als auch kleine Moleküle mit geringer bis mäßiger Polarität chromatographisch aufgetrennt werden.

Bei der stationären Phase handelt es sich häufig um Kieselgel, welches mit unpolaren Gruppen, üblicherweise C_8 bzw. C_{18} – Alkylketten, chemisch modifiziert wurde.

Die Retention der Analyten beruht auf der Verteilung dieser zwischen der polaren mobilen Phase (dabei handelt es sich meist um ein Gemisch aus Wasser und damit mischbaren Lösungsmitteln) und der unpolaren stationären Phase. Als Faustregel kann gesagt werden, dass die Analyten nach fallender Polarität eluieren, d.h. Analyten mit größerer Polarität werden weniger stark an der stationären Phase zurückgehalten als Analyten mit geringerer Polarität. Es wird angenommen, dass an der stationären Phase Lösungsmittelmoleküle adsorbieren und diese so einen Flüssigkeitsfilm an der Oberfläche der stationären Phase erzeugen, wodurch eine Verteilung der Probenmoleküle zwischen stationärer und mobiler Phase ermöglicht wird.

Je nach Polarität der Lösungsmittelmoleküle sind zwei Konfigurationen der stationären Phase möglich:

1. Enthält die mobile Phase einen hohen Anteil an weniger polaren organischen Lösungsmitteln nehmen die an die stationäre Phase gebundenen Alkylketten viel Platz ein, die gelösten Analytmoleküle können in die Schicht der von der stationären Phase abstehenden Alkylketten eindringen und eluieren demnach später.

2. Ein Elutionsmittel mit einem hohen Wasseranteil bewirkt dagegen, dass die Alkylketten der stationären Phase näher zusammenrücken bzw. kollabieren. Dadurch wird die Kontaktfläche der funktionellen Gruppen der stationären Phase zu den Probenmolekülen kleiner, was zu einer geringeren Retention führt.

Die Retention in der RP-LC ist abhängig von der Oberflächenbedeckung und der Länge der Alkylketten, der Oberflächenspannung der mobilen Phase und der Größe der Moleküle des Analyten. Ein großer Nachteil der RP-LC liegt darin, dass die Retention für recht polare Analyten wie Zucker oder Aminosäuren sehr schwach ist. Für solche Analyten ist ein relativ hoher Wasseranteil in der mobilen Phase notwendig. Dieser kann aber dazu führen, dass die Alkylketten der stationären Phase kollabieren, was zu nicht-reproduzierbaren Chromatogrammen führt [27].

4.1.5.3 Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographie (HILIC)

Als Alternative zur NP-LC zur Auftrennung von sehr polaren Substanzen wurde der Begriff HILIC erstmals von Alpert 1990 erwähnt.

HILIC ist eine spezielle Variante der NP-LC. Es werden hier ebenfalls polare stationäre Phasen wie Diol-, Amino-, Amid- oder Zwitterionische Kieselgelphasen verwendet. Die mobile Phase besteht jedoch aus einem Gemisch organischer Lösungsmittel (typischerweise Acetonitril) und einem protischen Lösungsmittel wie z.B. Wasser, in welchem ein Salz (Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat) gelöst ist.

Durch den Wasseranteil in der mobilen Phase ist es möglich, sehr polare Substanzen zu lösen und durch den Anteil an organischen Lösungsmitteln kann die Chromatographie bei relativ hohen Flussraten mit niedrigen Gegendrücken in der Säule durchgeführt werden.

Die Wassermoleküle der mobilen Phase interagieren mit den polaren Kopfgruppen der stationären Phase so dass eine wasserreiche Schicht an der Oberfläche der stationären Phase entsteht. Dafür muss der Wasseranteil der mobilen Phase mind. 3% betragen.

Der Retentionsmechanismus beruht auf der Verteilung der polaren Analyten zwischen der mobilen Phase und dieser Hydratschicht. Die Retention und Auftrennung der gelösten Stoffe erfolgt anhand ihrer unterschiedlichen Polaritäten.

Weiters tragen Dipol-Dipol- und ionische Wechselwirkungen zur Retention bei.

Nach Alpert ist die Retention proportional der Polarität des Analyten und umgekehrt proportional der Polarität der mobilen Phase. Da bei der Hydrophilen Interaktionschromatographie Wasser das stärkste Elutionsmittel ist, führt ein erhöhter Wasseranteil in der mobilen Phase zu einer geringeren Retention.

Die stationären Phasen bei der Hydrophilen Interaktionschromatographie können je nach Art des ihnen zugrunde liegenden Materials eingeteilt werden: entweder Kieselgel oder Polymer.

Am häufigsten zum Einsatz kommen die auf Kieselgel basierenden stationären Phasen welche weiter unterteilt werden können in unmodifiziertes Kieselgel, chemisch modifiziertes Kieselgel und monolithisches Kieselgel.

Die chemisch modifizierten Kieselgelphasen können wiederum eingeteilt werden in geladene oder ungeladene stationäre Phasen.

Zu den ungeladenen stationären Phasen zählen Diol-, Cyclodextrin- und die Amidphasen während zu den geladenen stationären Phasen Amino-, Anionische, Kationische und Zwitterionische stationäre Phasen zählen [6, 27].

Unmodifiziertes Kieselgel:

Unmodifizierte Kieselgelpartikel zählen zu den klassischen NP – LC - Säulenpackungsmaterialien. Die hydrophilen Silanolgruppen auf der Oberfläche des Materials zeigen je nach Art unterschiedliche Acidität und Reaktivität. Die SiOH - Gruppen können Wasserstoffbrückenbindungen mit protischen Lösungsmitteln eingehen und es entsteht eine Schicht des Lösungsmittels an der Oberfläche der stationären Phase. Der Retentionsmechanismus ist sehr komplex wobei unterschiedliche Wechselwirkungen wie hydrophile Wechselwirkungen, Ionenaustausch und hydrophobe, pH - abhängige Wechselwirkungen zu diesem beitragen.

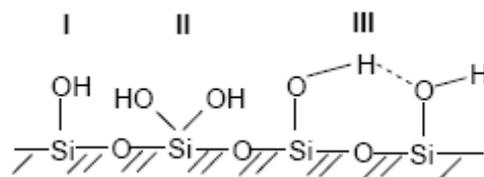


Abbildung 7: Unterschiedliche Arten von Silanol: I: freies Silanol, II: geminales Silanol, III: vicinales Silanol [27]

Es wird angenommen, dass die Silanolgruppen in wässriger Lösung bei pH = 4.0 vollständig protoniert sind und bei einem pH > 4 zu deprotonieren beginnen. Somit hängen die elektrostatischen Wechselwirkungen vom pH-Wert der mobilen Phase ab.

Ein großer Nachteil bei der Verwendung von unmodifiziertem Kieselgel als stationäre Phase liegt darin, dass Analyten irreversibel adsorbiert werden können. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Stabilität des Materials bei pH-Werten > 8 [27].

Diol - modifizierte stationäre Phasen:

Diolphasen beinhalten Hydroxylgruppen an der Oberfläche und zählen zu den ungeladenen stationären Phasen. Auf Grund ihrer Polarität und der Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu bilden, sind sie für die Auftrennung von sehr polaren Substanzen unter HILIC - Bedingungen gut geeignet.

Üblicherweise werden Diolphasen in der NP - LC mit unpolaren Lösungsmittelgemischen wie Hexan/2 - Propanol oder Hexan/Methanol als mobile Phasen eingesetzt. Wird der mobilen Phase Wasser zugesetzt kann die Effizienz der Säule um das drei- bis siebenfache gesteigert werden [27].

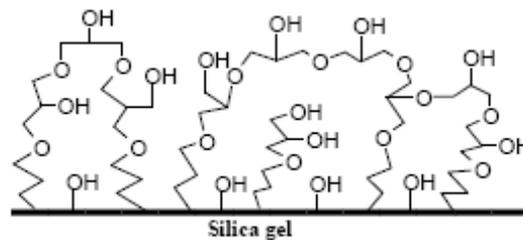


Abbildung 8: Chemische Struktur einer Diol - modifizierten stationären Phase [27]

PVA-SIL:

Bei dieser Art der stationären Phase ist das Kieselgel mit einer Schicht aus polymerisiertem Vinylalkohol modifiziert. Hierbei wird die gesamte Oberfläche des Kieselgels von dieser Schicht abgedeckt, so dass die mobile Phase und die Analyten ausschließlich mit den Hydroxylgruppen des Polyvinylalkohols interagieren. Außerdem schützt die Polymerschicht das Kieselgel vor Angriff durch extreme pH - Werte und aggressive Lösungsmittel. Anwendung findet dieses Säulenmaterial hauptsächlich bei der Auftrennung von Lipiden [YMC, 2010].

Stationäre Phasen mit Amidgruppen:

Bei der Amidmodifizierten Kieselgelphase wird das Kieselgel über einen kurzen aliphatischen Spacer mit einer Carbamoylgruppe verlinkt. Diese zählt zu den ungeladenen stationären Phasen.

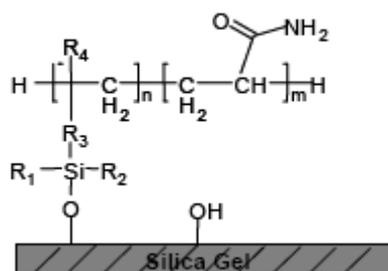


Abbildung 9: Chemische Struktur einer Amidmodifizierten stationären Kieselgelphase [27]

Amidphasen weisen im Vergleich zu Aminphasen eine geringere chemische Reaktivität auf und zum Retentionsmechanismus tragen theoretisch nur polare Wechselwirkungen bei. Ein Vorteil gegenüber der Aminphasen besteht darin, dass die Amidgruppen keine Schiff'schen Basen mit

Kohlehydraten bilden und diese somit nicht irreversibel auf der Säule adsorbiert werden. Außerdem ist die Amid - modifizierte Phase deutlich stabiler als die mit Aminogruppen modifizierte Kieselgelphase. Typische Anwendungen für Amid - modifiziertes Kieselgel ist die Auftrennung von Kohlehydraten, Monosacchariden, Oligosacchariden, Aminosäuren, Peptiden, etc. [27].

Aminophasen:

Die an die stationäre Phase gebundenen Aminogruppen sind sehr reaktiv und reagieren mit den Hydroxylgruppen von Zuckermolekülen zu Aminozuckern oder mit den Aldehyd- bzw. Ketogruppen von reduzierenden Zuckern zu Schiff'schen Basen, was zu einer irreversiblen Adsorption der Analyten führt. Ein weiterer Nachteil dieser stationären Phase ist, dass die Aminogruppen relativ leicht hydrolysieren und diese deshalb oft zum Säulenbluten neigt.

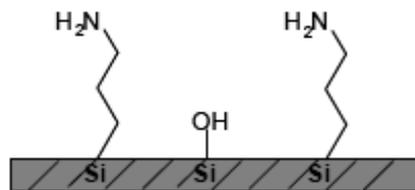


Abbildung 10: Chemische Struktur einer Amino - modifizierten stationären Phase [27]

Der pH - Wert der mobilen Phase hat einen signifikanten Einfluss auf den Retentionsmechanismus. Die Aminogruppen liegen im Falle einer neutralen oder sauren mobilen Phase positiv geladen vor weshalb ein Anionenaustausch - Mechanismus neben den hydrophilen Wechselwirkungen zur Retention beiträgt.

Aminosäulen werden hauptsächlich zur Auftrennung von polaren Molekülen wie Kohlenhydraten, Zuckern, Aminosäuren, Nucleosiden, etc. im HILIC - Modus eingesetzt [27].

Stationäre Phasen mit anionischen bzw. kationischen Gruppen:

Hierbei wird Kieselgel mit Anionen- bzw. Kationenaustauschenden Gruppen modifiziert. Demnach trägt der Ionenaustausch zum Retentionsmechanismus neben hydrophilen Interaktionen bei.

Anwendungen finden diese Art von stationären Phasen bei der Separation von Aminosäuren, Nucleosiden, Nucleotiden und Peptiden [27].

Stationäre Phasen mit zwitterionischen Gruppen (ZIC-HILIC):

Eine übliche zwitterionische Gruppe in der Chromatographie ist die Sulfoalkylbetain - Gruppe.

Diese enthält sowohl eine positive, als auch eine negative Ladung, weshalb zum Retentionsmechanismus elektrostatische Wechselwirkungen beitragen.

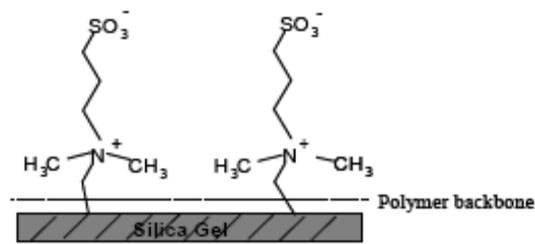


Abbildung 11: Die Struktur eines mit Sulfoalkylbetain - Gruppen modifizierten Kieselgels [27]

Diese Art der funktionellen Gruppe bindet sehr stark Wasser aus der mobilen Phase in Form von OH^- bzw. H_3O^+ , welche mit den Gegenionen der stationären Phase assoziieren. Das ist mitunter ein Grund, weshalb zwitterionische Gruppen gut für die Chromatographie unter HILIC - Bedingungen geeignet sind und für die Separation von Derivaten der Salicylsäure, Nucleosiden, Desoxynucleosiden und Aminosäuren eingesetzt werden [27].

4.1.6 Gaschromatographie:

Die Gaschromatographie schließt alle Varianten der Chromatographie ein, bei denen die mobile Phase ein Gas ist. Sie ist eine äußerst leistungsstarke Trennmethode, mit deren Hilfe die vielseitigsten Trennprobleme gelöst werden können. Durch die Möglichkeit der Kopplung mit zahlreichen selektiven Detektoren können außerdem wichtige Informationen über die gesuchten Analyten gewonnen werden.

Seit den ersten Beschreibungen eines gaschromatographischen Versuchs um 1950 und seit den grundlegenden theoretischen und gerätetechnischen Entwicklungen in den folgenden Jahren, ist die Gaschromatographie zu einer Standardanalysemethode geworden.

Wie bei anderen Techniken der Chromatographie erfolgt die Trennung dadurch, dass ein Stoffgemisch durch eine Säule transportiert wird und dabei in Wechselwirkung mit einer stationären Phase tritt. Die mobile Phase ist in diesem Fall ein inertes Gas wie z.B. He und dient ausschließlich dem Transport der Analyten vom Injektor durch die Säule bis zum Detektor, wobei im Normalfall keine Wechselwirkungen mit den zu analysierenden Verbindungen auftreten.

Da der Transport der Stoffe durch die Trennsäule in der Gasphase erfolgt, lassen sich im Prinzip alle Verbindungen, die in dem mit dem gaschromatographischen System zugänglichen Temperaturbereich einen ausreichenden Dampfdruck aufweisen, analysieren. Stoffe, die diese Bedingungen nicht erfüllen, können trotzdem auf verschiedene Arten der gaschromatographischen Trennung bzw. Analyse zugänglich gemacht werden. Sie können beispielsweise durch Derivatisierung in eine andere chemische Form, die eine ausreichende Flüchtigkeit besitzt, überführt werden.

Die Detektion der getrennten Substanzen kann je nach Problemstellung mit verschiedenen Messprinzipien erfolgen, wie beispielsweise Flammenionisationsdetektor (FID), Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD), Elektroneneinfangdetektor (ECD) oder mit einem massenselektiven Detektor (GC/MS-Kopplung).

Ein weiterer Faktor, der zu der weiten Verbreitung der Gaschromatographie geführt hat, ist die häufig je nach Detektor niedrige Nachweisgrenze, die heute auch im Routinebetrieb die Bestimmung von Nano- bzw. Picogramm - Mengen erlaubt. Weiters zeigen moderne GC - Kapillartrennsäulen ein sehr gutes Auflösungsvermögen, sodass ein Chromatogramm hunderte von aufgetrennten Peaks enthalten kann [22].

4.2 Massenspektrometrie:

4.2.1 Allgemeines:

Grundprinzip der Massenspektrometrie ist es, aus anorganischen und organischen Molekülen in geeigneter Weise Ionen zu erzeugen, diese Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis zu trennen und sie mit einem Registriersystem nach Masse und Häufigkeit qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die Ionisation der Moleküle kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen oder Photonen erfolgen. Die Ionentrennung erfolgt durch statische oder dynamische elektrische und magnetische Felder oder auch durch die Flugzeit.

Die Massenspektrometrie ist keine zerstörungsfreie Methode, vielmehr wird der Analyt bei der Messung verbraucht.

Die praktische Bedeutung der Massenspektrometrie liegt prinzipiell auf den folgenden Gebieten der Analytischen Chemie:

- Aufklärung der Struktur von organischen Molekülen einschließlich der Bestimmung ihrer molaren Masse.
- Qualitative und quantitative Analysen organischer und anorganischer Bestandteile in komplex zusammengesetzten Proben.
- Ermittlung von Isotopenverhältnissen von Elementen.
- Untersuchung der Struktur und der Zusammensetzung von Oberflächen.

Im Grunde besteht jedes Massenspektrometer aus einem Einlasssystem, einer Ionisationsquelle, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis auftrennt und einem Detektor, welcher die Ionen registriert [22].

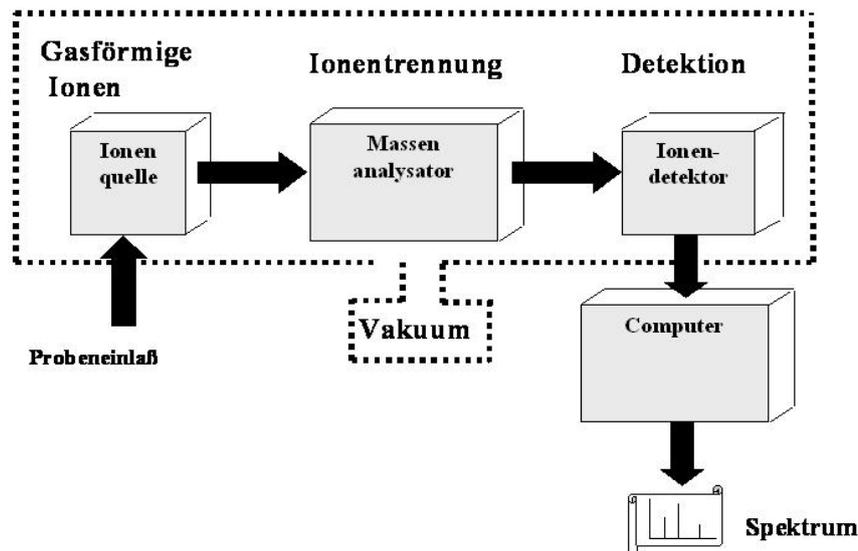


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [38]

4.2.2 Einlasssysteme:

Die gasförmige, flüssige oder feste Probe muss vom Atmosphärendruck ohne Unterbrechung der Vakuumbedingungen des Massenanalysators in das Vakuum bzw. Hochvakuum des Massenspektrometers eingebracht werden. Die Methode zur Überführung der Probe in die Ionenquelle richtet sich nach den Eigenschaften des Analyten (Siedepunkt, thermische Stabilität) und nach der anzuwendenden Ionisationsart. Ionenquelle und Einlass-System bilden dabei meist eine Einheit [22].

Man unterscheidet drei unterschiedliche Arten des Probeneinlasses:

- Indirekter Probeneinlass

Mit Hilfe eines zwischengeschalteten heizbaren Vorratsgefäßes wird der Eintrag von gasförmigen oder verdampfbaren Flüssigkeiten in die Ionenquelle erreicht.

- Direkter Probeneinlass

Hier werden feste Substanzen oder schwerflüchtige Flüssigkeiten mithilfe heizbarer Sonden, Spiralen, Mikrotiegeln über spezielle Schleusensysteme direkt in die Ionenquelle des MS eingebracht.

- Chromatographische Einlass-Systeme zur online Kopplung von GC und HPLC

In dieser Arbeit soll vor allem auf die HPLC-MS Kopplung näher eingegangen werden [22].

4.2.3 Ionenquellen und Ionisation:

Zur Auftrennung der einzelnen Massen der Probenmoleküle müssen diese zunächst in positiv oder negativ geladene bzw. Radikationen überführt werden, damit sie im elektrischen Feld beschleunigt werden können. Die Ionisation erfolgt mit Hilfe der kinetischen Energie von Elektronen, Ionen, Molekülen oder Photonen sowie thermischer oder elektrischer Energie. Das Fragmentierungsverhalten der Analyten ist dabei stark von der Ionisationsmethode abhängig, wobei die Ausbeute an Ionen maßgebend für die Sensitivität des Massenspektrometers ist.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen harten und weichen Ionisationsmethoden:

- **Harte Ionisation:**

Dadurch, dass eine relativ hohe Energie zugeführt wird, erfolgt zusätzlich zur Ionisation eine Fragmentierung der Moleküle. Man erhält komplexe Spektren mit unterschiedlichen Fragmentationen, wobei die Masse des ursprünglichen Moleküls oft nicht mehr vorhanden ist. Die Fragmentierungen sind abhängig von der Struktur der Moleküle und können deshalb direkt zur Strukturaufklärung herangezogen werden. Die Elektronenstoßionisation (EI) ist ein typischer Vertreter harter Ionisationstechniken.

- **Weiche Ionisation:**

Weiche Ionisationsmethoden werden in der Massenspektrometrie verwendet, wenn Informationen über die gesamte Molekülmasse erhalten werden sollen. Die Analyten werden dabei nicht bzw. nur geringfügig fragmentiert und es werden Molekül- oder Quasimolekülionen, wie $[M+H]^+$ detektiert. Typische Vertreter weicher Ionisationsmethoden sind MALDI (engl.: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), ESI (engl.: Electrospray Ionisation) oder die Chemische Ionisation (CI).

Die Ionenquellen können ebenso nach Art der Probenzufuhr unterteilt werden:

- **Gasphasen - Ionenequellen:**

Diese sind für jene Proben geeignet, die im Vakuum unzersetzt verdampfbar sind und vor der Ionisation in die Gasphase überführt werden. Die Einbringung der Probe erfolgt über ein direktes oder indirektes Einlasssystem oder mit Hilfe eines Gaschromatographen.

- **Desorptions - Ionenquellen:**

Die Probenzufuhr in die Ionenquelle erfolgt in kondensierter Phase über ein direktes Einlasssystem. Mit Hilfe spezieller Ionisationstechniken, wie z.B. Felddesorption (FD) werden direkt aus der kondensierten Phase gasförmige Ionen gebildet. Mit Hilfe dieser Techniken können auch nicht-

flüchtige und thermolabile Moleküle, z.B. Biomoleküle oder Polymere ionisiert und untersucht werden.

- **Spray - Ionenquellen:**

Flüssige oder gelöste Proben können mit Hilfe einer Kapillare in die Ionenquelle eingebracht und dann zu einem feinen Nebel versprüht werden. Aus den Nebeltröpfchen treten Ionen in die Gasphase über, die dann in das Vakuumsystem des Massenspektrometers überführt werden. Häufige eingesetzte Spray-Ionisationsquellen sind Elektrospray-Ionisation (ESI), Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) und Photoionisation unter Atmosphärendruck (APPI) welche in Verbindung mit der HPLC eingesetzt werden [22].

Im Folgenden soll auf einige ausgewählte Ionisationsmethoden näher eingegangen werden [22, 18]:

4.2.3.1 Elektronenstoßionisation:

Die Elektronenstoßionisation (engl.: Electron Impact Ionisation, EI) zählt zu den harten Ionisationsmethoden, da das Ausgangsmolekül durch den Beschuss mit energiereichen Elektronen fragmentiert wird.

Die Probe wird über ein Einlasssystem in den gasförmigen Zustand überführt und im Vakuum der Ionenquelle mit einem Strahl Elektronen beschossen. Es entstehen zunächst Radikal - Kationen und in geringerem Ausmaß Kationen. Die Energie der zur Ionisation verwendeten Elektronen beträgt in der Regel 70 eV.

Hauptreaktion:



Eine EI Quelle ist eine Gasphasen - Ionenquelle und somit können nur Proben untersucht werden, welche im Vakuum der Ionenquelle unzersetzt verdampfbar sind. In der Praxis wird diese Art der Ionisationstechnik daher hauptsächlich in Verbindung mit der Gaschromatographie verwendet.

4.2.3.2 Chemische Ionisation:

Bei der chemischen Ionisation (engl.: Chemical Ionisation, CI) wird zunächst ein Hilfsgas (Methan, Ammoniak) mit Hilfe eines Elektronenstrahls ionisiert, welches den gasförmigen Analyten in Prozessen wie Protonierung, Hydridabstraktion und Anlagerung ionisiert.

Hauptreaktion:



Die chemische Ionisation ist eine weiche Ionisationsmethode, d.h. die Probenmoleküle werden im Gegensatz zur Elektronenstoßionisation in geringerem Ausmaß fragmentiert.

Der intensivste Peak, der in einem solchen Spektrum zu sehen ist, entspricht oft einem Quasimolekülion, das durch Anlagerung von z.B. CH_5^+ oder NH_4^+ (je nach Hilfgas) entstanden ist und zusätzlich zum Molekülpeak im Spektrum vorliegt.

4.2.3.3 Elektrospray - Ionisation:

Die Beschreibung der Elektrospray - Ionisation soll etwas ausführlicher erfolgen, da diese Technik in den letzten Jahren sprunghaft an Bedeutung gewonnen hat und im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich angewendet wurde.

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ist ebenso wie die chemische Ionisation eine weiche Ionisationstechnik. Die Erzeugung der Ionen findet unter Atmosphärendruck statt, wobei ESI zu den bevorzugten Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen gehört, da es dabei kaum zu Fragmentierungen kommt.

Die Analytlösung wird durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld bewirkt, dass die Probenlösung aus der Kapillare in Form eines Kegels (Taylor - Cone) als feines Aerosol austritt, wobei ein inertes Trägergas, z.B. Stickstoff, häufig zur Vernebelung der Lösung benutzt wird und auch die Verdampfung des Lösungsmittels unterstützt. Verdampft das Lösungsmittel eines Tröpfchens, nimmt der Radius ab, das elektrische Feld auf der Oberfläche des Tropfens nimmt dagegen zu. Ist der Tropfen soweit geschrumpft, bis das sogenannte Rayleigh-Limit erreicht ist, zerfällt dieser wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen in kleinere Tröpfchen (Coulomb - Explosion).

Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Das Modell des geladenen Rückstandes (engl.: Charge Residue Model, CRM) geht davon aus, dass ein Tropfen so lange zerfällt, bis letztlich Tröpfchen von 1 nm Durchmesser übrig bleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Beim Ionenemissionsmodell (engl.: Ion Evaporation Model, IEM) wird angenommen, dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden.

Die Art der Spannung, die an der Kapillare angelegt wird, bestimmt die Ladung der Ionen, die erzeugt werden. Durch eine positive Spannung werden positiv geladene Ionen erzeugt und durch eine negative Spannung negativ geladene Ionen. Typischerweise werden bei der ESI Quasimolekülionen erzeugt: im positiven Modus $[\text{M}+\text{H}]^+$, im negativen Modus $[\text{M}-\text{H}]^-$, aber man findet auch Adduktionen, mit Bestandteilen aus dem Eluenten wie z.B. $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ oder $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$.

Des Weiteren werden bei dieser Ionisationsmethode häufig mehrfach geladene Molekülonen erzeugt (bis 100fach), die die Messung großer Moleküle, z.B. Proteine, ermöglicht.

Hauptreaktion:



$n = 1-100$

Üblicherweise arbeitet ESI bei Flussraten im Bereich von 1 - 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Weil die Elektrospray - Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet, die Massenanalyse jedoch ein Hochvakuum erfordert, muss ein entsprechender Übergang (engl.: Interface) geschaffen werden. Bei diesem handelt es sich um eine Platte mit einer kleinen Öffnung, das sogenannte Orifice. Wegen des geringen Durchmessers des Orifice (100 μm) kann dahinter ein Vakuum aufgebaut werden. Nachdem die Ionen das Orifice passiert haben, werden sie mit Hilfe der Ionenoptik, zu der Skimmer, Linsen, Octapole, u.Ä. zählen weiter fokussiert bevor sie in den Massenanalysator gelangen. Die ESI wird meist mit Quadrupol-, Ionenfallen- oder Flugzeit - Massenspektrometern (TOF) kombiniert.

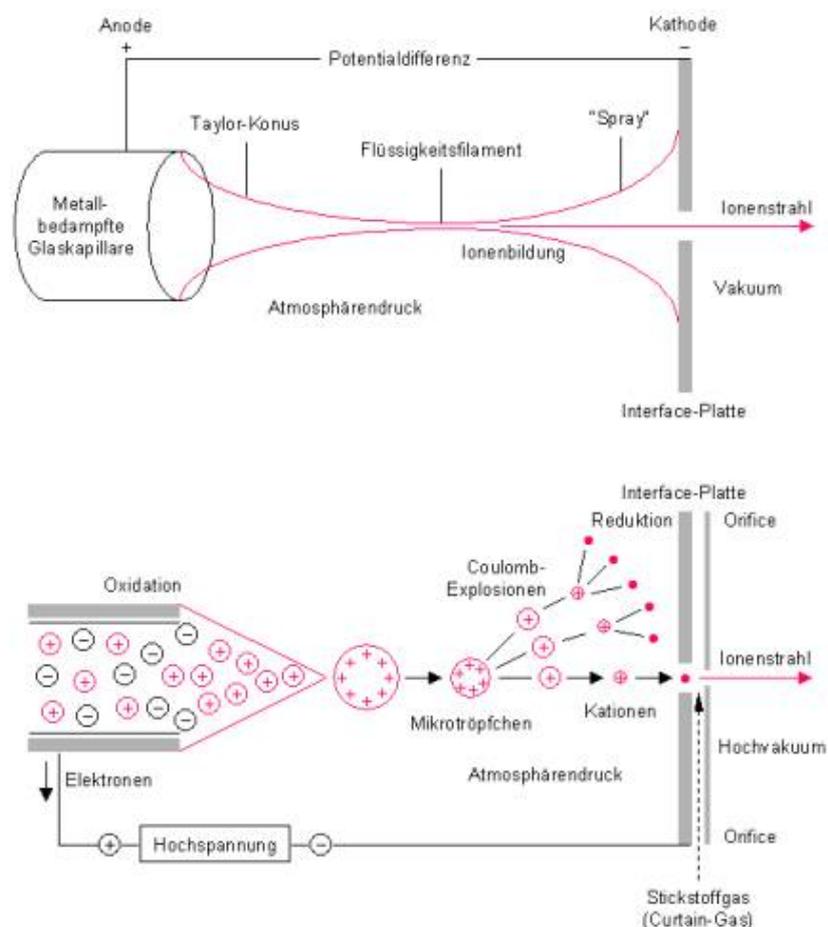


Abbildung 13: Elektrospray-Ionisation [42]

Ein weiterer Vorteil der ESI besteht in der Möglichkeit der Kopplung an ein HPLC - System. Die Kopplung ermöglicht die Analyse komplexer Proben, da durch die HPLC eine Auftrennung der Analyten erfolgt. Ein Nachteil dieser Ionisationsmethode ist, dass die Probe löslich sein muss.

4.2.3.4 Matrix unterstützte Laser – Desorptions - Ionisation:

Die Probenmoleküle werden in eine Matrix, aus kleinen Molekülen eingebettet und mittels Laser desorbiert. So wird eine schonende Ionisation von großen Analytmolekülen, wie z.B. Proteinen oder Biopolymeren erreicht. Als Matrixmoleküle geeignet sind solche, die bei einer bestimmten Wellenlänge des Lasers eine hohe Absorption zeigen.

Die zu untersuchenden Proben werden dabei mit einem hohen Überschuss der geeigneten Matrixsubstanz auf einem metallischen Probenhalter vermischt. Durch Verdunstung des Lösemittels bildet sich ein Kristallgitter der Matrix, in das die Probenmoleküle eingebaut sind. Durch das Einwirken einer hochenergetischen Laserstrahlung im ns-Bereich unter Hochvakuumbedingungen werden neben den Matrixmolekülen auch die Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Als Massenanalysator kommt meist ein Flugzeitmassenspektrometer (engl.: Time of Flight, TOF) zum Einsatz.

4.2.4 Massenanalysatoren:

Der Massenanalysator ist das eigentliche Trennsystem eines Massenspektrometers. Hierbei werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt.

Ziel ist es einerseits eine möglichst minimale Massendifferenz unterscheiden zu können, sprich eine hohe Massenauflösung zu erhalten, und andererseits einen hohen Durchlass an Ionen zu garantieren, um einen gut auswertbaren Ionenstrom zu erhalten.

Die Trennung der Ionen beruht auf verschiedenen physikalischen Prinzipien und kann beispielsweise erfolgen durch:

- Ablenkung der Ionen in elektrischen oder magnetischen Feldern
- im Hochfrequenzfeld eines Quadrupolstabsystems
- ihre Flugzeit
- Einfang von Ionen in einer magnetischen oder elektrischen Ionenfalle

Für spezielle Messungen kann man auch mehrere Analysatoren hintereinanderschalten. Man erhält damit beispielsweise hochauflösende Sektorfeldgeräte, mit denen man die Masse ausgewählter Ionen mit hoher Genauigkeit bestimmen kann oder Tandem - Massenspektrometer (MS/MS), bei der die Strukturaufklärung eine wesentliche Rolle spielt.

Folgend werden die in der Praxis am häufigsten eingesetzten Massenanalysatoren, die vor allem bei der Kopplung mit der GC bzw. HPLC Verwendung finden, beschrieben [22].

4.2.4.1 Quadrupolmassenfilter:

Wie der Name schon sagt, funktioniert der Quadrupolmassenanalysator als Massenfilter. Dabei gelangen Ionen mit bestimmten m/z - Verhältnissen auf stabilen Bahnen durch die vier kozentrischen, parallel zueinander angeordneten Stabelektroden, während alle anderen Ionen mit den Elektroden kollidieren und entladen werden. Das wird durch geeignete Abstimmung der angelegten Gleich- und Wechselspannung ermöglicht. Bei einem Quadrupol wird meist eine Einheitsmassenauflösung erreicht, d.h. man kann nur zwischen ganzzahligen Massen unterscheiden.

Es werden prinzipiell zwei Arten der Massenanalyse beim Quadrupolmassenfilter unterschieden. Der „Full Scan“ zum Abtasten größerer Massenbereiche und „Selected Ion Monitoring“ (SIM) zum Aufnehmen einzelner m/z -Spuren. Der SIM-Modus liefert dabei eine mindestens um den Faktor 10 höhere Empfindlichkeit.

Tabelle 4: Vor- und Nachteile eines Quadrupol-Massenfilters

Vorteile	Nachteile
hohe Empfindlichkeit Wartungsfreundlich für Routinebetrieb geeignet Preisgünstig	mäßige Auflösung und Massengenauigkeit Massenbereich: m/z 1000 – 4000

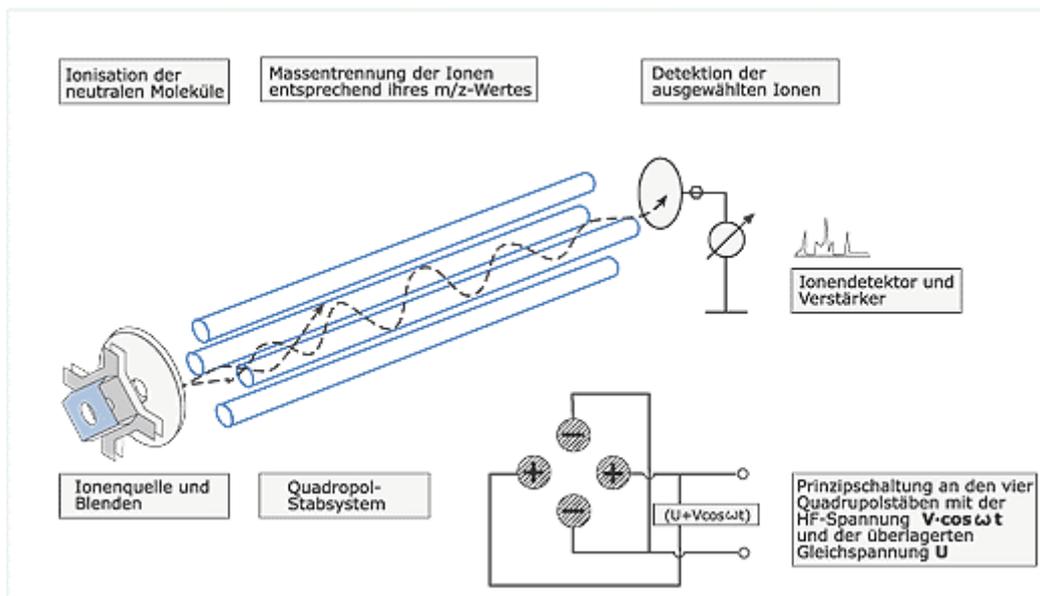


Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Massenfilters [40]

Auf Grund der Vorteile ist der Quadrupol der am häufigsten eingesetzte Massenanalysator.

Die Reihenschaltung dreier Quadrupole (engl.: Triple Quadrupole) ist eine weitere Möglichkeit Massenspektrometrie zu betreiben, welche bei der Kopplung mit HPLC – Systemen eingesetzt wird [22].

4.2.4.2 Triple Quadrupol:

Sofern die in einer Ionenquelle erzeugten Ionen nicht direkt detektiert werden, sondern einzelne oder verschiedene dieser Ionen erneut durch z.B. Kollision in Produktionen zerfallen (engl.: Collision Induced Dissociation, CID), so spricht man von MS/MS (MS^2) oder Tandem - Massenspektrometrie. Wird dieser Zyklus erneut durchlaufen, so bezeichnet man ihn als MS/MS/MS bzw. MS^3 usw. In einem Triple – Quadrupol - Massenspektrometer dient der erste Quadrupol zur Massenanalyse der Ionen, der zweite als Kollisionskammer und der dritte zum Scannen der Ionen. Diese Anordnung erlaubt neben einfacher Massenspektrometrie eine gezielte Fragmentierung in der Kollisionszelle und die Massenanalyse der Fragmente. Die Fragmentierung in der Kollisionszelle erfolgt durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung und dadurch ausgelöste Zusammenstöße der Ionen mit den Gasteilchen (Inertgasen wie N_2 , He oder Ar).

Es sind unterschiedliche Arten von MS/MS-Experimenten möglich:

1. Produktionen - Analyse (Product Ion Scan)
2. Vorläuferionen - Analyse (Precursor Ion Scan)
3. Neutralverlust - Analyse (Neutral-Loss-Scan)
4. SRM bzw. MRM Analyse (Selected Reacton Monitoring bzw. Multiple Reaction Monitoring)

ad 1.) Hier wird im ersten Quadrupol ein Ion mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis isoliert, im zweiten Quadrupol findet die Fragmentierung durch CID statt und im dritten Quadrupol werden die Massen der Fragmente analysiert.

ad 2.) Diese Methode arbeitet umgekehrt: der dritte Quadrupol wird auf eine bestimmte Masse fixiert und der erste Quadrupol liefert ein Spektrum aller Massen, die ein derartiges Fragment ergeben. Damit ist es möglich, verschiedene Substanzen zu erfassen, die ein charakteristisches Strukturelement enthalten.

ad 3.) Der dritte Quadrupol scannt synchron mit dem ersten, allerdings um eine bestimmte Massendifferenz zurückversetzt. So lassen sich alle jene Ionen nachweisen, die einen bestimmten neutralen Massenverlust bei der Fragmentierung zeigen.

ad 4.) Im ersten Quadrupol wird ein Ausgangsmolekül mit einem definierten Masse/Ladungsverhältnis selektiert, dieses wird in der Kollisionszelle fragmentiert und der dritte Quadrupol wird auf das m/z - Verhältnis eines möglichst spezifischen Fragmentes dieses Ausgangsmoleküls eingestellt. Die MRM - Analyse kann simultan für mehrere Vorläuferionen durchgeführt werden und eignet sich im

Besonderen zur selektiven und empfindlichen quantitativen Bestimmung von unterschiedlichen Verbindungen.

Wegen der erhöhten Selektivität und Sensitivität haben Triple – Quadrupol - Massenspektrometer insbesondere in der LC/MS und hierbei vor allem dann, wenn eine spezifische Routinequantifizierung gefragt ist, trotz ihres im Vergleich zum Single - Quadrupol oder Flugzeit - MS höheren Preises eine weite Verbreitung gefunden [22, 18].

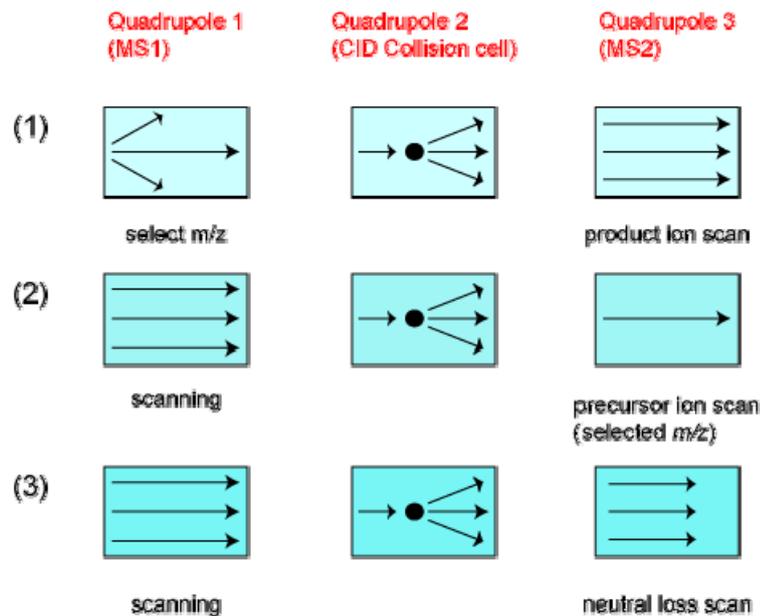


Abbildung 15: Schema der MS/MS-Experimente [34]

4.2.4.3 Fourier – Transformations – Ionenzyklotronresonanz - Massenspektrometrie (FT-ICR-MS):

Das Kernstück eines FT - MS ist die ICR - Falle. Ihre Funktionsweise basiert auf dem Effekt, dass geladene Teilchen in einem statischen Magnetfeld auf eine Zyklotron-Kreisbahn (engl.: Ion Cyclotron Resonance, ICR) gezwungen werden. Dabei besitzen alle Ionen mit dem gleichen Masse/Ladungsverhältnis die gleiche ICR - Frequenz, unabhängig von ihrer Geschwindigkeit.

Entlang der Magnetfeldrichtung verhindern statische elektrische Felder ein Entweichen der Ionen. Damit gelingt es Ionen für Minuten oder sogar Stunden zu speichern und auf dieser Zeitskala zu untersuchen.

Zur Aufnahme der Massenspektren wird zwischen zwei Seitenplatten der Zelle (engl. Excitation Plates) ein elektrisches Wechselfeld angelegt. Stimmt die Frequenz dieses Feldes mit der einer bestimmten Ionensorte überein kommt es zur Resonanz, d.h. diese Ionen werden beschleunigt und kreisen auf immer größeren

Bahnen. Ionen mit anderen m/z - Verhältnissen besitzen eine andere Zyklotronfrequenz, wodurch diese nicht angeregt werden.

Detektiert werden die Ionen in der ICR - Zelle durch Messung des sogenannten „image current“, welcher durch Bewegung der Ionenpakete in der Zelle entsteht. Die Frequenz des image current ist identisch mit der Zyklotronfrequenz, die Amplitude ist proportional zur Anzahl der Ionen in der ICR - Zelle.

Nach Fouriertransformation des ICR - Signals in der Zeitdomäne erhält man ein Frequenzspektrum, das gleichzeitig das Massenspektrum ist, da die Zyklotron - Frequenz für eine gegebene Magnetfeldstärke nur mehr von dem Masse - Ladungsverhältnis abhängt [32].

Tabelle 5: Vor- und Nachteile eines FT-ICR-MS

Vorteile	Nachteile
sehr hohe Auflösung (bis 10^8) zerstörungsfreie Messung	hohe Vakuumanforderung (ca. 10^{-9} mbar) teuer in Anschaffung und Unterhalt

4.2.4.4 Flugzeit - Massenspektrometer:

Ein Flugzeitmassenspektrometer (engl.: Time of Flight, TOF) hat ein gänzlich anderes Messprinzip als die bisher beschriebenen Massenanalysatoren. Es wird eine bestimmte Beschleunigungsspannung angelegt, die den Ionen eine gleich große kinetische Energie verleiht und es wird die exakte Zeit gemessen, die die jeweiligen Ionen benötigen, um eine bestimmte Driftstrecke durch das Flugrohr zurückzulegen, da bei gleicher kinetischer Energie die Geschwindigkeit der Ionen von ihrer Masse abhängt. Unschärfefeffekte beim Start der Ionen können durch Reflektoren ausgeglichen werden.

TOF - Analysatoren werden meist mit MALDI - Ionenquellen kombiniert, jedoch ist auch ein ESI - TOF auf dem Markt [18].

4.2.5 Detektoren:

Nachdem die in der Ionenquelle gebildeten Ionen im Massenanalysator entsprechend ihres Masse/Ladungs - Verhältnisses getrennt wurden, werden diese von einem Detektor registriert. Dabei wird die Intensität des jeweiligen Ionenstromes ermittelt. Der Detektor erzeugt prinzipiell ein elektrisches Signal, das nach Digitalisierung zur Auswertung weitergegeben wird.

Die Aufnahme des Massenspektrums kann orts- oder zeitabhängig erfolgen. Die am häufigsten eingesetzten Massenspektrometer registrieren den Ionenstrom zeitabhängig. Die Trennung der Ionen muss dabei so gestaltet werden, dass Ionen mit verschiedenem m/z - Verhältnis nacheinander einen bestimmten Ort erreichen.

Wichtige Kenngrößen eines Detektors sind unter anderem die Empfindlichkeit sowie der Detektionsbereich und die Ansprechzeit. Nicht jeder dieser Parameter erreicht für einen bestimmten

Detektor optimale Werte, weshalb sich die Auswahl des Detektors nach den Anforderungen des jeweiligen analytischen Problems richten muss.

Da der Sekundärionenvervielfacher (SEV) einer der am häufigsten eingesetzten Detektoren in der Massenspektrometrie ist, soll in dieser Arbeit ausschließlich näher auf diesen eingegangen werden.

Dieser besteht aus einer Vielzahl von Dynoden mit einer separat davor, auf hohem Potential liegenden Konversionsdynode. Durch die auftreffenden Ionen werden Elektronen aus der Konversionsdynode (Kathode) geschlagen, die durch eine Saugspannung zur Anode geleitet werden. Durch Aufprall auf die dazwischen liegenden, mit immer höheren Spannungen geladenen Dynoden werden nach und nach kaskadenartig Elektronen (Sekundärionen) aus diesen herausgeschlagen, was die Empfindlichkeit der Detektion wesentlich verbessert. Die Gesamtzahl der durch den Analysator tretenden Ionen wird durch den Totalionenstrom (engl.: Total Ion Current, TIC) ausgedrückt. Bei Aufzeichnung des TIC kann in der Kopplung mit chromatographischen Trenntechniken zu jeder Stelle im Chromatogramm ein Massenspektrum abgerufen werden. Werden nur einzelne Ionen in einem Chromatogramm dargestellt wird dies als extracted ion chromatogramm bzw. Massenspur bezeichnet. Durch Aufzeichnung einzelner Massen, dem Selected Ion Monitoring (SIM - mode) kann in der Massenspektrometrie die Empfindlichkeit um 2 - 3 Zehnerpotenzen bis in den unteren ppb - Bereich gesteigert werden [22, 23].

4.3 Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie:

Seit der Erfindung der Massenspektrometrie im Jahre 1910 durch Thomson fanden die massenspektrometrischen Techniken immer weitere Verbreitung. Insbesondere die Kopplung mit chromatographischen Systemen entwickelte sich zu einem analytischen Instrumentarium von außerordentlicher Bedeutung.

Im Gegensatz zur GC/MS hatte die LC/MS - Kopplung mit ungleich schwierigeren Problemen zu kämpfen.

Das für die Messung notwendige Hochvakuum konnte in der LC/MS - Kopplung bei Flussraten von 1 mL/min von den Vakuumpumpen der Massenspektrometer nicht aufrecht erhalten werden, da beim Übergang von der flüssigen Phase in die Gasphase ein um mehrere Zehnerpotenzen höheres Volumen entsteht. Hinzu kam, dass bei der LC/MS vorwiegend Moleküle untersucht werden, die thermolabil oder auf Grund ihrer Größe nicht unzersetzt verdampfbar sind und somit der Ionisierung mit Standardtechniken nicht zugänglich waren.

Die Entwicklung von unterschiedlichen HPLC/MS - Kopplungstechniken wie Moving belt oder Thermospray am Anfang der achtziger Jahre führte neben dem Particle Beam-Interface zu den heute weit verbreiteten Atmospheric – Pressure - Ionisation (API) - Techniken zu welchen das ESI-, APCI- oder das APPI - Interface zählen.

Die Entwicklung der Atmospheric – Pressure - Ionisation hob die Beschränkungen in Bezug auf die Flüchtigkeit und thermische Stabilität der Substanzen weitgehend auf und konnte die MS-Kopplung

einer breiteren Anwendung zugänglich machen. In der Naturstoffanalytik ist die LC/MS eine fast universell verwendbare Technik, mit der es durch die gute Empfindlichkeit und Selektivität der Massenspektrometrie möglich ist, auch aus komplexen Mischungen das Molekulargewicht und strukturelle Informationen der Substanzen zu erhalten [17].

4.4 Verwendetes HPLC - MS/MS - System:

Für die Methodenentwicklung wird ein Agilent 1100 HPLC-System (Abb. 16), bestehend aus Vakuumentgaser, binärer Pumpe und automatischem Probengeber verwendet.

Als Massenspektrometer wird ein 4000 Q TrapTM MS/MS-System (Triple - Quadrupol, Abb. 16) mit linearer Ionenfalle und einer Turbo V Source Housing - Quelle von Applied Biosystems eingesetzt. Die Geräte sind online miteinander gekoppelt und als Steuersoftware findet Analyst[®] 1.4.2 von Applied Biosystems Anwendung.



Abbildung 16: Agilent 1100 Series HPLC - System (links) und AB 4000 Q TrapTM (rechts) [41, 42]

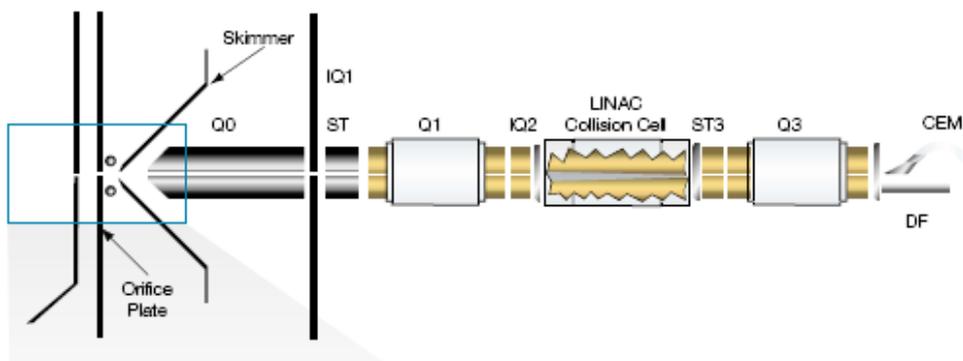


Abbildung 17: Schema einer AB 4000 Q TrapTM [43]

4.5 Verwendetes HPLC – FT – MS - System:

Zur Bestimmung der exakten Masse der oxidierten Phospholipide wird ein Thermo Accela LC - System mit quartanärer Pumpe über ein ESI – Interface mit einem Thermo Scientific* 7.0 Tesla LTQ - FT Ultra Massenspektrometer (Abbildung 18) kombiniert. Als Steuersoftware kommt Xcalibur 2.0.7 zum Einsatz.



Abbildung 18: Thermo Scientific* LTQ FT Ultra MS mit Thermo Accela HPLC - System [35]

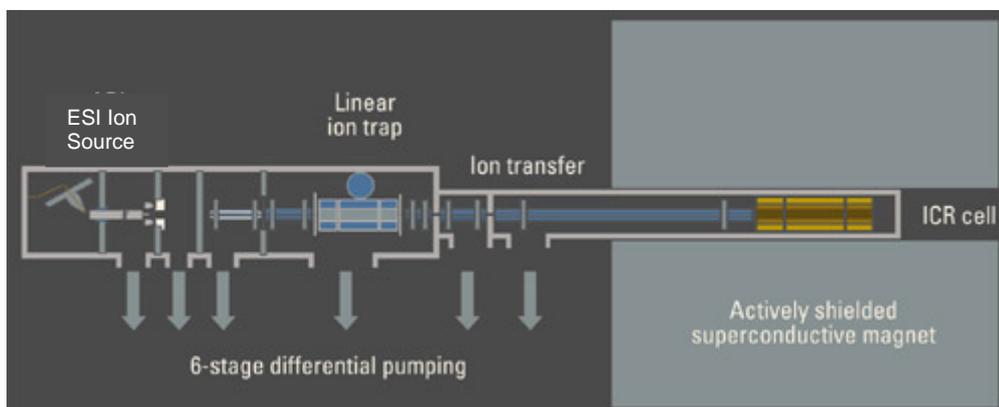


Abbildung 19: Schema eines Thermo Scientific* LTQ FT Ultra MS [35]

5. Experimenteller Teil

5.1 Oxidation des Phospholipidstandards:

Zunächst wird ein Phosphatidylcholinstandard (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-glycerophosphatidylcholin, PAPC) oxidiert. Dieses Phospholipid wurde gewählt, da die Oxidationsprodukte der Arachidonsäure schon relativ gut untersucht und in der Literatur beschrieben sind und wichtige in vitro Marker für oxidativen Stress darstellen (siehe Kapitel 2.4).

Die Oxidation dieses Phospholipids wird auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt:

1. *Methode:*

Es werden 1 mL der PAPC - Standard Lösung (3,3 mg/mL) mit 1 mL einer 5 μ M CuSO₄ - Lösung in PBS - Puffer versetzt, 5 min. gevortext und 30 min. im Ultraschallbad in einer Eis/Wasser - Mischung behandelt bevor die Reaktionslösung bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler für 113 Stunden inkubiert wird. Die Oxidation wird durch Zugabe von 2 mL einer CHCl₃/MeOH - Lösung (2:1) abgebrochen und bei 3000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgetrennt, zwei mal mit je 1 mL der CHCl₃/MeOH - Lösung (2:1) extrahiert und die organische Phase wird zwei mal mit je 1 mL H₂O bidest. gewaschen. Die organischen Phasen werden gesammelt, bis zur Trockene eingengt und der Rückstand wird in 1 mL CHCl₃/MeOH 1:1 aufgenommen und bis zur Chromatographie bei -20°C gelagert [28].

2. *Methode:*

Es werden 1 mL der PAPC - Standard Lösung (3,3 mg/mL) bis zur Trockene eingengt, mit 1 mL einer 5 μ M CuSO₄ - Lösung in PBS - Puffer versetzt, 5 min. gevortext und 30 min. im Ultraschallbad bei 0°C (Eis/Wasser - Mischung) behandelt. Es entsteht eine milchig - trübe Lösung, die bei Raumtemperatur am Überkopfschüttler für 113 Stunden inkubiert wird.

Die Oxidation wird durch Zugabe von 2 mL einer CHCl₃/MeOH - Lösung (2:1) abgebrochen und diese wird bei 3000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgetrennt, zwei mal mit je 1 mL der CHCl₃/MeOH - Lösung (2:1) extrahiert und die organische Phase wird zwei mal mit je 2 mL H₂O bidest. gewaschen. Die organischen Phasen werden gesammelt, eingengt und der Rückstand wird in 1 mL CHCl₃/MeOH 1:1 aufgenommen und bis zur Chromatographie bei -20°C gelagert [28].

3. *Methode:*

Die Oxidation des Phospholipids erfolgt durch Autoxidation. Dazu werden 30,3 μ L der PAPC-Standardlösung (3,3 mg/mL) bis zur Trockene eingengt und der Rückstand bei Raumtemperatur

unter Luftsauerstoff für 96 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird der Rückstand in 1 mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 aufgenommen und bei -20°C gelagert [25].

5.1.1 Ergebnisse und Diskussion:

Die Analyse der Produkte der einzelnen Oxidationsmethoden erfolgt mittels HPLC-MS durch isokratische Elution: Laufmittel A: Cyclohexan (10%)

Laufmittel B: 2-Propanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}/\text{NH}_3$ (86:13:1:0,12) (90%).

Die Detektion erfolgt durch eine Vorläuferionenanalyse (Prec. 184), da $m/z = 184$ ein charakteristisches Fragment bei der CID von Phosphatidylcholin darstellt. Bei diesem Fragment handelt es sich um die Cholinphosphat - Kopfgruppe des Phospholipides (siehe Tab. 1).

Bei der Probe der ersten Oxidationsmethode kann nur die Masse des PAPC detektiert werden. Die Oxidation mit dieser Methode hat demnach nicht funktioniert. Da das PAPC in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gelöst vorliegt, und dieses vor Beginn der Oxidation nicht verdampft wurde, stand womöglich nicht genügend Sauerstoff für die Lipidperoxidation zur Verfügung.

Bei den beiden anderen Oxidationsmethoden dagegen können eine Reihe von Oxidationsprodukten detektiert werden. In den Chromatogrammen (Abbildung 20 und 22) sind je zwei Peaks zu sehen, wonach die Oxidationsprodukte zunächst grob in zwei große Gruppen eingeteilt werden können: Zum einen in jene Produkte, die auf Grund von Sauerstoffaddition an die Arachidonsäure eine größere Masse als das Ausgangsphospholipid, zum anderen in Produkte, die durch Zersetzungsreaktionen der Arachidonsäure eine niedrigere Masse als das ursprüngliche Phospholipid aufweisen.

Die Retentionszeit der oxidierten Lipide mit den größeren Massen als PAPC ist kürzer im Vergleich zu den Oxidationsprodukten mit den niedrigeren Massen. Diese werden länger auf der Säule zurückgehalten, da sie polarer sind.

Beim Vergleich der Massenspektren (Abbildung 21 und 23) ist ersichtlich, dass sich bei beiden Oxidationsreaktionen Produkte mit denselben Massen gebildet haben und diese auch ähnliche Intensitäten aufweisen. Die Intensitätsunterschiede des PAPC - Peaks in den beiden Massenspektren lassen sich dadurch erklären, dass die Analytkonzentration für die Oxidationsmethode 2 mit $3,3 \mu\text{g}/\text{mL}$ höher ist als bei der Autoxidation mit $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. Es ist anzumerken, dass die Massen der protonierten Analyten in den Massenspektren einen Massenshift von etwa 1 amu zeigen.

Da die Autoxidationsreaktion am einfachsten und mit dem geringsten Aufwand durchführbar ist, wird des Weiteren diese Methode zur Oxidation von PAPC eingesetzt.

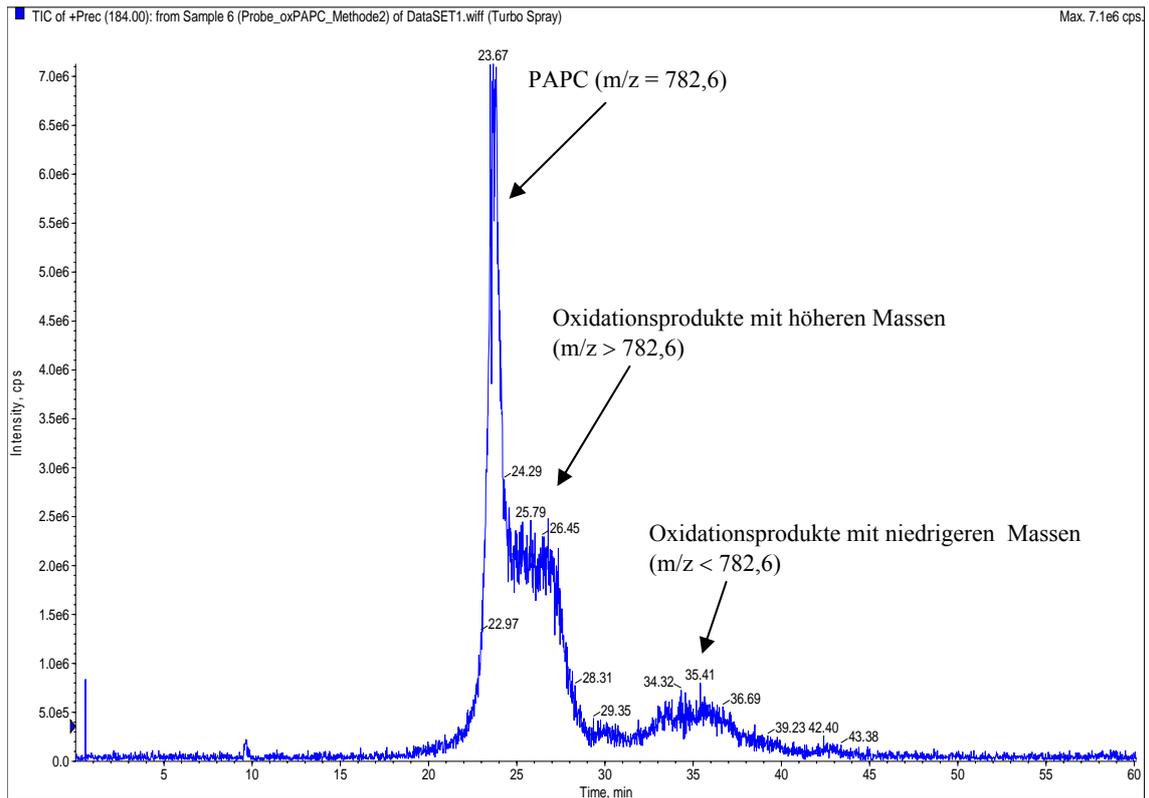


Abbildung 20: Chromatogramm der Oxidationsprodukte von PAPC nach Methode 2 ($c = 3,3 \mu\text{g/mL}$)

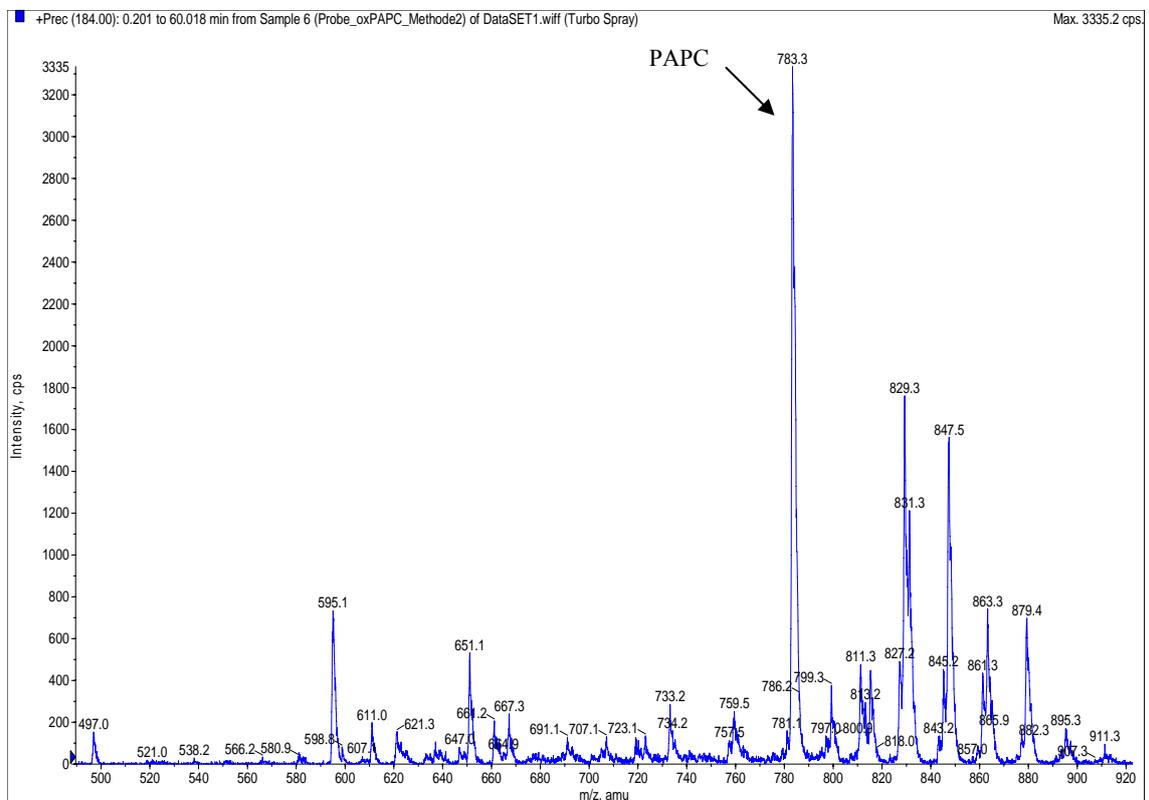


Abbildung 21: Gemittelttes Massenspektrum der Oxidationsprodukte von PAPC nach Methode 2 ($c = 3,3 \mu\text{g/mL}$)

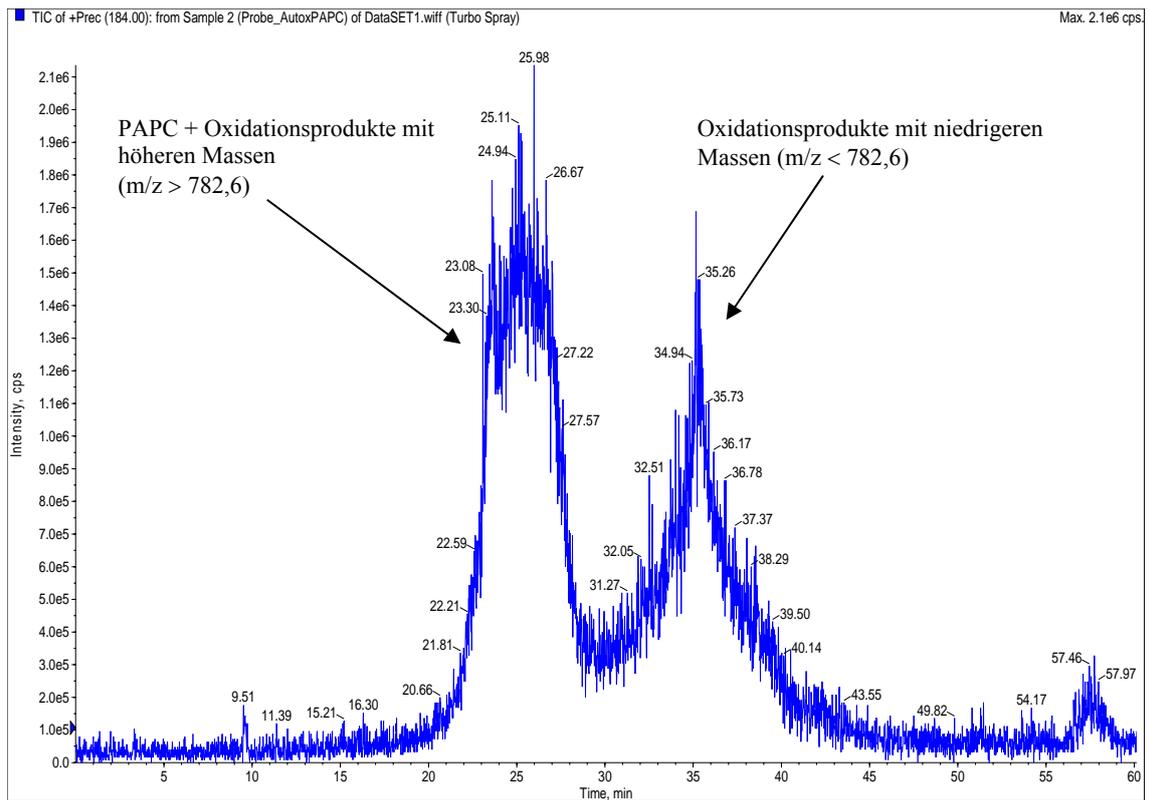


Abbildung 22: Chromatogramm der Oxidationsprodukte von PAPC nach Autoxidation ($c = 1 \mu\text{g/mL}$)

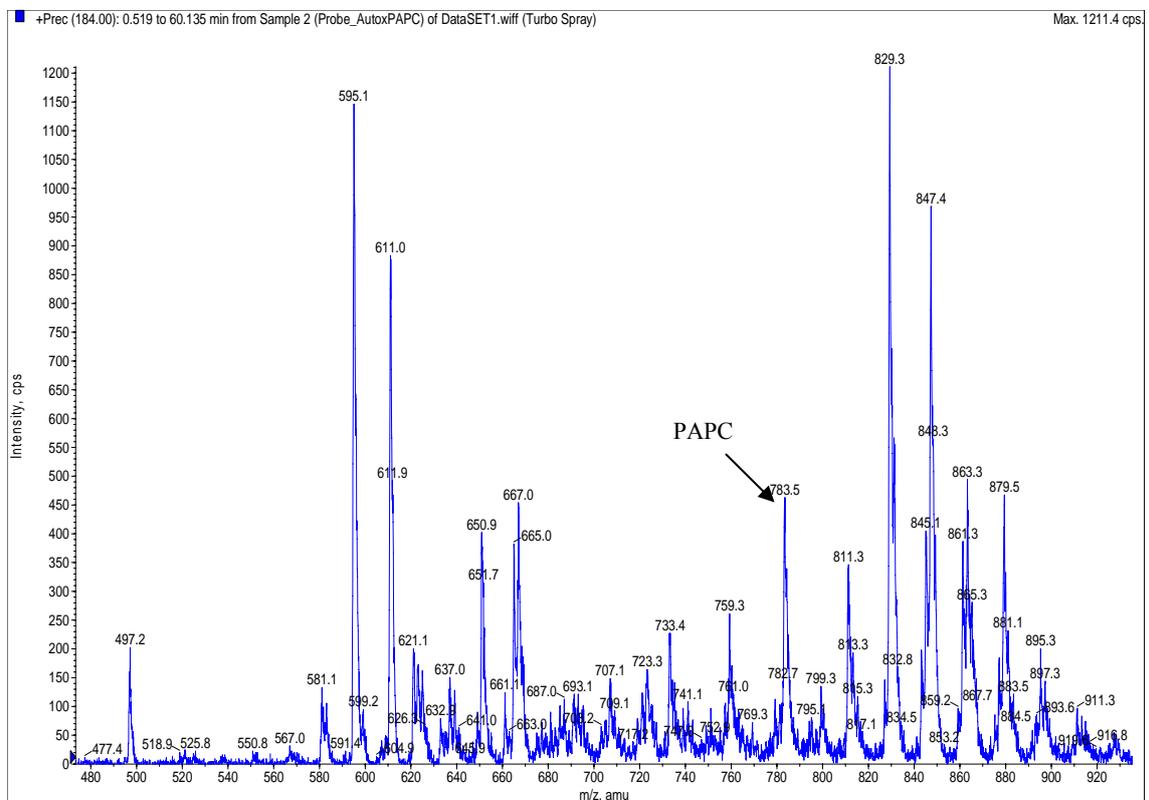


Abbildung 23: Gemittelttes Massenspektrum der Oxidationsprodukte von PAPC nach Autoxidation ($c = 1 \mu\text{g/mL}$)

5.2 Entwicklung einer HPLC - Methode zur Abtrennung der Oxidationsprodukte:

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, für die Abtrennung der Oxidationsprodukte von PAPC von unoxidierten Phosphatidylcholinen, anderen Phospholipiden aber auch Triglyceriden eine geeignete chromatographische Methode zu entwickeln.

Die Detektion erfolgt mittels Massenspektrometrie. Zum Einsatz kommt ein Agilent 1100 Series HPLC System, welches online mit einer 4000 Q Trap über ein Electrospray Ionisation Interface (ESI) gekoppelt ist und in Kapitel 4.4 näher beschrieben ist.

Die Detektion der Analyten erfolgt im positiven Modus, da hier die Ionisation der eingesetzten Probenkomponenten effizienter ist.

Es wird zunächst ein Mix aus unterschiedlichen Lipid - Standardsubstanzen hergestellt (Tabelle 6). Die Konzentration der einzelnen Substanzen in der Lösung beträgt 15 μM .

Tabelle 6: Eingesetzte Lipid - Standardsubstanzen (zur Beschreibung der Lipide siehe Abschnitt 2.7)

Phosphatidylcholin (PC)	24:0, 28:0, 32:0, 36:0, 40:0, 44:0, 36:4
Phosphaditylethanolamin (PE)	24:0, 34:1, 38:4
Phosphatidylserin (PS)	24:0, 34:1
Lyso - Phosphatidylcholin (LPC)	18:0, 20:0
Sphingomyelin (SM)	
Triglycerid (TAG)	48:0, 51:0, 54:0, 54:1, 54:2, 54:3
Diglycerid (DAG)	24:0, 32:0, 36:0

Es werden 200 μL dieses Lipid - Mixes zu 300 μL der Lösung mit dem oxidierten PAPC (Abschnitt 5.1) pipettiert und dieses auf 1 mL mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 aufgefüllt, so dass die Endkonzentration der einzelnen Analyten 3 μM beträgt.

Die Auftrennung der Analyten erfolgt zum Vergleich an vier unterschiedlichen stationären Phasen:

- Nucleosil 100 - 5 μm OH, 250 x 3,0 mm i.d.
- Betasil Silica 100 – 5 μm , 150 x 1,0 mm i.d.
- YMC - Pack Amino, 150 x 3,0 mm i.d., 12 nm, S-3 μm
- YMC - Pack PVA-SIL, 250 x 3,0 mm i.d., 12 nm, S-5 μm

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die für die HPLC - Methodenentwicklung von oxidierten Phospholipiden eingesetzten Laufmittel. Alle diese Laufmittel werden an den vier unterschiedlichen stationären Phasen zur Elution der Probenkomponenten eingesetzt. Die Elution erfolgt sowohl isokratisch als auch mittels Gradienten bei unterschiedlichen Verhältnissen der Laufmittel A und B zueinander. Im Abschnitt 5.2.1 sind die besten Ergebnisse jeder stationären Phase mit den unterschiedlichen mobilen Phasen zusammengefasst.

Tabelle 7: Zur Methodenentwicklung eingesetzte Laufmittel

	Laufmittel	Zusammensetzung
1.	A: Acetonitril B: H ₂ O/HCOOH/NH ₄ COOH [16]	99:1 (=5 mM)
2.	A: Acetonitril/Methanol/H ₂ O/HCOOH [25]	77:15:8:0,1
3.	A: Methanol B: H ₂ O/HCOOH/NH ₄ COOH	99:1 (=10 mM)
4.	A: Cyclohexan B: 2-Propanol/H ₂ O/HCOOH/NH ₃	86:13:1:0,12
5.	A: Cyclohexan B: 2-Propanol/H ₂ O/HCOOH/NH ₄ COOH	86:13:0,1:1 (=10 mM)
6.	A: Methyl-tert-Butylether/2-Propanol/H ₂ O/HCOOH B: 2-Propanol/H ₂ O/HCOOH/NH ₃ [19]	91:7:2:0,1 86:13:1:0,12
7.	A: Chloroform/Methanol/H ₂ O/HCOOH B: Methanol/H ₂ O/HCOOH [13]	73:24:3:0,1 95:5:0,1

Wie schon in Abschnitt 3.2 erwähnt, eignet sich die Tandem - Massenspektrometrie durch Vorläuferionen und Neutralverlust - Analyse zur Identifizierung von unterschiedlichen Lipidklassen. Daher werden zur Identifikation folgende Einstellungen zur Aufnahme der Massenspektren gewählt:

Tabelle 8: Vorläuferionen- bzw. Neutralverlustanalyse von Phospholipiden

	m/z-Verlust	Lipid	Kopfgruppe
Prec.	184,00	PC	Cholin
NL	141,00	PE	Ethanolamin
NL	185,00	PS	Serin

Tabelle 9: Neutralverlustanalyse von Triglyceriden

	m/z-Verlust	Lipid	Fettsäure
NL	217,20	TAG	12:0
NL	245,23	TAG	14:0
NL	273,20	TAG	16:0
NL	271,25	TAG	16:1
NL	287,20	TAG	17:0
NL	301,30	TAG	18:0
NL	299,20	TAG	18:1
NL	297,26	TAG	18:2
NL	329,30	TAG	20:0
NL	327,31	TAG	20:1
NL	321,30	TAG	20:4

5.2.1 Ergebnisse:

5.2.1.1 Unmodifiziertes Kieselgel als stationäre Phase (Betasil Silica):

Tabelle 10: HPLC/MS - Methode

Parameter	Einstellungen
Injektionsvolumen	10 µL
Flussrate	100 µL/min
Scanbereich	m/z 350 – 1100
Scanzeit	1 sec
IS	4800 V (positive Ionisation)
TEM	350 °C
Konditionierung	60 min.

1. Laufmittel 1 und 2:

Mit diesen Laufmitteln können sowohl die TAG und DAG als auch PE und PS von den Phosphatidylcholinen und den oxidierten PAPC - Spezies abgetrennt werden. Die LPC's und SM eluieren auf Grund ihrer Polarität deutlich später als die anderen Standardsubstanzen in der Probenlösung.

Wegen ihrer ähnlichen Eigenschaften eluieren die Oxidationsprodukte, mit den größeren Massen ($m/z > 782,6$) gemeinsam mit den PC-Standards und dem unoxidierten PAPC. Eine Abtrennung ist mit diesen mobilen Phasen somit nicht möglich.

Die oxidierten Phospholipide, welche mit Zersetzungsprodukten der Arachidonsäure (Oxidationsprodukte mit kleineren Massen) verestert sind, können dagegen mit Laufmittel 1 von den

anderen Komponenten der Probenlösung abgetrennt werden. Mit Laufmittel 2 ist keine Abtrennung möglich.

Auch bei Erhöhung der Salzkonzentration in Laufmittel 1 ist keine Abtrennung der oxidierten Spezies von den größeren Massen zu beobachten. Es verkürzen sich lediglich die Retentionszeiten aller in der Probe vorhandenen Komponenten.

Weiters ist zu beobachten, dass es bei einer höheren Salzkonzentration zu einer Peakverbreiterung kommt.

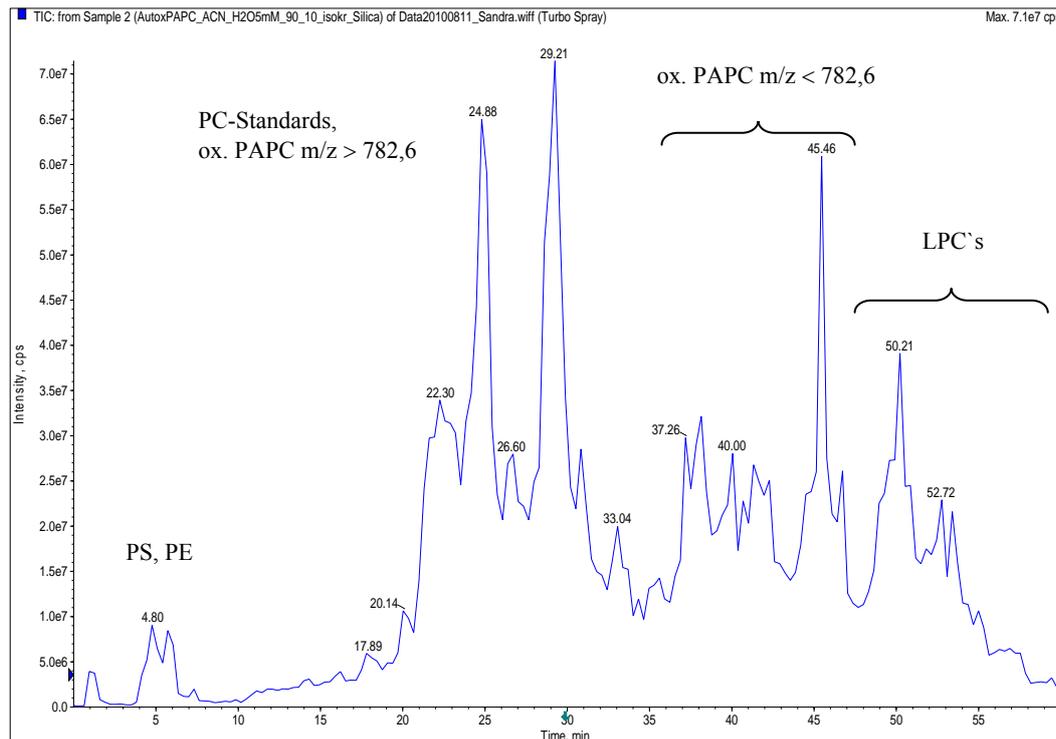


Abbildung 24: Chromatogramm mit Silicasäule, Laufmittel 1: 90% A, 10%B

2. *Laufmittel 3:*

Bei einem 90%igen Methanolanteil in der mobilen Phase sind die Peaks sehr schmal. Eine Abtrennung der oxidierten Phospholipide ist aber weder für die höheren noch für die niedrigeren Massen möglich, da alle Analyten in sehr kurzer Zeit eluieren. Bei Erhöhung des Methanolanteils im Laufmittel kommt es zu einer Peakverbreiterung, die Retentionszeiten werden dagegen nicht wesentlich länger, wodurch es zu einer Überlagerung sämtlicher Peaks im Chromatogramm kommt.

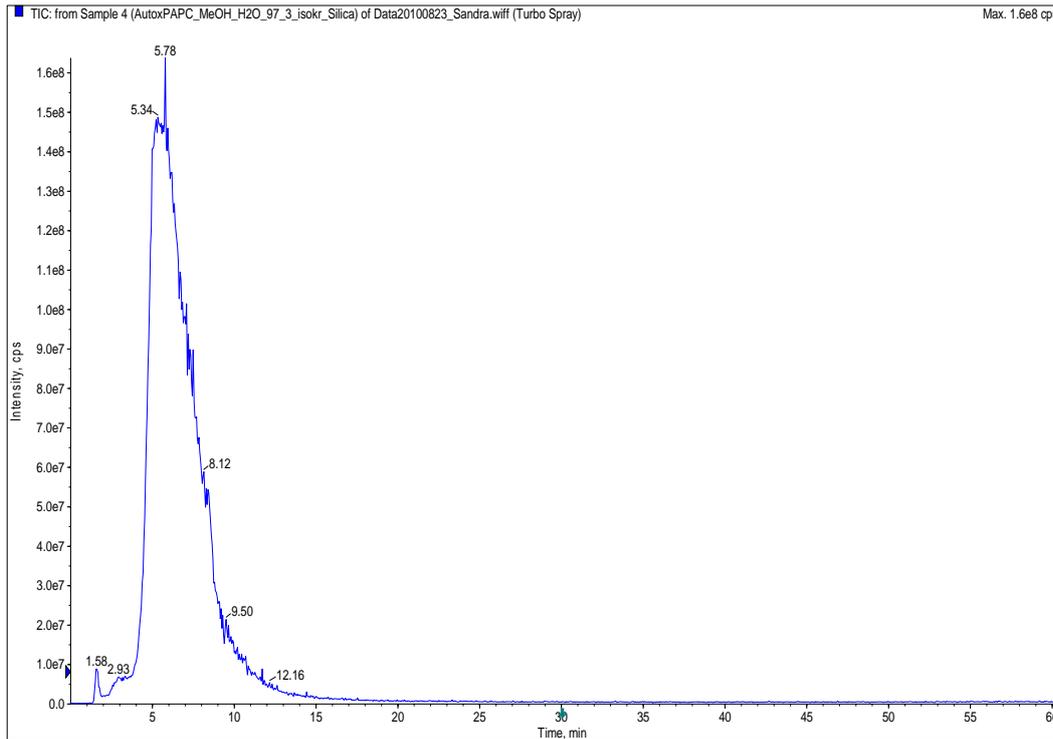


Abbildung 25: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 3: 97% A, 3% B

3. *Laufmittel 4 und 5:*

Alle Standardsubstanzen zeigen schmale Peaks, für die oxidierten Phospholipide sind breitere Peaks zu beobachten. Die Abtrennung der TAG, DAG, PS und PE von den PC's ist hierbei möglich, jedoch eluieren die oxidierten Phospholipide mit $m/z > 782,6$ mit den PC - Standardsubstanzen und die oxidierten Phospholipide mit $m/z < 782,6$ eluieren mit den LPC's.

Die Retentionszeiten sind relativ kurz, eine Erhöhung des Anteiles der schwächer eluierenden Komponente der mobilen Phase führt lediglich zu einer Verlängerung der Retentionszeiten und zu einer Peakverbreiterung, nicht aber zur Trennung.

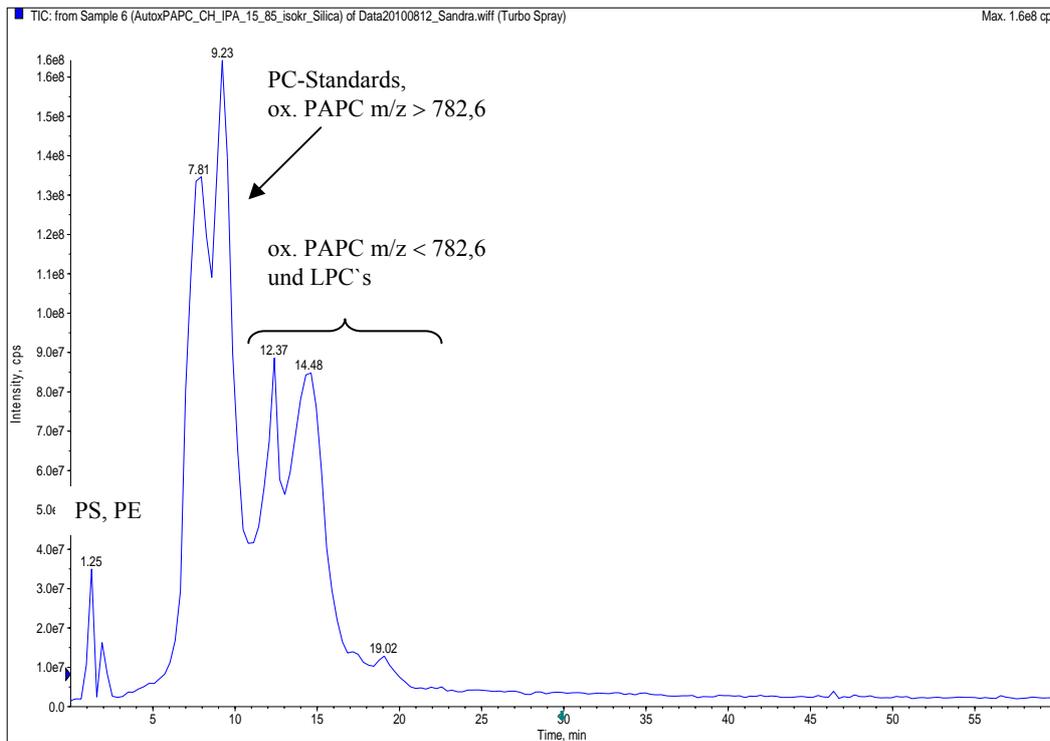


Abbildung 26: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 4: 15% A, 85% B

4. Laufmittel 6:

Auch mit diesem Laufmittel können die TAG, DAG, PE und PS von den übrigen Komponenten abgetrennt werden, eine Abtrennung beider Gruppen der oxidierten Phospholipide von den zugegebenen Phosphatidyl - Standardlipiden ist aber nicht möglich.

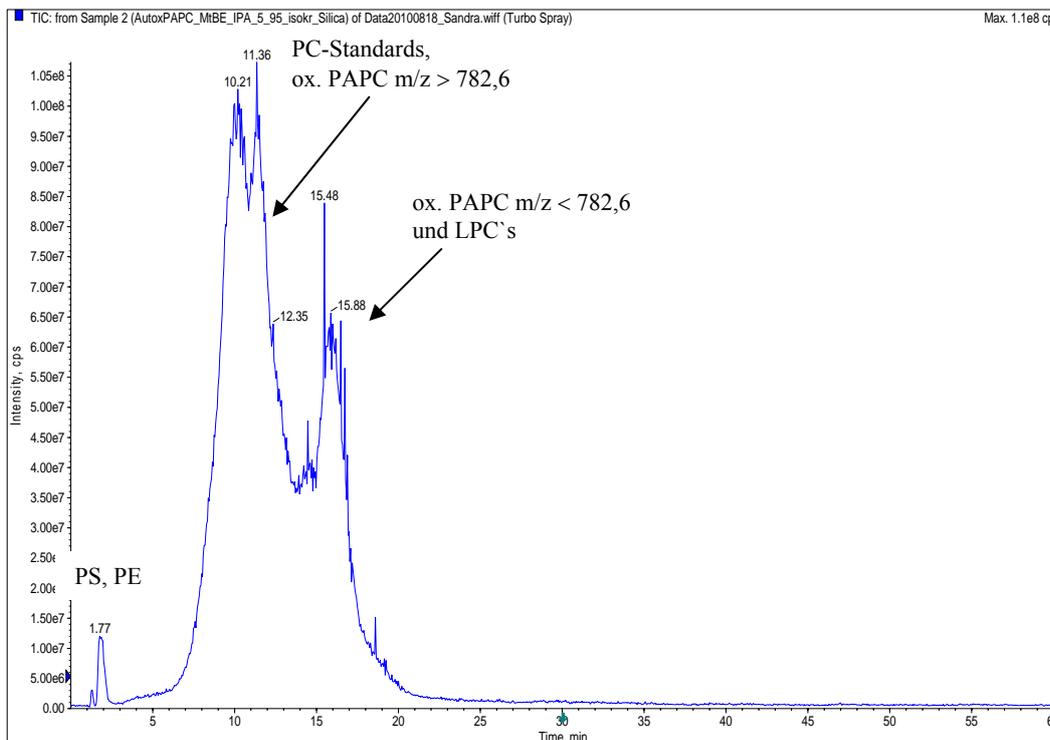


Abbildung 27: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 6, 5% A, 95% B

5. Laufmittel 7:

Die Retentionszeiten sind mit dieser mobilen Phase relativ kurz und es kommt zu keiner wesentlichen Verlängerung, auch wenn der CHCl_3 - Anteil in der mobilen Phase erhöht wird. Die Peaks sind recht schmal und die TAG, DAG, PS und PE können von den übrigen Komponenten gut abgetrennt werden. Es gelingt jedoch keine Abtrennung der oxidierten Phospholipide mit den höheren Massen von den PC - Standardsubstanzen. Die Oxidationsprodukte mit den niedrigeren Massen unterscheiden sich zwar etwas in den Retentionszeiten, eine Basislinientrennung vom Peak mit den höheren Massen und den PC - Standardsubstanzen ist aber nicht möglich. Das LPC des oxidierten PAPC (16:0) eluiert gleichzeitig mit den LPC - Standards.

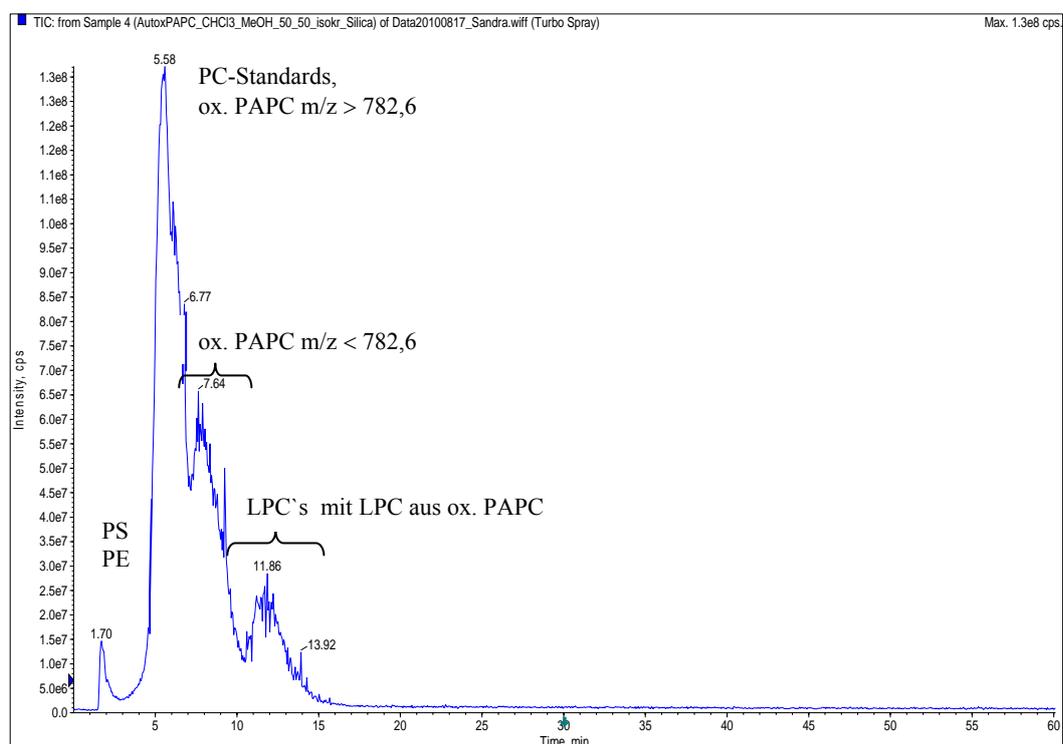


Abbildung 28: Chromatogramm mit Silicasäule, isokratisch, Laufmittel 7, 50% A, 50% B

5.2.1.2 Nucleosil - OH als stationäre Phase:

Tabelle 11: HPLC/MS - Methode

Parameter	Einstellungen
Injektionsvolumen	10 μL
Flussrate	150 $\mu\text{L}/\text{min}$
Scanbereich	m/z 350 – 1100
Scanzeit	1 sec
IS	4800 V (positive Ionisation)
TEM	350 $^{\circ}\text{C}$
Konditionierung	30 min.

1. Laufmittel 1 und 2:

Sowohl die Triglyceride als auch PE und PS eluieren deutlich früher, als die anderen Phospholipide. Die Abtrennung der Oxidationsprodukte mit $m/z > 782,6$ ist mit dieser mobilen Phase nicht möglich. Diese eluieren gleichzeitig mit den PC - Standardsubstanzen. Die Oxidationsprodukte mit $m/z < 782,6$ eluieren zugleich mit Sphingomyelin.

Tabelle 12: Gradientenelution mit Laufmittel 1

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	85	15
15	85	15
25	90	10
60	90	10
61	85	15
65	85	15

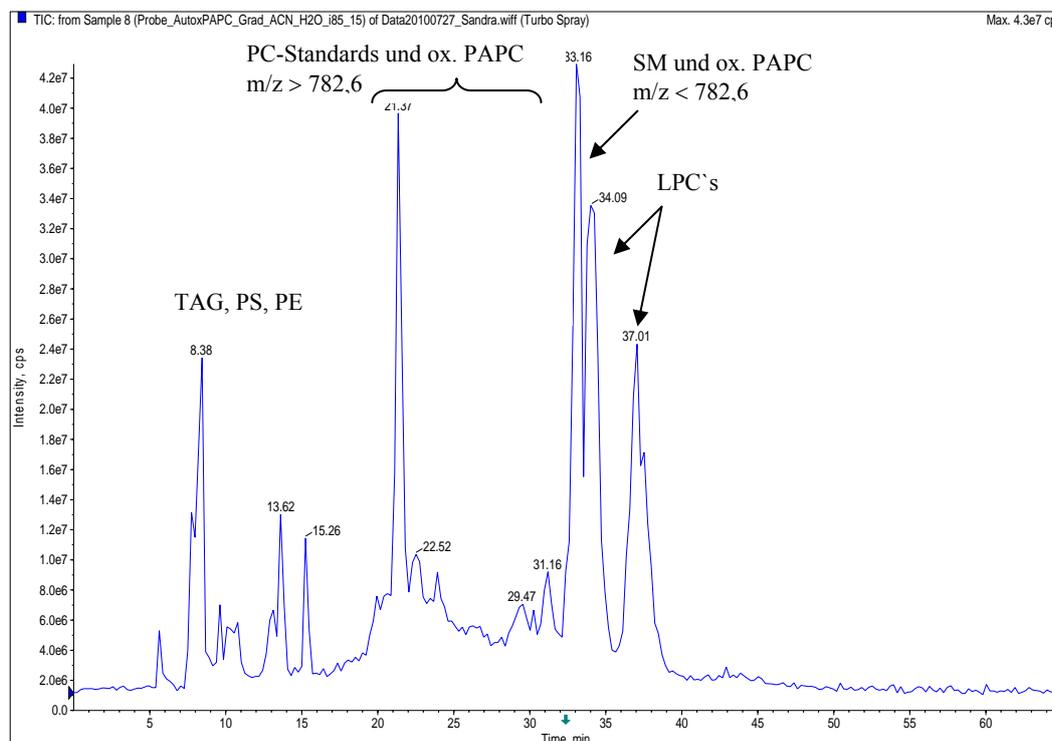


Abbildung 29: Chromatogramm mit Diol - Phase, Laufmittel 1, Gradient

2. Laufmittel 3:

Die Peaks der einzelnen Komponenten in den Extracted Ion Chromatogrammen sind recht schmal. Es erfolgt jedoch keine Trennung der oxidierten Phospholipide von den Phosphatidylcholin - Standardsubstanzen. Auf Grund der Polarität des Laufmittels ist die Retentionszeit der Analyten relativ kurz.

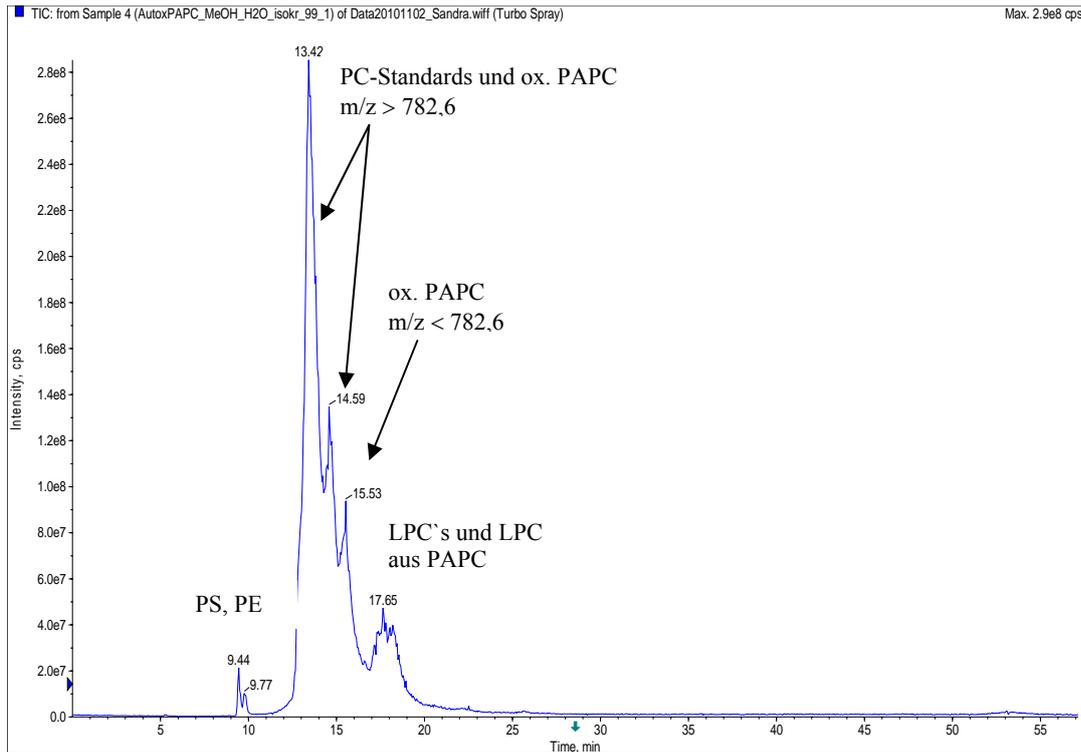


Abbildung 30: Chromatogramm mit Diolsäule, Laufmittel 3, isokratisch, 99% A, 1% B

3. Laufmittel 4 und 5:

Mit Hilfe einer Gradientenelution können mit Laufmittel 4 die TAG, PE, PS und zwei Arten von Phosphatidylcholinen von den Oxidationsprodukten die eine größere Masse als PAPC aufweisen abgetrennt werden. Jene Produkte, welche bei der Oxidation fragmentiert wurden, eluieren zwischen dem Sphingomyelin und den Lyso - PC's. Das Lyso - PC welches bei der Oxidation entstanden ist eluiert nach den LPC - Standards.

Tabelle 13: Gradientenelution mit Laufmittel 4

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	30	70
10	30	70
25	2	98
60	2	98
61	30	70
65	30	70

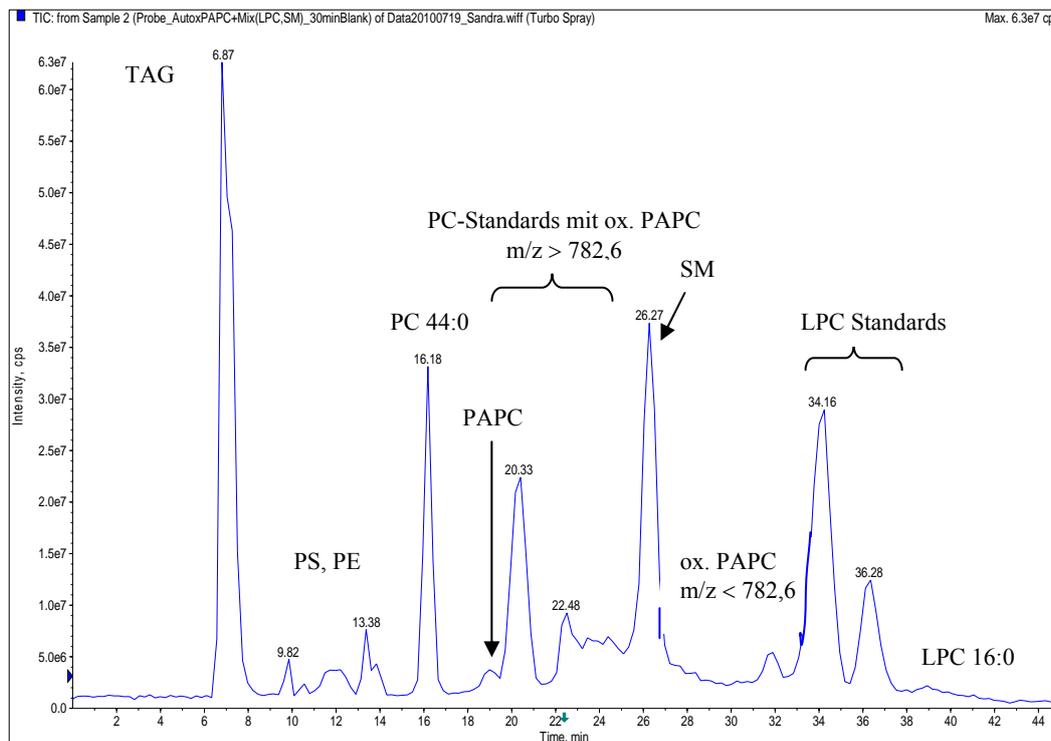


Abbildung 31: Chromatogramm mit Diol-Phase, Laufmittel 4, Gradient

4. Laufmittel 6:

Bei der Auftrennung mit dieser mobilen Phase sind die Peaks recht breit. Wiederum können die Triglyceride, die Phosphatidylserine und die Phosphatidylethanolamine gut von den anderen Komponenten des Analytengemisches abgetrennt werden. Auch eine Abtrennung der oxidierten Phospholipide mit $m/z < 782,6$ gelingt recht gut. Diese eluieren zwischen Sphingomyelin und den Lyso - PC - Standards. Eine Abtrennung der oxidierten PAPC - Spezies mit den höheren Massen von den Phosphatidylcholin - Standards ist mit diesem Laufmittel jedoch nicht möglich.

Tabelle 14: Gradientenelution mit Laufmittel 6

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	10	90
5	10	90
6	3	97
25	3	97
26	10	90
65	10	90

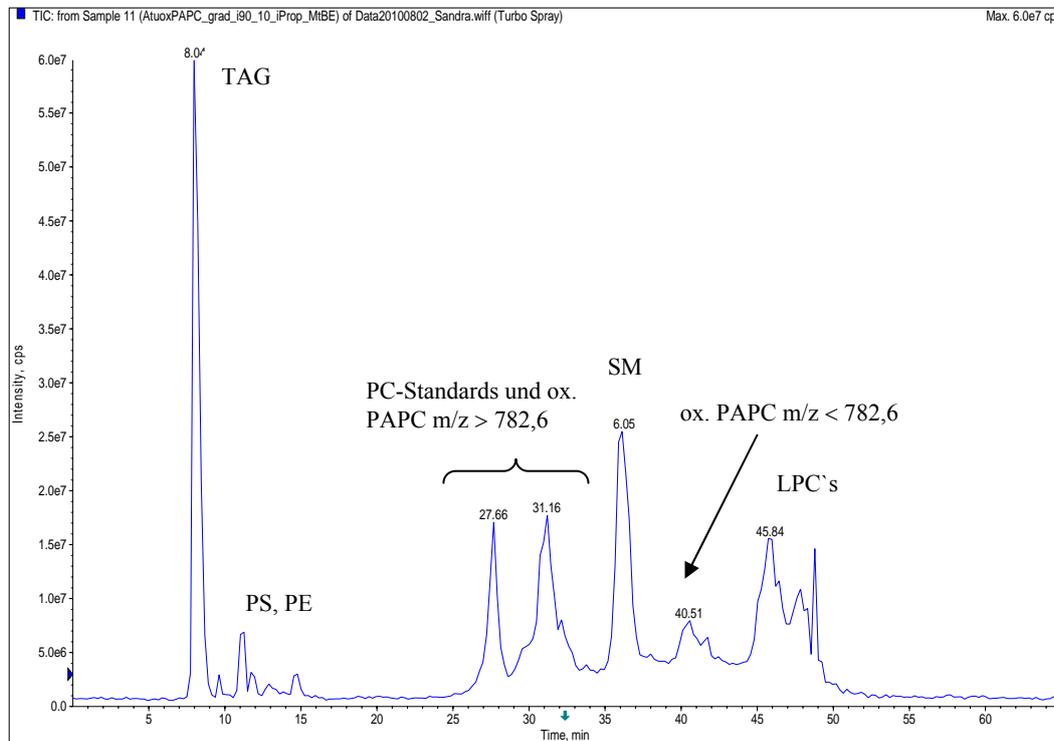


Abbildung 32: Chromatogramm mit Diol - Phase, Laufmittel 6, Gradient

5. Laufmittel 7:

Obwohl die Peaks der einzelnen Komponenten des Gemisches recht schmal sind gelingt mit dieser mobilen Phase lediglich die Abtrennung der TAG, PE und PS. Die Analyten mit $m/z > 782,6$ eluieren gleichzeitig mit den Phosphatidylcholin - Standards und die Oxidationsprodukte mit $m/z < 782,6$ eluieren zugleich mit den LPC's und SM. Wird der Anteil der schwächer eluierenden Komponente des Laufmittels erhöht ist nur eine Peakverbreiterung, aber keine Verbesserung in der Trennung der Komponenten zu beobachten.

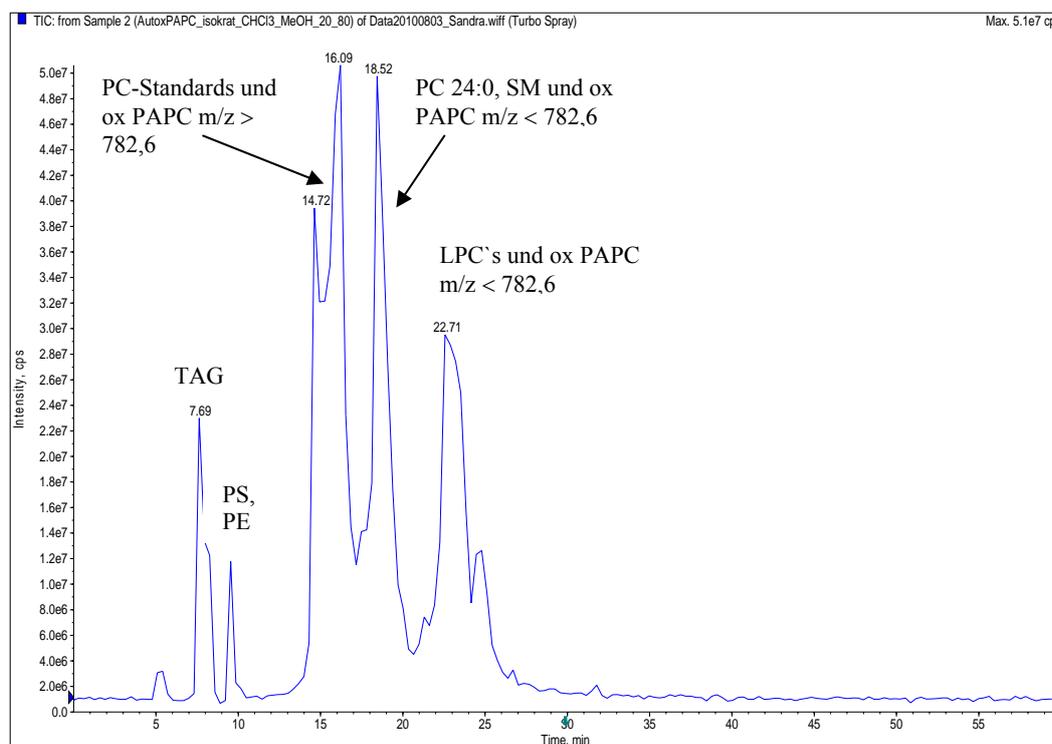


Abbildung 33: Chromatogramm mit Diol - Phase, Laufmittel 7, isokratisch, 20% A, 80% B

5.2.1.3 Amino-modifizierte stationäre Phase:

Tabelle 15: HPLC/MS-Methode

Parameter	Einstellungen
Injektionsvolumen	10 μ L
Flussrate	150 μ L/min
Scanbereich	m/z 350 – 1100
Scanzeit	1 sec
IS	4800 V (positive Ionisation)
TEM	350 $^{\circ}$ C
Konditionierung	60 min.

1. Laufmittel 1 und 2:

Bei Laufmittel 1 sind die Peaks bei einem Acetonitril - Anteil von 80% in der mobilen Phase sehr schmal, wobei meist Doppelpeaks ($t = 5,96$ min. ist gemeinsamer Peak der meisten Probenmoleküle) zu beobachten sind. Es erfolgt keine Trennung, alle Komponenten in der Probenlösung eluieren gleichzeitig. Bei Erhöhung des Acetonitrilanteiles in der mobilen Phasen erscheinen die meisten Komponenten der Probenlösung als Rauschen im Chromatogramm.

Laufmittel 2 ist gänzlich ungeeignet für dieses Trennproblem, da für sämtliche Komponenten der oxidierten Phospholipide ein Rauschen im Chromatogramm zu sehen ist.

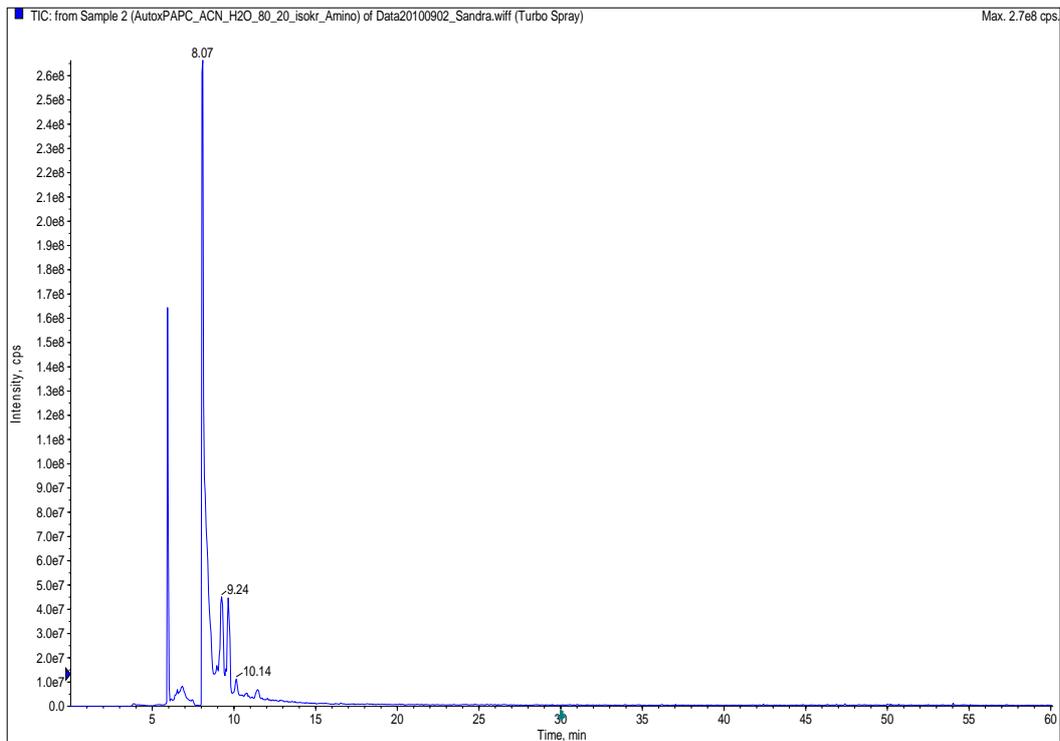


Abbildung 34: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 1, 80% A, 20% B

2. Laufmittel 3:

Die Peaks der einzelnen Komponenten der Probenlösung sind sehr schmal, die Retentionszeiten sind jedoch sehr kurz und es eluieren alle Substanzen, bis auf die LPC's gleichzeitig.

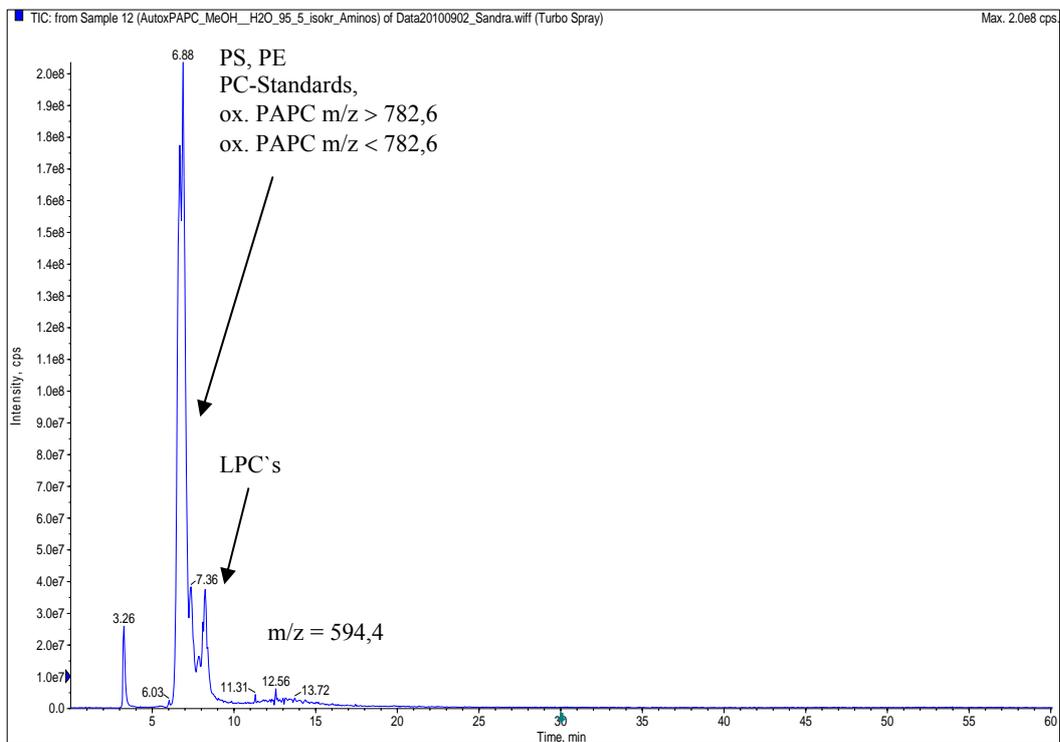


Abbildung 35: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 3, 95% A, 5% B

3. Laufmittel 4 und 5:

Wiederum sind die Peaks für die Standardsubstanzen sehr schmal, die Peaks des oxidierten Phosphatidylcholines sind dagegen relativ breit. Weiters tritt für die meisten Analyten ein Doppelpack bei $t = 6,15$ min. auf. Die PE-Standardsubstanzen können im Chromatogramm identifiziert werden, das PS aber wird anscheinend supprimiert, da hierfür kein Peak gefunden werden kann. Die oxidierten Komponenten mit $m/z > 782,6$ können nicht abgetrennt werden, ein Teil der Oxidationsprodukte mit den niedrigeren Massen dagegen schon. Das LPC aus der Oxidation von PAPC und $m/z = 610,3$ (oxidiertes Phospholipid mit hoher Intensität) eluiert gleichzeitig mit den LPC - Standardsubstanzen.

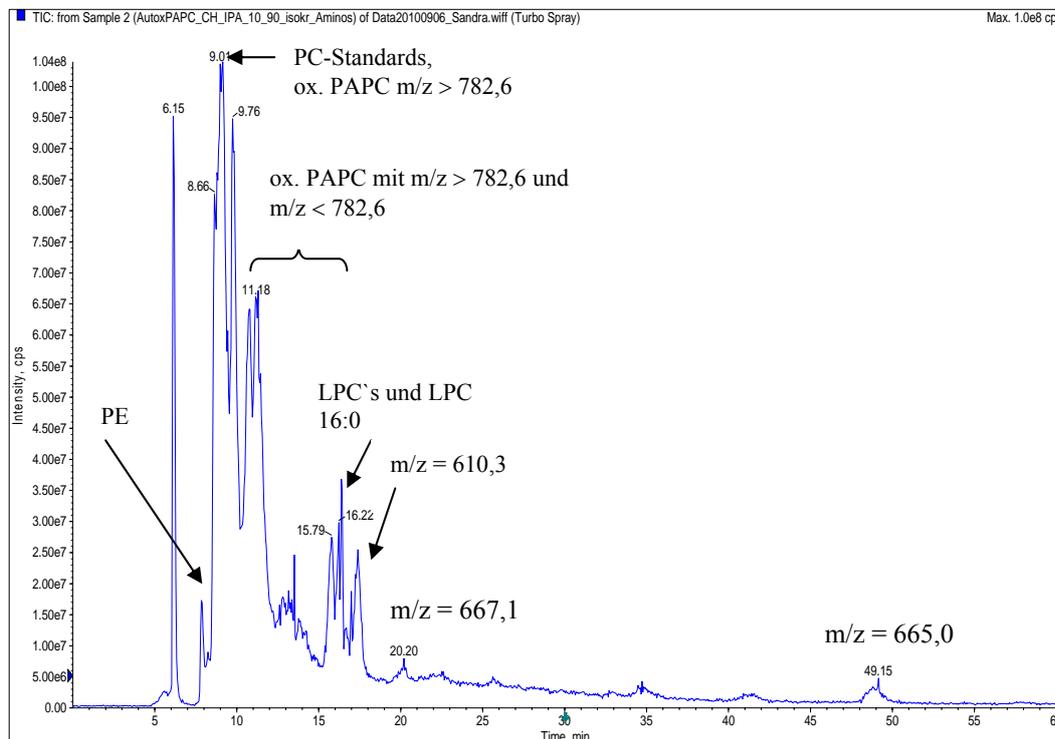


Abbildung 36: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 4, 10% A, 90% B

4. Laufmittel 6:

Hier gilt dasselbe wie für Laufmittel 4 und 5.

Da die Phosphatidylserin - Standardlipide sehr spät eluieren und diese stationäre Phase nach Auswertung der Chromatogramme mit den anderen mobilen Phase für das Trennproblem wenig geeignet erscheint, werden die Verhältnisse der beiden Komponenten des Elutionsmittels nicht weiter zu geringerer Polarität und somit zu geringerer Elutionsstärke variiert.

Tabelle 16: Gradientenelution mit Laufmittel 6

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	8	92
10	8	92
25	5	95
60	5	95
61	8	92
65	8	92

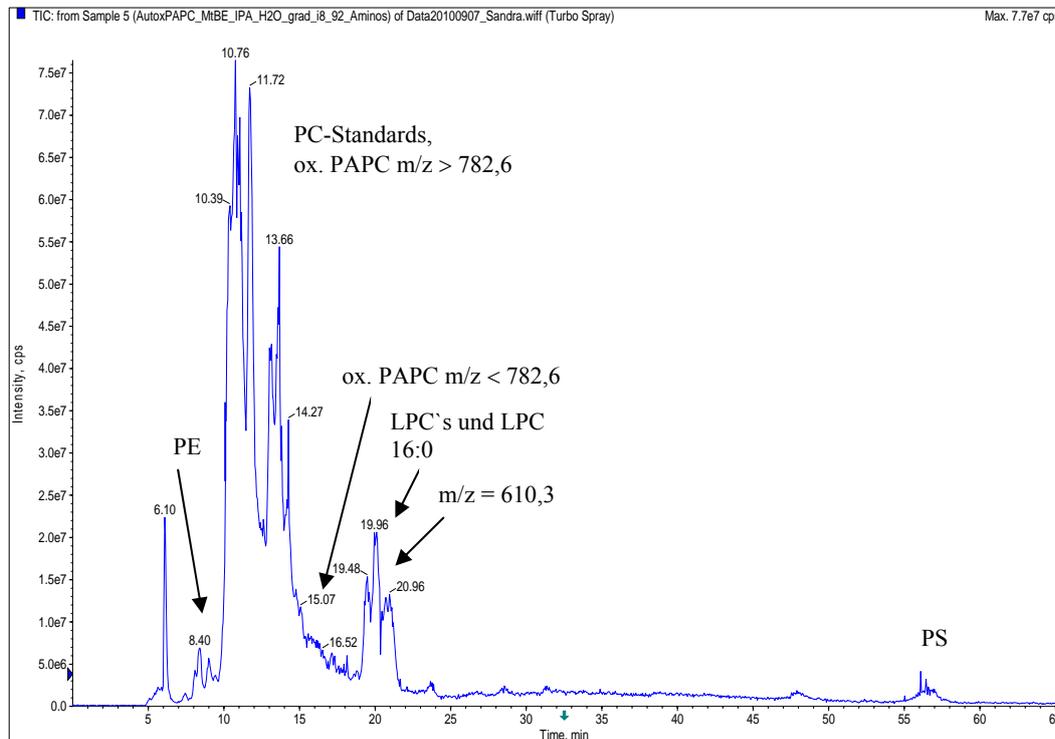


Abbildung 37: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 6, Gradient

5. Laufmittel 7:

Wieder sind die Peaks sehr schmal, diesmal auch für die Oxidationsprodukte. Außerdem tritt ein Doppelpeak bei $t = 3,03$ min. auf, den die meisten Analyten in der Probenlösung gemeinsam haben. Die Retentionszeiten sind relativ kurz, auch bei einem höheren Anteil der schwächer eluierenden Komponente der mobilen Phase. Fast alle Analyten eluieren zur selben Zeit, außer das Oxidationsprodukt mit m/z 610,3, welches eine deutlich längere Retentionszeit besitzt.

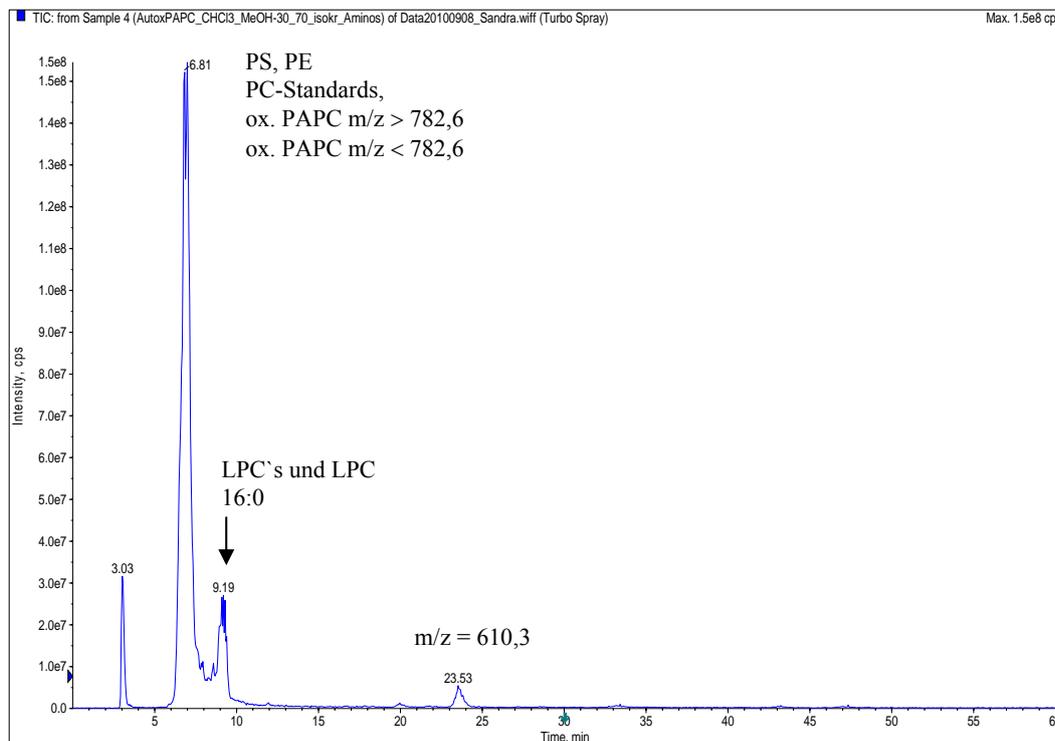


Abbildung 38: Chromatogramm mit Aminosäule, isokratisch, Laufmittel 7, 30% A, 70% B

5.2.1.4 PVA-SIL als stationäre Phase:

Tabelle 17: HPLC/MS-Methode

Parameter	Einstellungen
Injektionsvolumen	10 μ L
Flussrate	300 μ L/min
Scanbereich	m/z 350 – 1100
Scanzeit	1 sec
IS	4800 V (positive Ionisation)
TEM	350 $^{\circ}$ C
Konditionierung	60 min.

1. Laufmittel 1, 2 und 3:

Laufmittel 1 und 2 sind für diese Art der stationären Phase ungeeignet, da die auf der stationären Phase adsorbierten Analyten nicht eluieren.

2. Laufmittel 4 und 5:

Nach Auftrennung des Substanzgemisches mit Laufmittel 4 sind relativ schmale Peaks und das Auftreten von Doppelpeaks zu beobachten. Die Retentionszeit ist mit dieser Zusammensetzung von Laufmittel B relativ kurz und ein höherer Anteil von Cyclohexan führt zu einer Peakverbreiterung, weshalb die Zusammensetzung des Laufmittels B geringfügig geändert wird. Der Anteil von

2-Propanol beträgt nach Änderung 90% und der Wasseranteil wird auf 10% reduziert. Mit dieser Anpassung des Laufmittels können PE, PS und die meisten der PC-Standardsubstanzen von den oxidierten PAPC - Spezies mit den größeren Massen abgetrennt werden. Auch das oxidierte PAPC mit den niedrigeren Massen kann von den LPC - Standardsubstanzen getrennt werden, wobei sogar das LPC aus der Oxidation von PAPC etwas später als die Standardlipide eluiert. Das beste Ergebnis wird hierbei durch eine isokratische Elution mit der Zusammensetzung 20% Laufmittel A und 80% Laufmittel B erzielt.

Eine Änderung der Temperatur des Säulenofens von 35°C auf 25°C führt lediglich zu etwas längeren Retentionszeiten, aber nicht zu einer besseren Trennung der Substanzen.

Die Substitution von 2-Propanol durch 5% Methyl-tert-Butyl-Ether führt zu keinen wesentlichen Veränderungen im Chromatogramm. Durch Zugabe von 5% CHCl_3 als Modifier kommt es zu einer Peakverbreiterung und somit zu einer schlechteren Trennung des Gemisches.

Für Laufmittel 5 als mobile Phase wird ein etwas schlechteres Trennergebnis erzielt als für Laufmittel 4. Auch hier kann isokratisch mit einem Verhältnis 20% Laufmittel A und 80% Laufmittel B das beste Resultat erreicht werden.

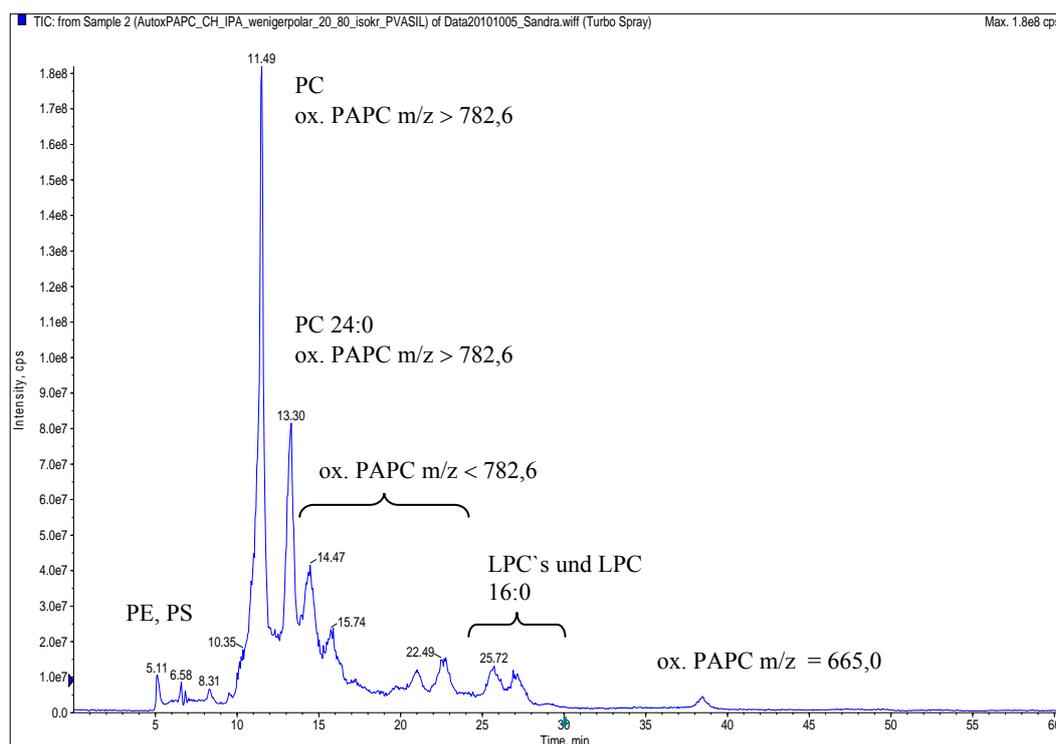


Abbildung 39: Chromatogramm mit PVA – SIL - Säule, isokratisch, modifiziertes Laufmittel 4, 20% A, 80% B

3. Laufmittel 6:

Die Retentionszeiten mit dieser mobilen Phase sind sehr kurz. Die Peaks sind recht schmal, die Abtrennung der $m/z > 782,6$ von den PC-Standards ist jedoch nicht möglich. Auch die Oxidationsprodukte mit den niedrigeren Massen eluieren knapp hinter den PC-Standards. Die LPC's unterscheiden sich deutlich in ihren Retentionszeiten von den anderen Substanzen in der Probenlösung. Der Peak des LPC aus der Oxidation von PAPC überlappt aber mit den Peaks der LPC - Standardsubstanzen. Da die Retentionszeiten mit diesem Laufmittel sehr kurz sind, wird hier ebenso wie bei Laufmittel 4 der Wasseranteil der B-Komponente der mobilen Phase reduziert.

Neue Zusammensetzung: 2-Propanol/H₂O/HCOOH/NH₃ 90:9:1:0,12

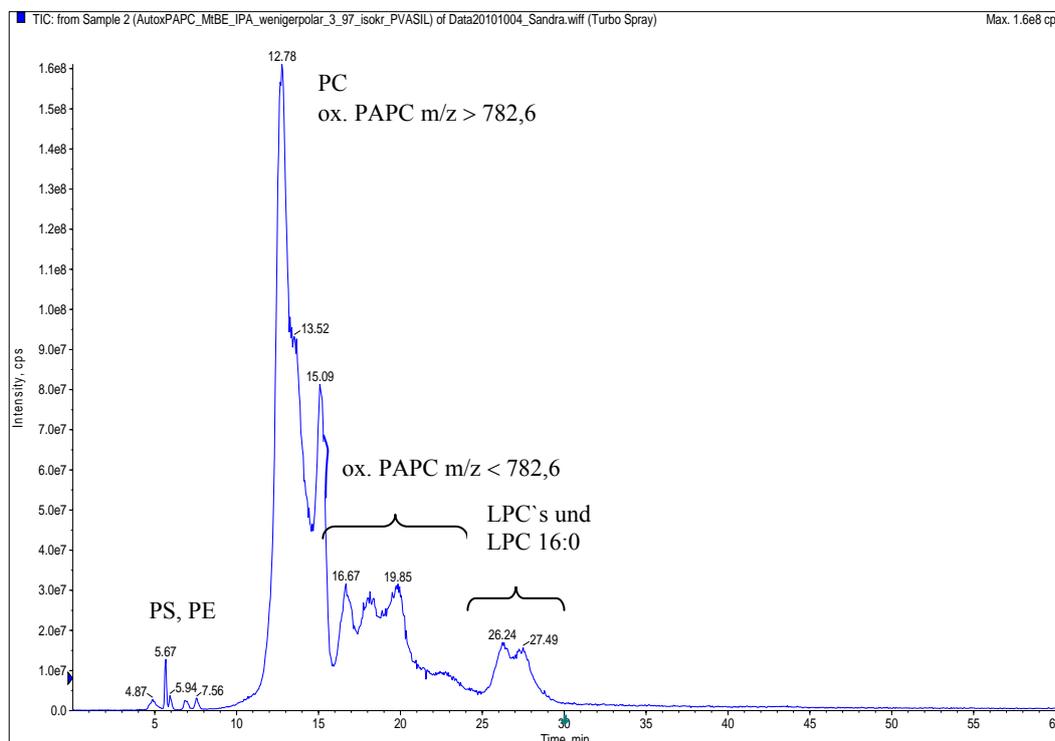


Abbildung 40: Chromatogramm mit PVA-SIL-Säule, isokratisch, modifiziertes Laufmittel 6, 3% A, 97% B

4. Laufmittel 7:

Mit diesem Laufmittel werden sehr schmale Peaks erzielt, dabei kann beobachtet werden, dass die Peaks umso schmaler werden, je höher der Anteil an Laufmittel A, d.h. je höher der Anteil an CHCl₃ ist. Die Retentionszeiten sind sehr kurz, auch wenn der Anteil der weniger polaren Komponente des Laufmittels erhöht wird. Problematisch dabei ist, dass CHCl₃ Teile der HPLC - Anlage bzw. das Material der stationären Phase angreift, so dass der Anteil von Laufmittel A an der mobilen Phase nicht über 60% erhöht wird.

Es können nur PE und die LPC's abgetrennt werden. PS und die oxidierten PC's mit den größeren Massen eluieren gleichzeitig mit den Phosphatidylcholin - Standards, sowie einige oxidierte Analyten mit niedrigeren Massen.

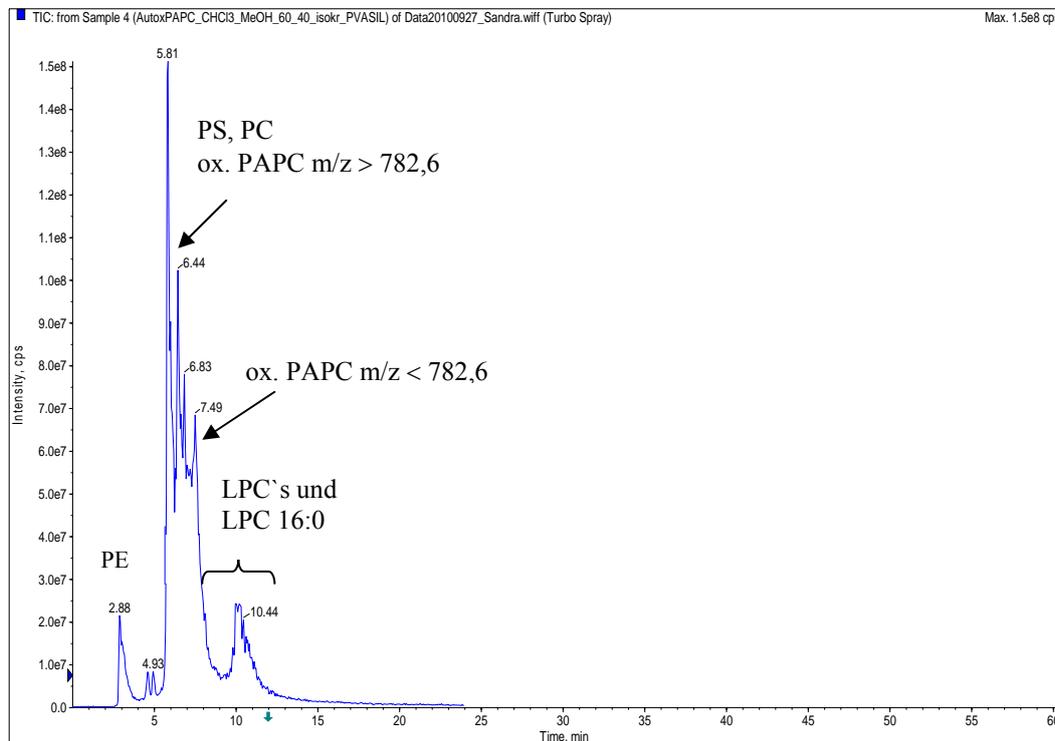


Abbildung 41: Chromatogramm mit PVA-SIL-Säule, isokratisch, Laufmittel 7, 60%A, 40%B

5.2.2 Diskussion:

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für dieses Trennproblem mit Diol bzw. PVA - SIL als stationäre Phasen die besten Resultate erzielt werden können. Unmodifiziertes Kieselgel und die Amino - modifizierte stationäre Phase sind hierbei weniger gut geeignet.

Die besten Ergebnisse auf der Diol – modifizierten stationären Phase werden mit der folgenden mobilen Phasen erhalten (Gradientenelution siehe Tab. 13):

- 1.) A = Cyclohexan
B = 2-Propanol/H₂O/HCOOH/NH₃

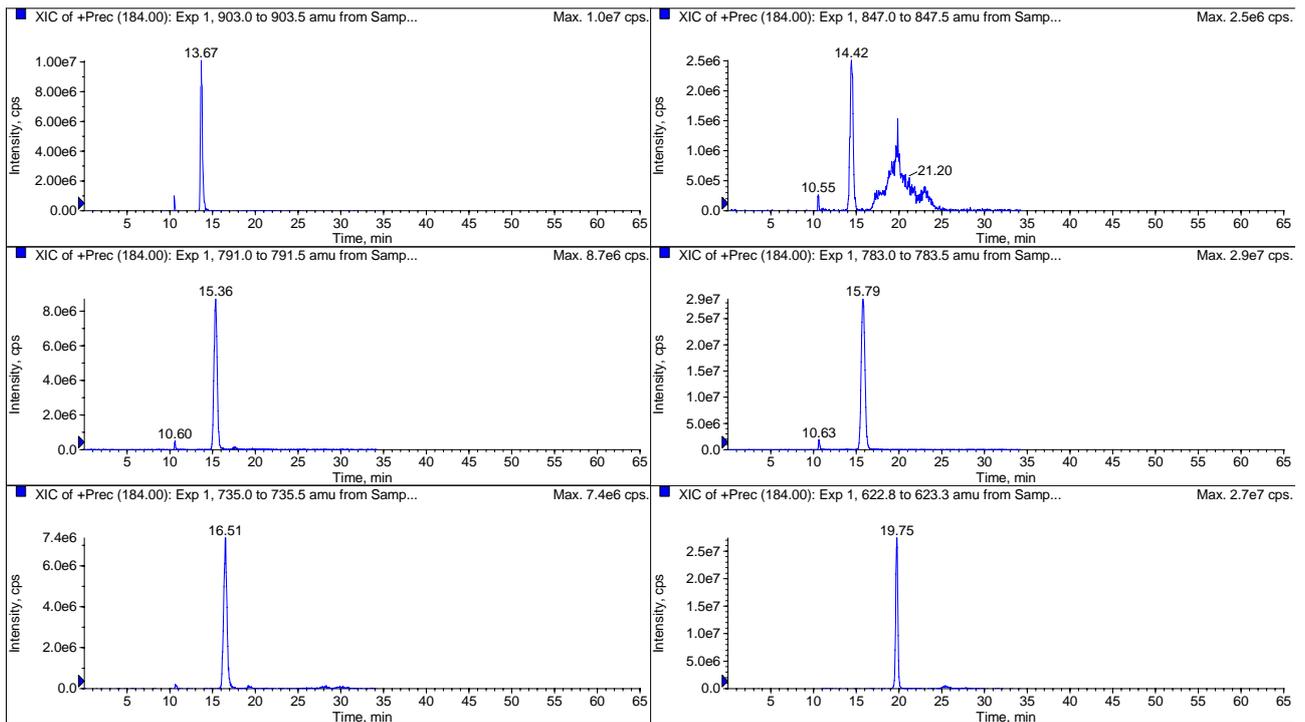


Abbildung 42: Extracted Ion Chromatogramme von unoxidierten PC – Standardsubstanzen (Diol)

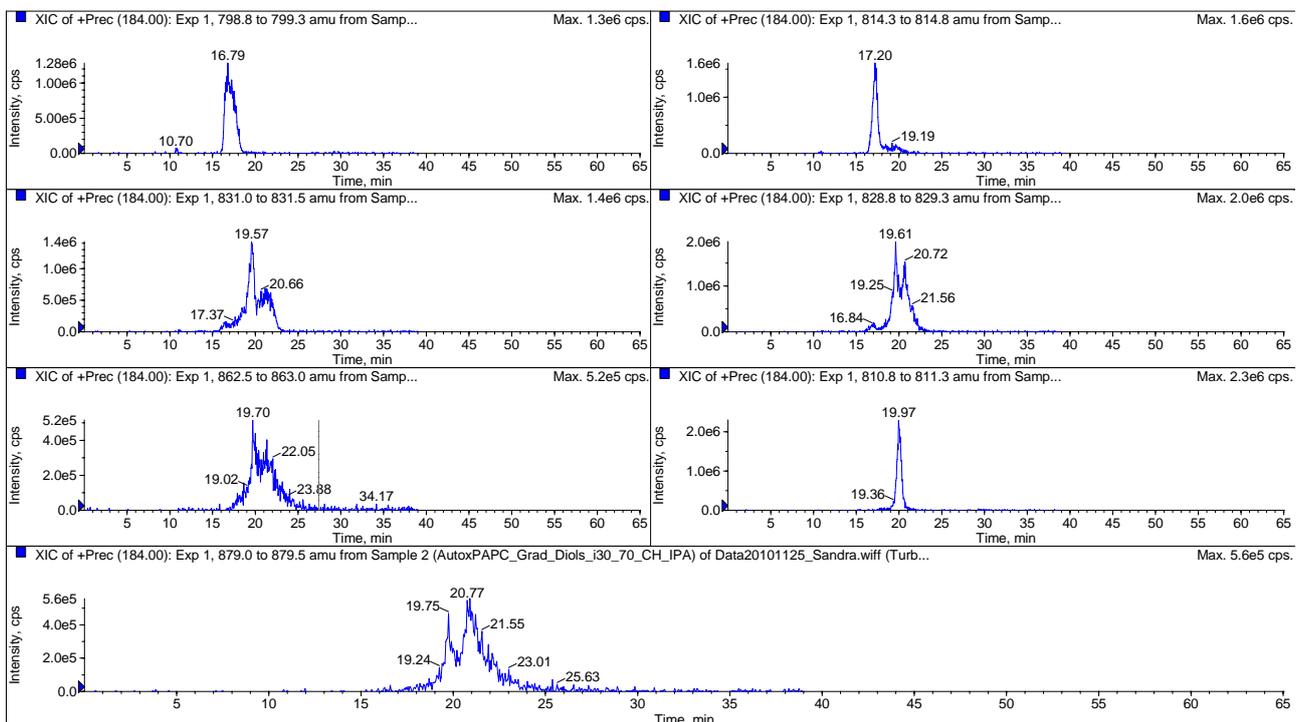


Abbildung 43: Extracted Ion Chromatogramm von oxidierten PAPC - Species mit $m/z > 782,6$ (Diol)

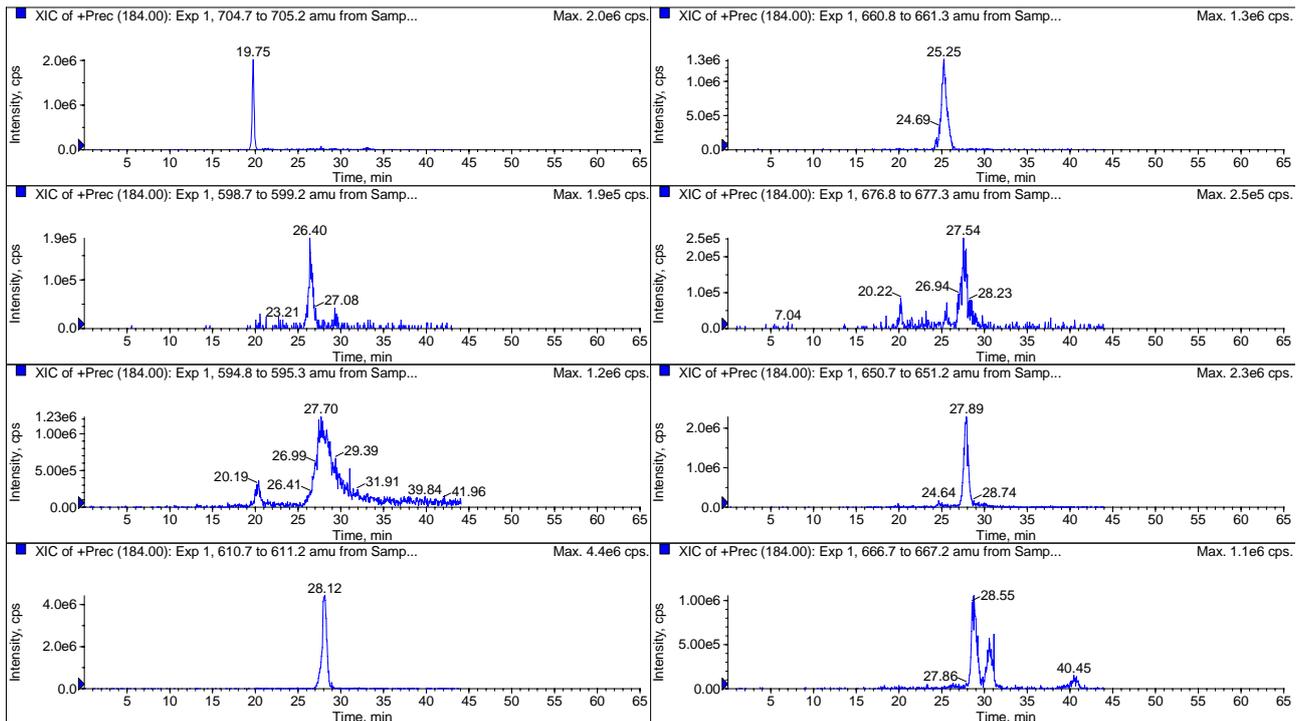


Abbildung 44: Extracted Ion Chromatogramme von oxidierten PAPC - Spezies mit $m/z < 782,6$ (Diol)

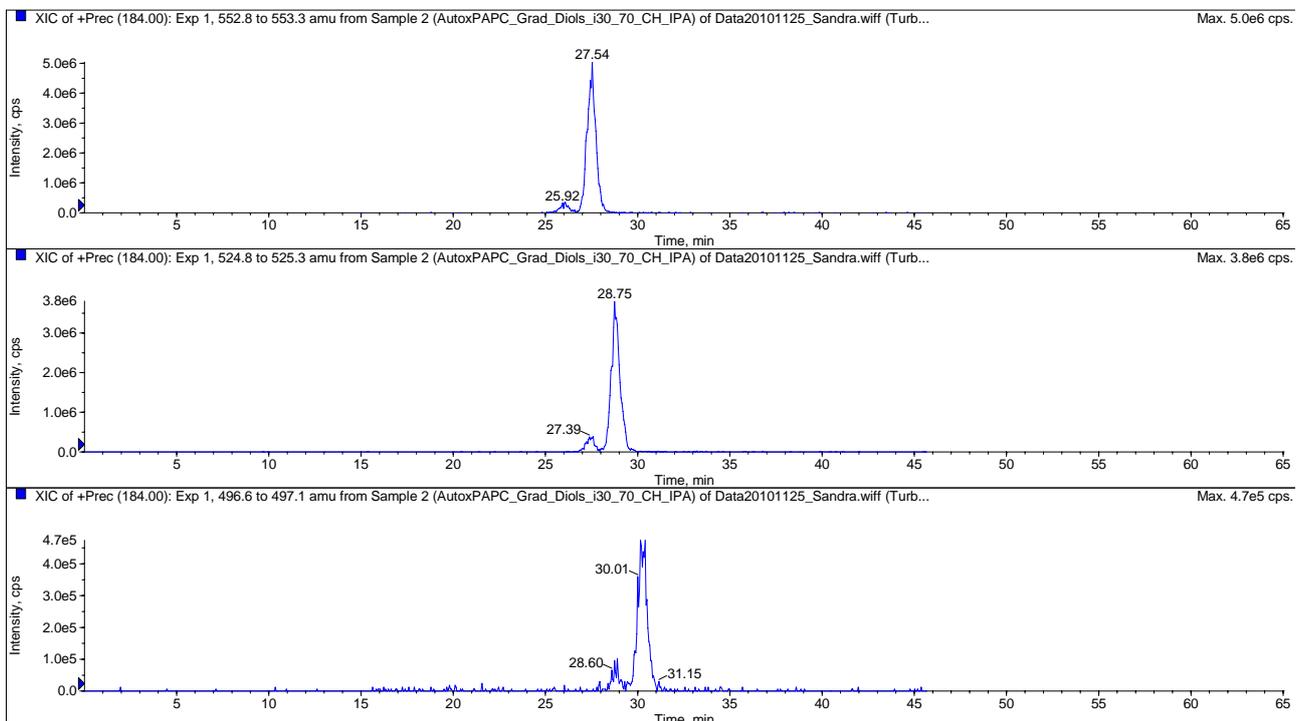


Abbildung 45: Extracted Ion Chromatogramme der Lyso - PC's (Diol)

Die besten Ergebnisse auf der mit Polyvinylalkohol modifizierten stationären Phase werden durch isokratische Elution mit folgendem Laufmittel erhalten:

- 2.) A = Methyl-tert-Butylether/2-Propanol/H₂O/HCOOH 3 %
 B = 2-Propanol/H₂O/HCOOH/NH₃ 97 %

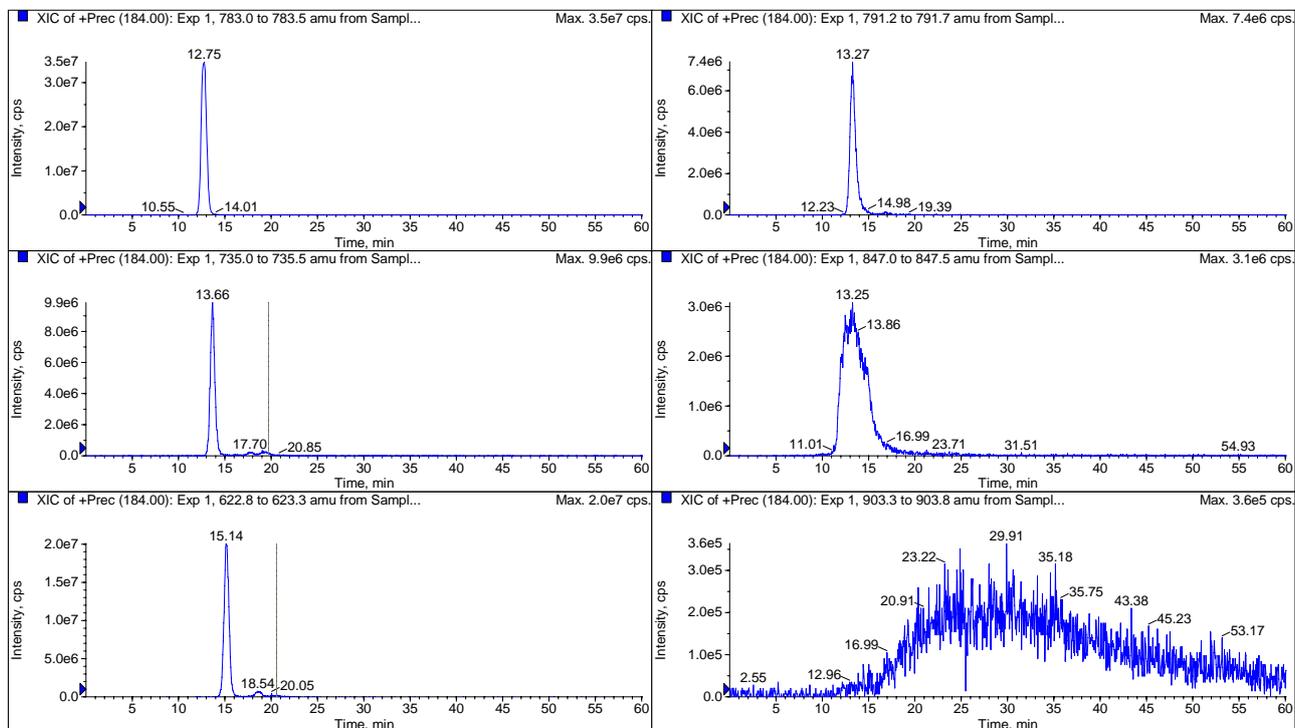


Abbildung 46: Extracted Ion Chromatogramme von unoxidierten PC – Standardsubstanzen (PVA – SIL)

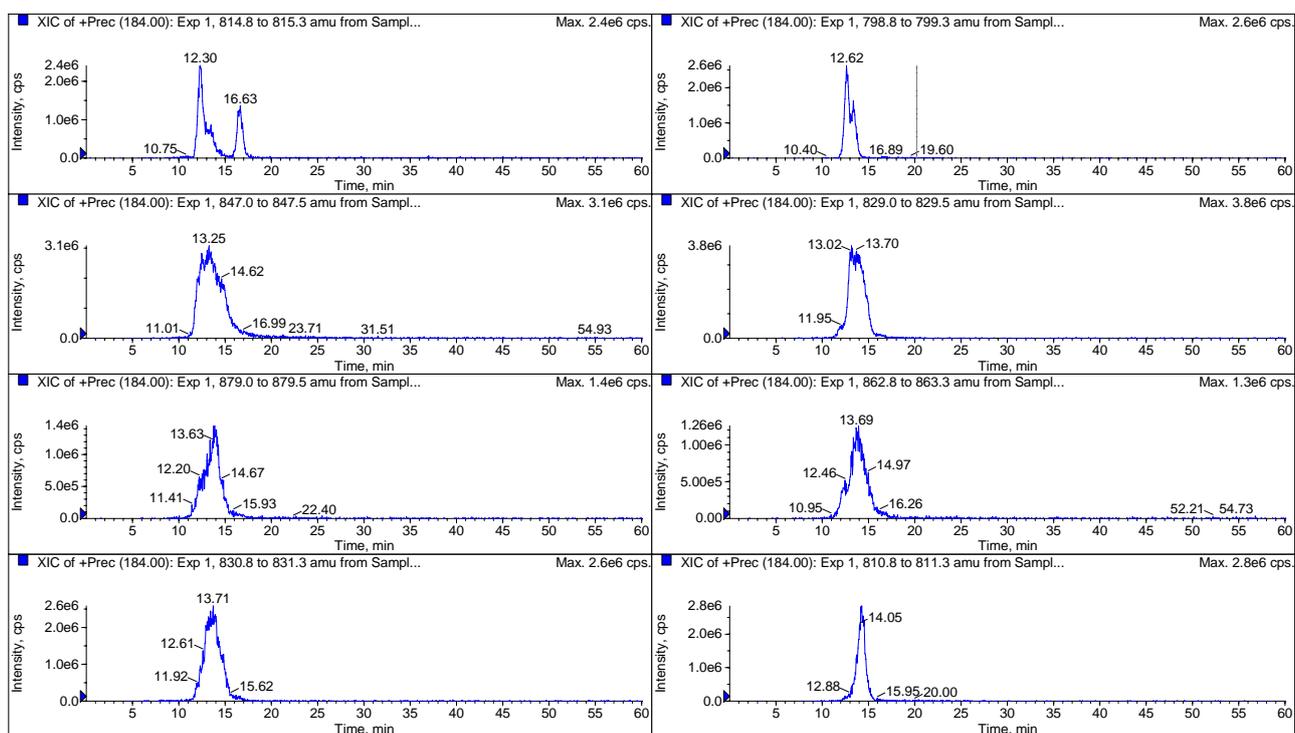


Abbildung 47: Extracted Ion Chromatogramme von oxidierten PAPC - Spezies mit m/z > 782,6 (PVA – SIL)

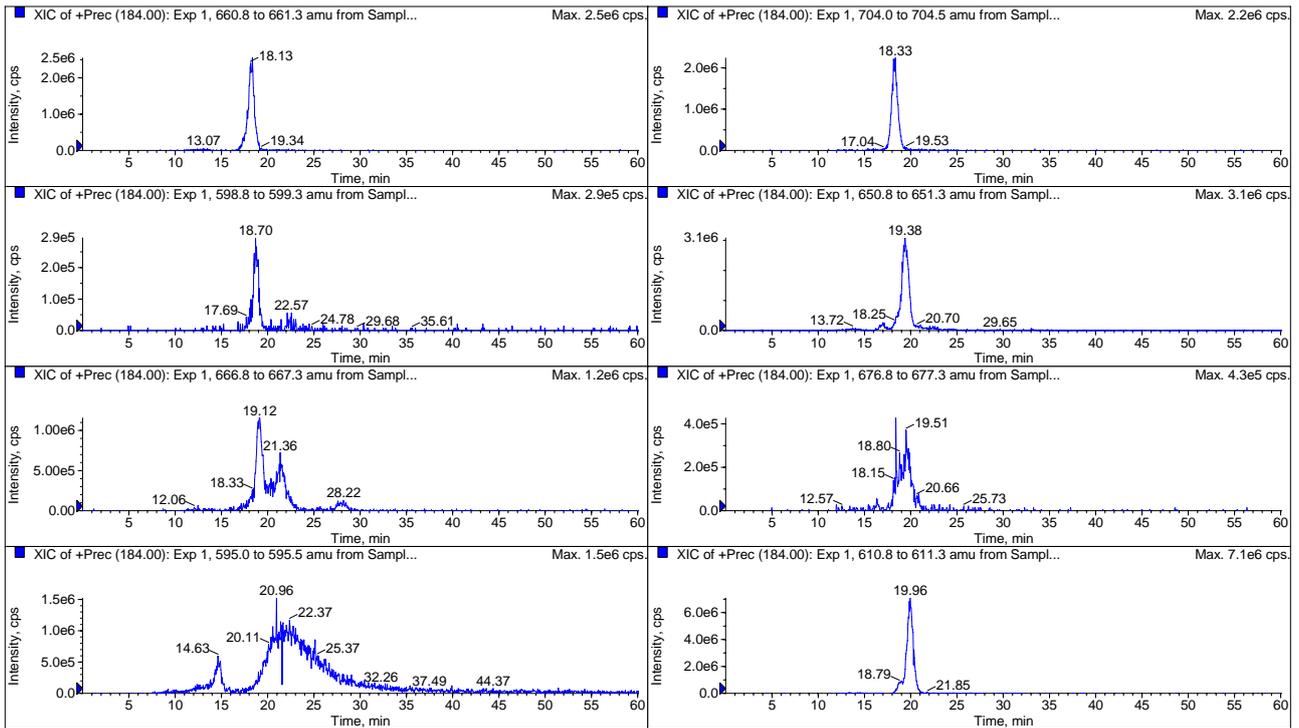


Abbildung 48: Extracted Ion Chromatogramme von oxidierten PAPC – Spezies mit $m/z < 783,6$ (PVA – SIL)

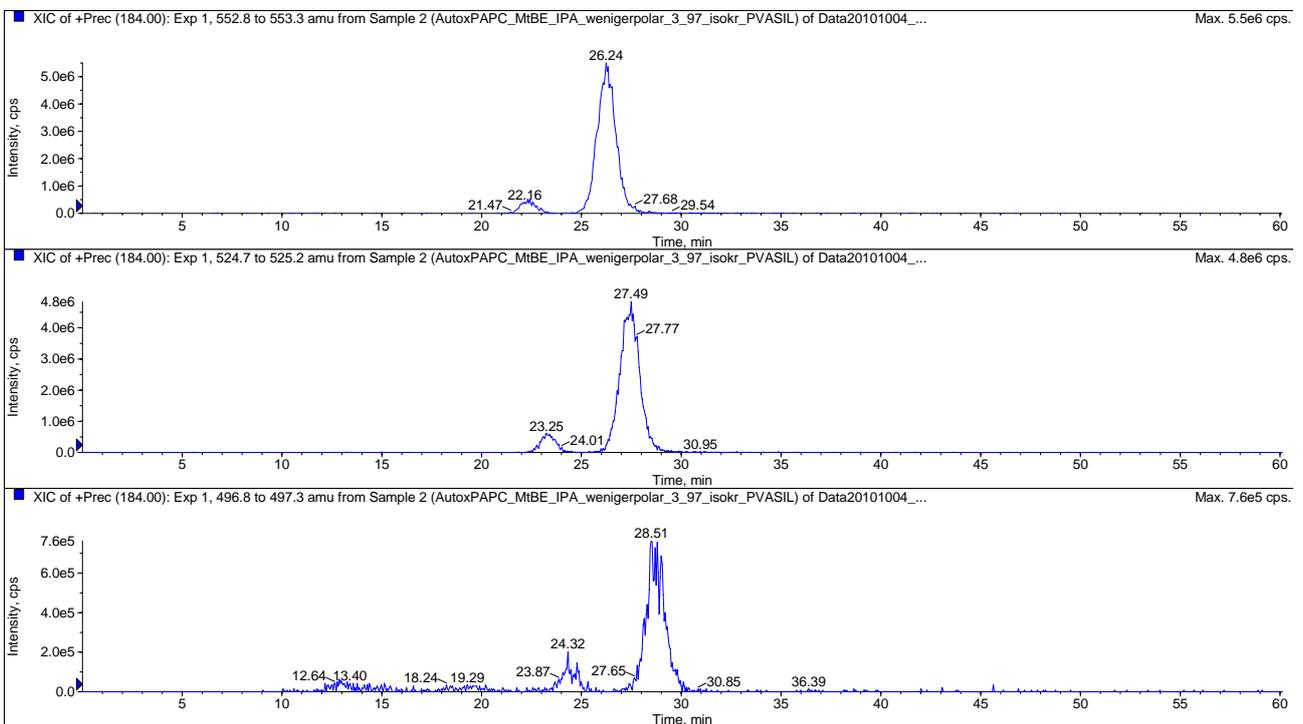


Abbildung 49: Extracted Ion Chromatogramme von den LPC's (PVA - SIL)

Es ist zu beobachten, dass die Retentionszeiten auf der Diol - modifizierten stationären Phase mit einer polarerer mobilen Phase deutlich länger sind, als auf der PVA – SIL - Säule, bei der die mobile Phase so modifiziert wurde, dass diese eine geringere Polarität aufweist. Allgemein werden bei der Chromatographie mit PVA - SIL als stationäre Phase schmälere Peaks erhalten als mit der Diol - Phase, nichts desto trotz wird aber bei letzterer eine bessere Trennung erzielt. Eine Variation des Laufmittels bei PVA - SIL zu noch geringerer Polarität führt lediglich zu einer Peakverbreiterung, nicht aber zu einer besseren Trennung bzw. zu wesentlich längeren Retentionszeiten der Probenkomponenten.

5.3 Bestimmung der exakten Masse der Oxidationsprodukte mittels FT - MS:

Die Ermittlung der exakten Massen der oxidierten PAPC - Spezies erfolgt mittels FT-MS mit einem System, welches in Abschnitt 4.5 näher beschrieben ist.

Um Suppressionseffekte für gewisse Phospholipide zu vermeiden wird das Lipidgemisch (siehe Abschnitt 5.2) mittels HILIC – HPLC - MS vorab fraktioniert.

Tabelle 18: HPLC/MS - Methode zur Fraktionierung

Parameter	Einstellungen
Stationäre Phase	VP 250/10 Nucleosil 100-5 OH
Mobile Phase	A: MtBE/2-Propanol/H ₂ O/HCOOH (91:7:2:0,1) B: 2-Propanol/H ₂ O/HCOOH/NH ₃ (86:13:1:0,12)
Injektionsvolumen	100 µL
Flussrate	1000 µL/min
Scanbereich	m/z 350 – 1100
Scanzeit	1 sec
IS	4800 V (positive Ionisation)
TEM	350 °C
Konditionierung	60 min.

Die Elution erfolgt mit Hilfe eines Gradienten (Tab. 14) und es werden drei Fraktionen gesammelt.

Um die bei der Fraktionierung entstandenen Salze von den Lipiden abzutrennen werden die Proben mittels Flüssig/Flüssig – Extraktion extrahiert. Dazu werden die Fraktionen auf ~1/3 des ursprünglichen Volumens eingengt, mit 15 mL CHCl₃/H₂O bidest. 2:1 versetzt und ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Phase mittels Pipette abgehoben und diese wird nochmals mit 5 mL CHCl₃ extrahiert. Nachdem die wässrige Phase von der CHCl₃ - Phase getrennt wurde, werden die beiden organischen Phasen vereint und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 100 µL CHCl₃/MeOH 1:1 aufgenommen und mittels FT - MS vermessen.

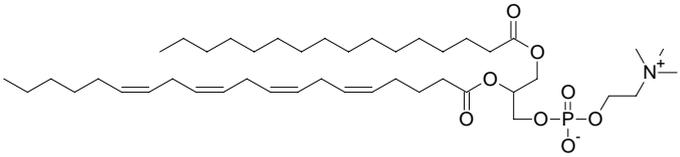
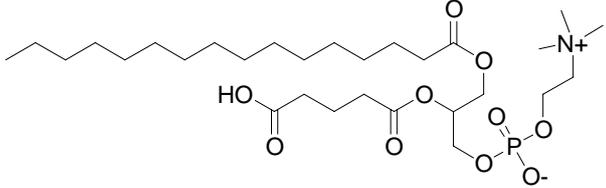
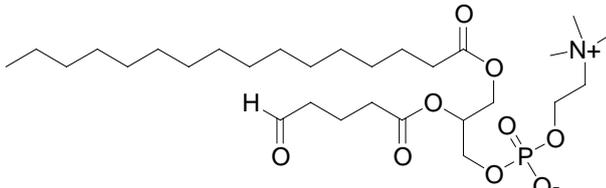
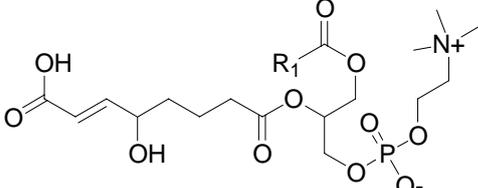
Tabelle 19: FT – MS - Methode

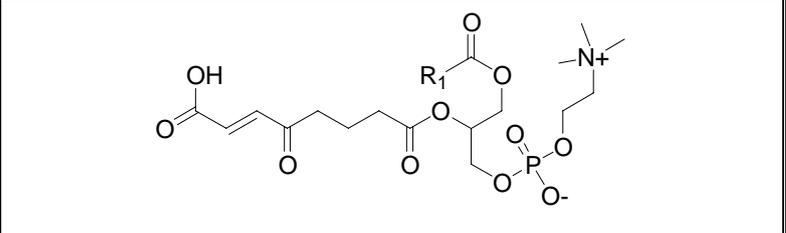
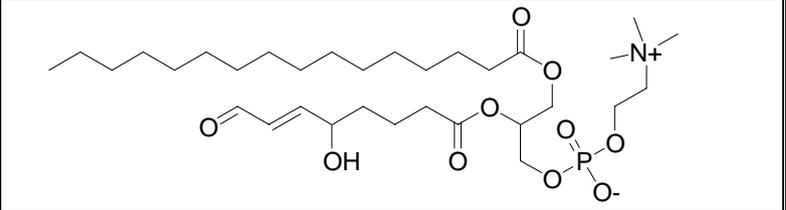
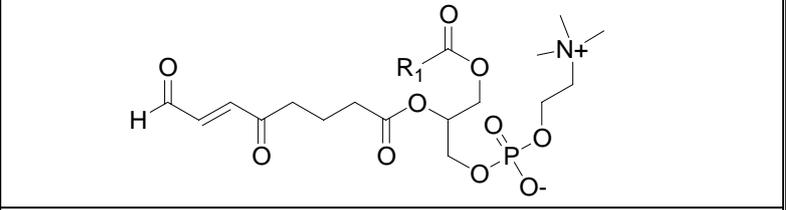
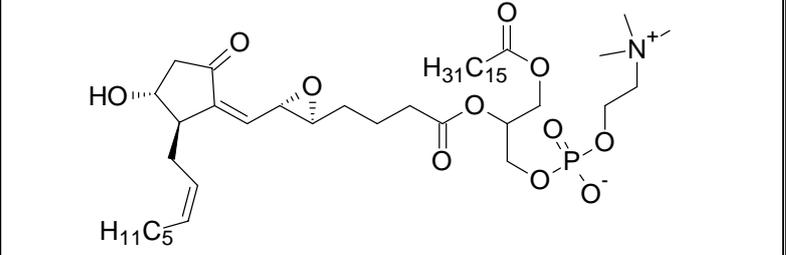
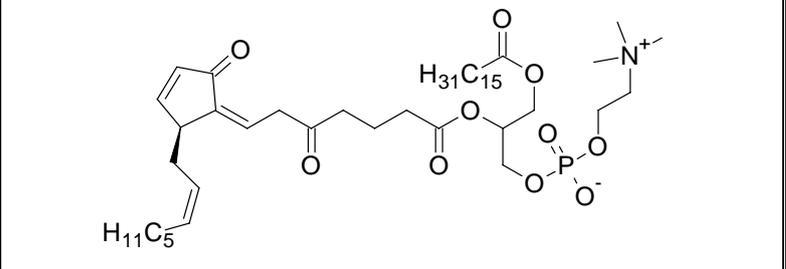
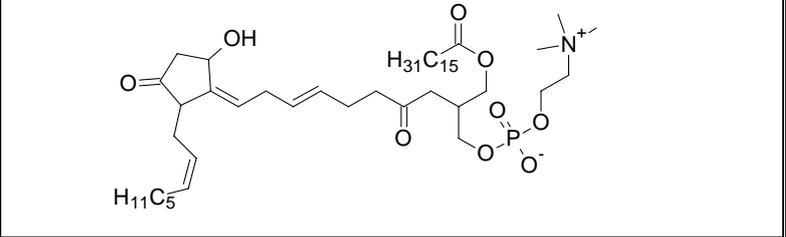
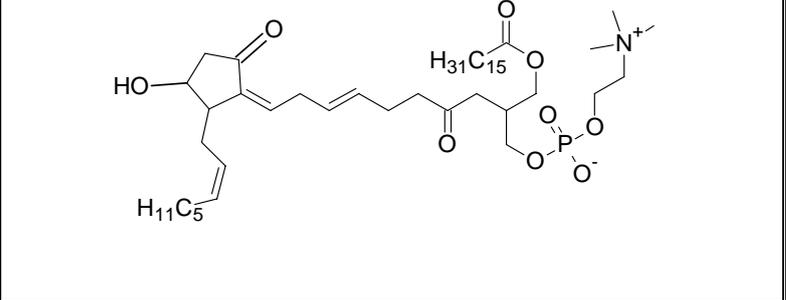
Parameter	Einstellungen
Stationäre Phase	RP-C18; 100 mm x 1 mm i.d. 1.9 µm particle size
Mobile Phase	A: H ₂ O/10 mM Ammoniumformiat/0.1 % HCOOH B: Acetonitril/2-Propanol (5:2) HCOOH (0.1%), Ammoniumformiat (10mM)
Injektionsvolumen	5 µL
Flussrate	250 µL/min
Scanbereich	m/z 400 – 1050
IS	5000 V (positive Ionisation)
TEM	250°C

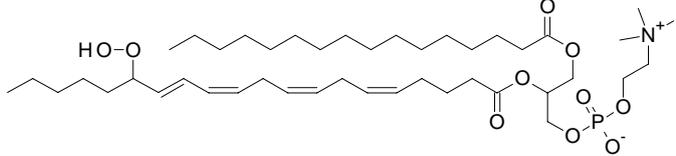
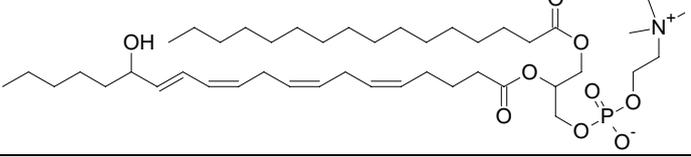
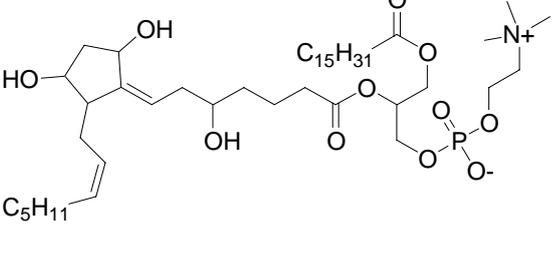
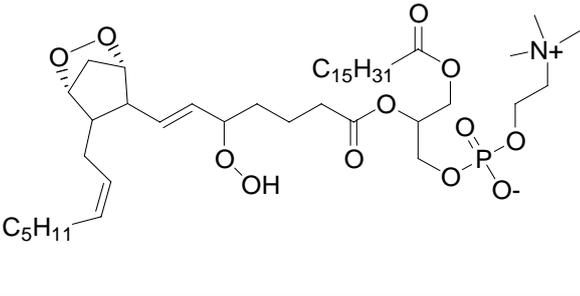
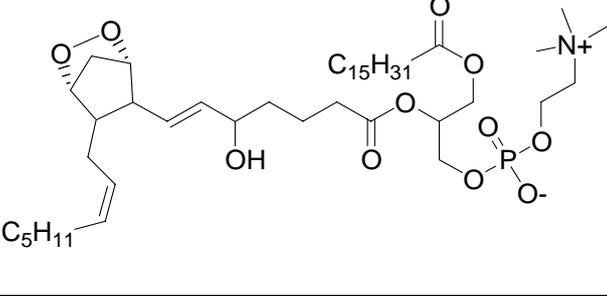
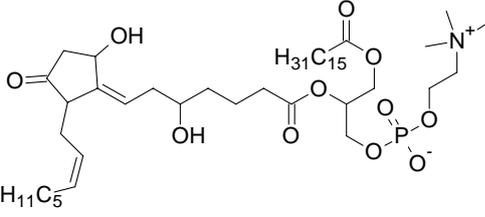
5.3.1 Ergebnisse und Diskussion:

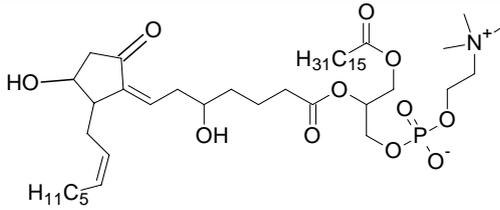
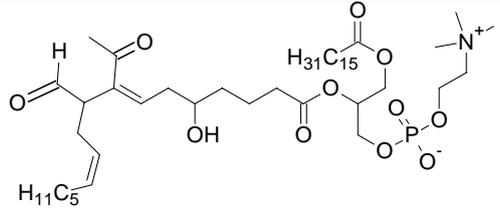
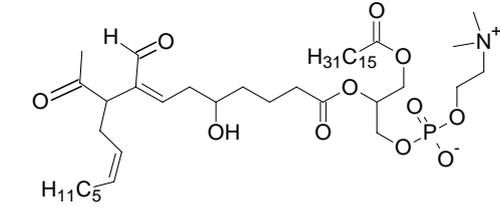
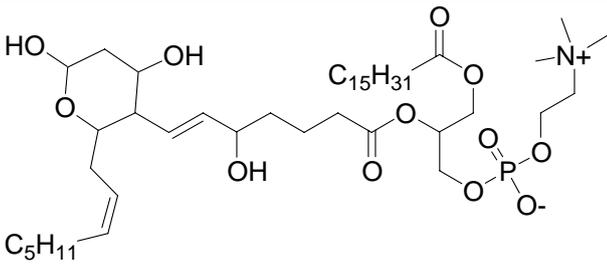
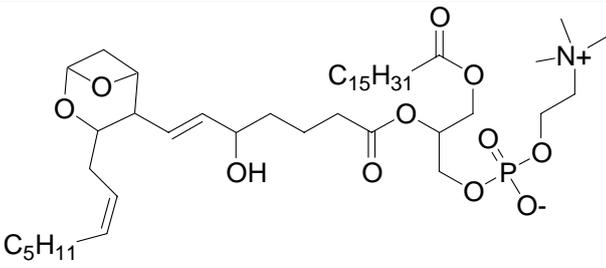
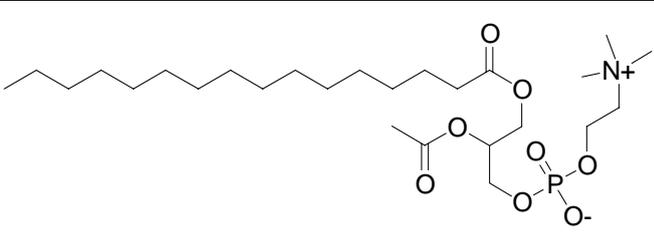
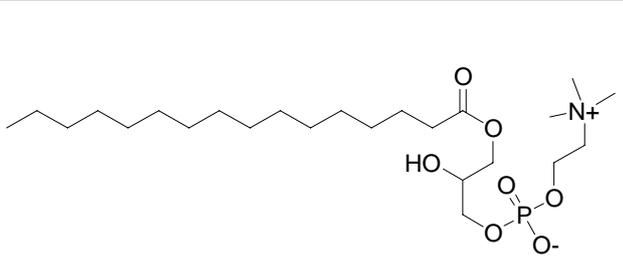
Im positiven Modus werden die Quasimoleküle $[M+H]^+$ detektiert. Die Massengenauigkeit beträgt +/- 5 ppm. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Oxidationsprodukte, die nach Autoxidation der Arachidonsäure von PAPC gefunden werden konnten:

Tabelle 20: Exakte Massen, Summenformeln und Strukturen [9] der oxidierten PL

ox. PAPC Spezies	Summenformel	exakte Massen [g* mol^{-1}]	Strukturvorschläge
<i>PAPC</i>	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	781,56211	
<i>PGPC</i>	C ₂₉ H ₅₆ NO ₁₀ P	609,36413	
<i>POVPC</i>	C ₂₉ H ₅₆ NO ₉ P	593,36922	
<i>HOdiA-PC</i>	C ₃₂ H ₆₀ NO ₁₁ P	665,39034	

ox. P APC Spezies	Summenformel	exakte Massen [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Strukturvorschläge
<i>KOdiA-PC</i>	$\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{NO}_{11}\text{P}$	663,37469	
<i>HOOA-PC</i>	$\text{C}_{32}\text{H}_{60}\text{NO}_{10}\text{P}$	649,39543	
<i>KOOA-PC</i>	$\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{NO}_{10}\text{P}$	647,37978	
<i>5,6-PEIPC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{NO}_{11}\text{P}$	827,53119	
<i>5,6-PECPC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{NO}_{10}\text{P}$	809,52063	
<i>5-isoPGJ₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{NO}_{10}\text{P}$	811,53628	
<i>5-isoPGA₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{NO}_{10}\text{P}$	811,53628	

ox. PACP Spezies	Summen- formel	exakte Massen [g* mol^{-1}]	Strukturvorschläge
<i>15-HPETE-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{10}\text{P}$	813,55193	
<i>15-HETE-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_9\text{P}$	797,55702	
<i>5-isoPGF₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{NO}_{11}\text{P}$	831,56249	
<i>5-isoPGG₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{12}\text{P}$	845,54175	
<i>5-isoPGH₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{11}\text{P}$	829,54684	
<i>5-isoPGD₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{11}\text{P}$	829,54684	

ox. PAPC Spezies	Summenformel	exakte Massen [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Strukturvorschläge
<i>5-isoPGE₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{11}\text{P}$	829,54684	
<i>isoLGE₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{11}\text{P}$	829,54684	
<i>isoLGD₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{11}\text{P}$	829,54684	
<i>isoTxA₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{NO}_{12}\text{P}$	847,55740	
<i>isoTxB₂-PC</i>	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_{11}\text{P}$	829,54684	
<i>PAF</i>	$\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{P}$	521,34810	
<i>Lyso PAF</i>	$\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{P}$	495,33245	

ox. PAPC Spezies	Summenformel	exakte Massen [g* mol^{-1}]	Strukturvorschläge
<i>C</i> ₂₈ <i>H</i> ₅₈ <i>O</i> ₇ <i>NP</i>	C ₂₈ H ₅₈ NO ₇ P	551,39505	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₀ <i>H</i> ₅₆ <i>O</i> ₉ <i>NP</i>	C ₃₀ H ₅₆ NO ₉ P	605,36922	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₀ <i>H</i> ₅₈ <i>O</i> ₉ <i>NP</i>	C ₃₀ H ₅₈ NO ₉ P	607,38487	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₁ <i>H</i> ₅₈ <i>O</i> ₉ <i>NP</i>	C ₃₁ H ₅₈ NO ₉ P	619,38487	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₁ <i>H</i> ₆₀ <i>O</i> ₉ <i>NP</i>	C ₃₁ H ₆₀ NO ₉ P	621,40052	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₂ <i>H</i> ₆₂ <i>O</i> ₉ <i>NP</i>	C ₃₂ H ₆₂ NO ₉ P	635,41617	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₃ <i>H</i> ₆₂ <i>O</i> ₉ <i>NP</i>	C ₃₃ H ₆₂ NO ₉ P	647,41617	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₃₃ <i>H</i> ₆₂ <i>O</i> ₁₀ <i>NP</i>	C ₃₃ H ₆₂ NO ₁₀ P	663,41108	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₄₄ <i>H</i> ₇₈ <i>O</i> ₁₁ <i>NP</i>	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₁ P	827,53119	kein Strukturvorschlag vorhanden
<i>C</i> ₄₄ <i>H</i> ₇₈ <i>O</i> ₁₃ <i>NP</i>	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₃ P	859,52101	kein Strukturvorschlag vorhanden

Zur weiteren Identifizierung der Oxidationsprodukte werden zusätzlich Produktionenspektren sowohl nach positiver als auch nach negativer Ionisation aufgenommen (Ergebnisse siehe Tab. 21 und 22). Der Vorteil der negativen Ionisation besteht darin, dass nach Fragmentierung des oxidierten Phospholipids die exakte Masse der durch Oxidation modifizierten Fettsäure detektiert werden kann. Zur Aufnahme der Produktionenspektren werden innerhalb einer gewissen Zeitspanne nur jene Moleküle fragmentiert, die während dieser Zeiteinheit die fünf größten Intensitäten aufweisen. Der Nachteil hier ist, dass dadurch nicht für alle Oxidationsprodukte Produktionenspektren vorliegen.

Tabelle 21: Typische Fragmente bei MS/MS - Experimenten nach positiver Ionisation

Masse [g* mol^{-1}]	Fragment	ox. PAPC Spezies, bei welcher das Fragment gefunden wurde
184.00	Cholin - Kopfgruppe	gefunden bei allen Oxidationsprodukten mit $m/z < 846$
478.30	[M+H] ⁺ ohne oxidierte, protonierte Fettsäure	Lyso-PAPC, POVPC, HOOA-PC, HOdiA-PC, 15-HETE-PC, 5,6-PECPC, 5,6-PEIPC, 5-iso PGD ₂ -PC, 5-iso PGE ₂ -PC, 5-iso PGH ₂ -PC, 5-iso PGG ₂ -PC, iso-LGE ₂ -PC, iso-LGD ₂ -PC, isoTxA ₂ -PC, isoTxB ₂ -PC, C ₃₀ H ₅₈ NO ₉ P, C ₃₁ H ₆₀ NO ₉ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₃ P
496.30	[M+H] ⁺ - [R=C=O]	HOOA-PC, HOdiA-PC, 15-HETE-PC, 5,6-PECPC, 5,6-PEIPC, 5-iso PGD ₂ -PC, 5-iso PGE ₂ -PC, 5-iso PGH ₂ -PC, 5-iso PGG ₂ -PC, iso-LGE ₂ -PC, iso-LGD ₂ -PC, isoTxA ₂ -PC, isoTxB ₂ -PC, C ₃₁ H ₆₀ NO ₉ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₂ P

Weiters können im positiven Modus nach CID Fragmente gefunden werden, die auf Verlust der Palmitinsäure und/oder eines bzw. zwei Wassermoleküle, je nach Anzahl der an die Arachidonsäure addierten Sauerstoffatome, hinweisen.

20100820_Ox-PAPC-NP-Fraktion2 #36-2079 RT: 4.45-4.50 AV: 2 SM: 7G NL: 2.09E2
 F: ITMS + p ESI d Full ms2 650.40@cid35.00 [130.00-665.00]

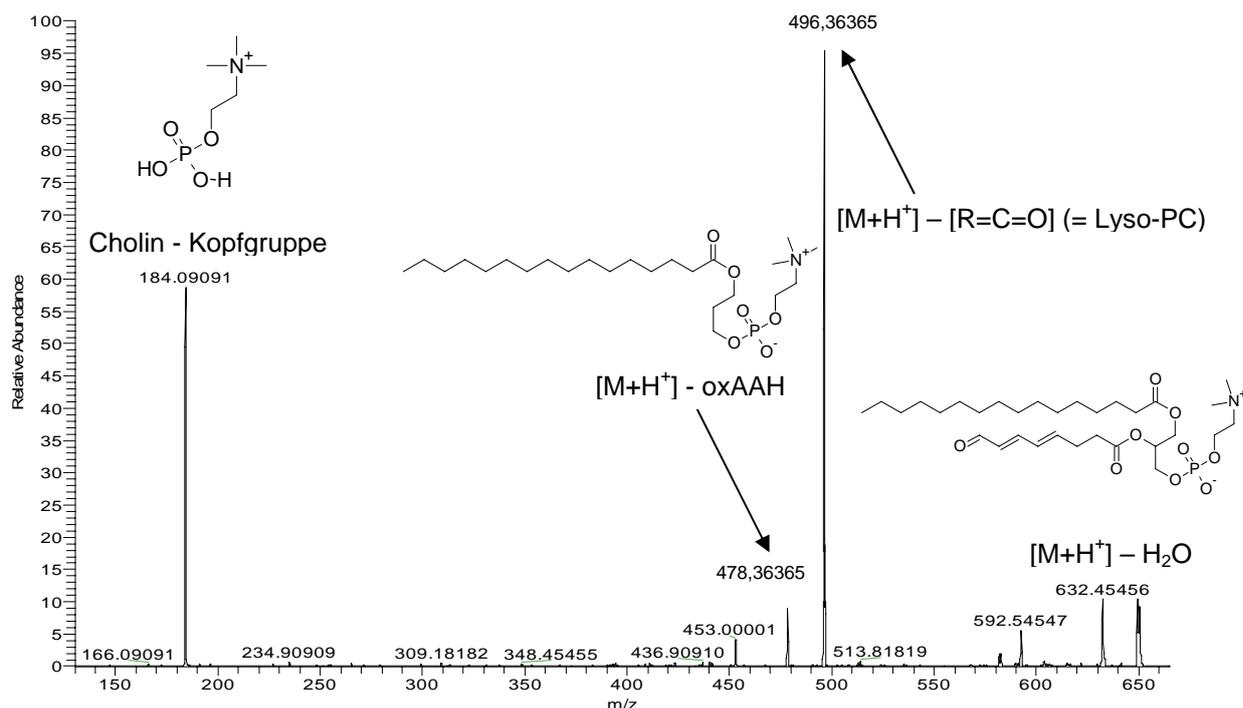
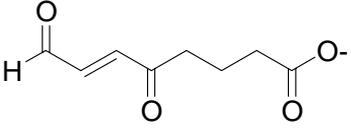
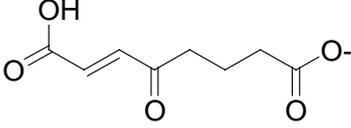
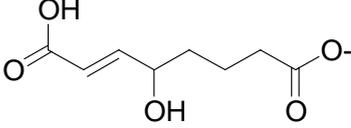
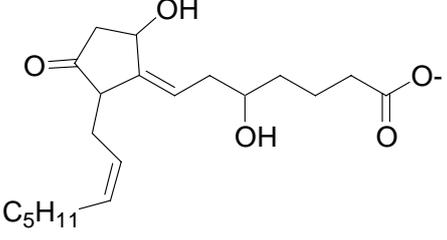
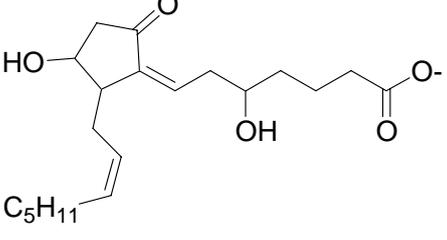
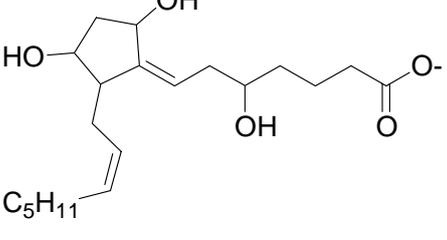
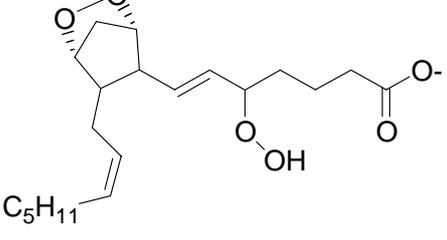
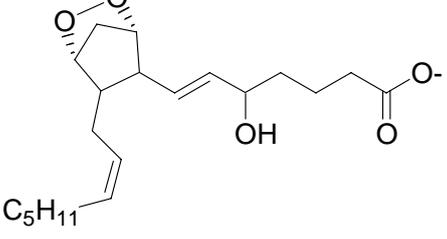


Abbildung 50: Beispiel eines Produktionenspektrums (positive Ionisation, HOOA – PC)

Tabelle 22: Typische Fragmente bei MS/MS - Experimenten nach negativer Ionisation

Masse [g*mol ⁻¹]	Fragment	ox. PAPC Spezies, bei welcher das Fragment gefunden wurde
255.20	[C ₁₆ H ₃₁ O ₂] ⁻ (= ionisierte Palmitinsäure)	Lyso-PAPC, POVPC, PGPC, KOOA-PC, HOOA-PC, KODiA-PC, HODiA-PC, 15-HETE-PC, 5,6-PEIPC, 5-iso PGD ₂ -PC, 5-iso PGF ₂ -PC, 5-iso PGE ₂ -PC, 5-iso PGH ₂ -PC, 5-iso PGG ₂ -PC, iso-LGE ₂ -PC, iso-LGD ₂ -PC, isoTxA ₂ -PC, isoTxB ₂ -PC, C ₃₀ H ₅₆ NO ₉ P, C ₃₁ H ₅₈ NO ₉ P, C ₃₁ H ₆₀ NO ₉ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₁ P
480.30	Lyso - PC bei welchem eine Methylgruppe von der Cholin - Kopfgruppe abgespalten wurde	Lyso-PAPC, PGPC, KOOA-PC, HOOA-PC, KODiA-PC, 5,6-PECPC, 15-HETE-PC, 5,6-PEIPC, 5-iso PGG ₂ -PC, isoTxA ₂ -PC, C ₃₀ H ₅₆ NO ₉ P, C ₃₁ H ₅₈ NO ₉ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₁ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₃ P
	[ox. AA] ⁻ bzw. [ox. AA - H ₂ O] ⁻	KOOA-PC, KODiA-PC, HODiA-PC, 5-iso PGD ₂ -PC, 5-iso PGE ₂ -PC, 5-iso PGH ₂ -PC, iso-LGE ₂ -PC, iso-LGD ₂ -PC, isoTxB ₂ -PC, 5-iso PGF ₂ -PC, 5-iso PGG ₂ -PC, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₃ P
	[M+HCOO] ⁻ - m/z 60 (= - [HCOO ⁻ + CH ₃])	POVPC, KOOA-PC, HOOA-PC, HODiA-PC, 15-HETE-PC, 15-HPETE-PC, 5,6-PEIPC, 5-iso PGD ₂ -PC, 5-iso PGE ₂ -PC, 5-iso PGH ₂ -PC, 5-iso PGG ₂ -PC, isoTxA ₂ -PC, iso-LGE ₂ -PC, iso-LGD ₂ -PC, C ₃₀ H ₅₈ NO ₉ P, C ₃₁ H ₆₀ NO ₉ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₁ P, C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₃ P
	[M+HCOO] ⁻ - C ₃ H ₉ N	PGPC, KODiA-PC, C ₃₁ H ₅₈ NO ₉ P

Tabelle 23: Modifizierte Fettsäurefragmente nach negativer Ionisation (FT-MS)

Bezeichnung	Masse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Summenformel	Strukturvorschläge
<i>KOOA-PC</i>	169.05007	$[\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_4]^-$	
<i>KODiA-PC</i>	185.04498	$[\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_5]^-$	
<i>HODiA-PC</i>	187.06063	$[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$	
<i>5-isoPGD2-PC</i>	351.21712	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5]^-$	
<i>5-isoPGE2-PC</i>	351.21712	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5]^-$	
<i>5-isoPGF2-PC</i>	353,23278	$[\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_5]^-$	
<i>5-isoPGG2-PC</i>	367,212037	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_6]^-$	
<i>5-isoPGH2-PC</i>	351.21712	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5]^-$	

Bezeichnung	Masse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Summenformel	Strukturvorschläge
<i>5-isoLGD₂-PC</i>	351.21712	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5]^-$	
<i>5-isoLGE₂-PC</i>	351.21712	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5]^-$	
<i>isoTxB₂-PC</i>	351.21712	$[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5]^-$	

20100820_Ox-PAPC-NP-Fraktion2 #293-1059 RT: 2.75-6.28 AV: 8 SM: 7G NL: 1.74E1
 F: ITMS - p ESI d Full ms2 664.38@cid35.00 [135.00-675.00]

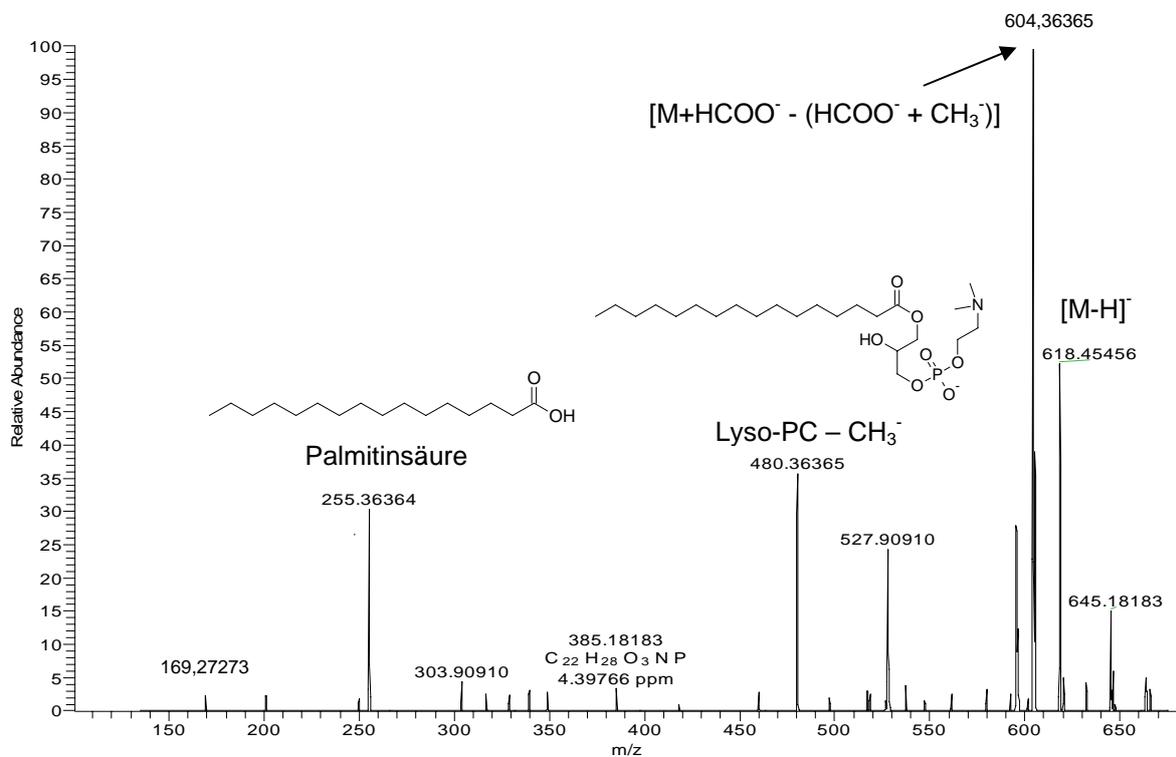


Abbildung 51: Beispiel eines Produktionenspektrums (negative Ionisation, $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_9\text{NP}$,
 m/z 619.38487)

Nach CID im negativen Modus können für die Oxidationsprodukte, die durch Sauerstoffaddition entstanden sind zum Großteil die Massen der oxidierten Fettsäuren detektiert werden. Dabei werden für die meisten Oxidationsprodukte die Massen der Quasimolekülonen $[M+HCOO]^-$ erhalten. Jene modifizierten Fettsäuren mit $m/z < 160$ können allerdings nicht nachgewiesen werden, da Ionen erst ab $m/z 160$ gescannt werden. Weiters können für die Fettsäuren der Oxidationsprodukte mit den größeren Massen als die ursprüngliche Arachidonsäure, welche Hydroxyl-, Peroxylgruppen etc. beinhalten, im negativen Modus auch Massen detektiert werden, die auf einen Wasserverlust hinweisen.

Zusätzlich ist für die meisten der Analyten im Produktionenspektrum im negativen Modus ein Fragment mit einem Massenverlust von $m/z 59$ bzw. $m/z 60$ vorhanden. Bei dem Neutralverlust mit $m/z 59$ könnte es sich um Trimethylamin handeln, bei einem Massenverlust von $m/z 60$ handelt es sich um den Verlust von $HCOO^-$ und CH_3^- .

Jene oxidierten PAPC – Spezies deren modifizierte Arachidonsäure Carboxylgruppen (PGPC, KOdiA-PC, HOdiA-PC aber auch 5-iso-PGG₂-PC mit einer Peroxylgruppe) beinhalten, können jedoch auch in Form von $[M-H]^-$ nachgewiesen werden, wobei die Empfindlichkeit für diese Spezies hierbei deutlich besser ist als in Form des Quasimolekülonen $[M+HCOO]^-$. Allgemein ist die negative Ionisation von Phospholipiden weniger begünstigt als die positive, weshalb geringere Intensitäten bei der Ermittlung der exakten Massen im negativen Modus zu erwarten wären. In diesem Fall konnte das nicht beobachtet werden da die Peaks der

Fragmentionen nach CID sowohl im positiven als auch im negativen Modus ähnliche Intensitäten aufweisen.

5.4 Bestimmung der Oxidationsprodukte der Arachidonsäure in LDL:

Die zuvor entwickelte HPLC/MS – Methode (Abschnitt 5.2) soll nun zur Analyse einer realen Probe herangezogen werden. Ziel ist die Identifizierung der Oxidationsprodukte von in vitro oxidiertem und unoxidiertem LDL aus menschlichem Plasma, sowie ein Vergleich der Oxidationsprodukte, die nach Anwendung von zwei unterschiedlichen in vitro Oxidationsmethoden entstehen. Außerdem sollen Oxidationsprodukte in nativem LDL identifiziert werden.

Es werden ca. 1.6 mL LDL – Fraktion aus menschlichem Plasma nach Ultrazentrifugation erhalten und dieses wird über Nacht gegen 600 mL PBS – Puffer in einem Eisbad dialysiert.

Das dialysierte LDL wird in ein Vial gefüllt, mit N₂ überschichtet und bis zur Verwendung bei 4°C zwei Wochen im Dunklen gelagert.

5.4.1 Probenvorbereitung:

Jede der folgenden Probenvorbereitungsarten wird drei Mal durchgeführt:

1. Oxidation von LDL mit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:

Es werden 1,99 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 10 mL PBS-Puffer gelöst und dieses wird 1:1 verdünnt.

250 μL dialysiertes LDL werden mit 650 μL PBS – Puffer und 100 μL der Kupfersulfatlösung versetzt so dass die Konzentration von CuSO_4 (ohne Kristallwasser) im Reaktionsansatz 40 μM beträgt. Dieser Reaktionsansatz wird bei 37°C 25 Stunden im Thermomixer oxidiert. Die Reaktionsgefäße werden dazu nur mit einer Alufolie abgedeckt, um eine Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Die Oxidation wird durch Zugabe von 2 mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 abgebrochen und die Lipide werden 10 min. am Überkopfschüttler extrahiert. Der Probe werden 1,25 mL H_2O bidest. zugefügt und diese wird nochmals 10 min. am Überkopfschüttler extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wird die Mischung zentrifugiert (3000 rpm, 3 min. bei 20°C). Die organische Phase wird in ein neues Gefäß überführt und die wässrige Phase wird nochmals wie zuvor extrahiert.

Die organischen Phasen werden vereint, bis zur Trockene eingengt, in 200 μL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 aufgenommen und bis zur Analyse bei -80°C im Dunklen gelagert [5, 8].

2. Autoxidation einer LDL - Probe:

250 μL dialysiertes LDL werden bei 37°C im Thermorüttler 43 h an Luftsauerstoff oxidiert. Um Kontaminationen zu vermeiden wird das Reaktionsgefäß lediglich mit einer perforierten Folie abgedeckt.

Die Oxidation wird durch Zugabe von 2 mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 abgebrochen und die Extraktion erfolgt 10 min. am Überkopfschüttler bevor 1,25 mL H_2O bidest. zugegeben werden und die Lösung abermals

10 min. am Überkopfschüttler extrahiert wird. Die wässrige Phase wird von der organischen Phase getrennt und nochmals nach obigem Procedere extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, bis zur Trockene eingengt, in 200 μL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 aufgenommen und bis zur Analyse bei -80°C im Dunkeln gelagert [8, 10].

3. Natives LDL:

Es werden 1 mL LDL direkt nach Ultrazentrifugation nach der Methode von Folch extrahiert. Dazu werden dem LDL 4 mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 und 1,25 mL H_2O bidest. zugegeben und 10 min. am Überkopfschüttler extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wird das 2 - Phasengemisch zentrifugiert (3000 rpm, 3 min. 20°C). Die organische Phase wird in ein frisches Gefäß überführt und die wässrige Phase wird nochmals wie zuvor extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, bis zur

Trockene eingengt, in 200 μL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1 aufgenommen und bei -80°C im Dunkeln bis zur Analyse gelagert [8].

5.4.2 Optimierung des ESI – Triple – Quadrupol – Systems:

Die Optimierung der ESI – MS/MS – Parameter ist für die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit bei der Analyse von oxidierten Phospholipiden von großer Bedeutung. Um eine bestmögliche Sensitivität zu erreichen, müssen die substanzspezifischen Parameter der Analyten ermittelt werden. Dazu können zahlreiche Parameter der AB 4000 Q TrapTM verändert und optimiert werden.

Diese Parameter können zunächst in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1. *Source Parameter:*

Diese hängen von chromatographischen Bedingungen wie Laufmittel, Flussrate, etc. ab und werden deshalb für die jeweiligen Bedingungen optimiert. Zu den Source Parametern zählen:

- Gas 1 (GS1): Dabei handelt es sich um das Nebulizer – Gas, mit Hilfe dessen die Probe zerstäubt wird.
- Gas 2 (GS2): Wird auch als Hilfgas bezeichnet, mit dem die zuvor erzeugten Tröpfchen getrocknet werden, damit keine Lösungsmittel in das MS/MS – System gelangt.
- Temperatur (TEM): Dieser Parameter kontrolliert die Temperatur der TurboIonSprayTM – Quelle und dient dazu, das Lösungsmittel der Probenröpfchen zu verdampfen und die Analytionen in die Gasphase zu überführen.
- Ion Spray Voltage (IS): Mit dieser Spannung, die an der Nadel anliegt, erfolgt die Ionisation der Analyten.
- Curtrain Gas (CUR): Der Gasfluss zwischen Curtain – Plate und Orifice verhindert die Kontamination der Ionenoptik durch Lösungsmitteltropfen.

2. *Compound Parameter:*

Diese Parameter sind Analytabhängig und unabhängig von den LC – Bedingungen, weshalb zur Optimierung die Technik der Probeneinbringung unwesentlich ist. Zu den Compound Parametern zählen:

- Declustering Potential (DP): Potentialdifferenz zwischen Q0 und Orifice; notwendig um Clusterbildung der Analytionen zu vermeiden. Ist dieses Potential zu hoch gewählt, kann es zu Fragmentierungen der Probe kommen.
- Entrance Potential (EP): Zur Fokussierung der Ionen durch den Q0 – Hochdruckbereich.

- Collision Energy (CE): Die Potentialdifferenz zwischen Q0 und Q2 kontrolliert den Energiebetrag den die Vorläuferionen nach Beschleunigung in die Kollisionszelle erhalten (für MS/MS – Experimente).
- Collision Cell Exit Potential (CXP): Zur Fokussierung und Beschleunigung der Ionen aus der Kollisionszelle (Q2).

Tabelle 24: Optimierte Normalphasenmethode für LDL

Parameter	Einstellungen
Injektionsvolumen	5 µL
Flussrate	150 µL/min
Scanbereich	m/z 350 – 1100
CUR	10.0
IS	5000 V (positive Ionisation)
TEM	600 °C
GS1/GS2	20.0/55.0
Konditionierung	50 min.

Tabelle 25: Optimierte Werte der MRM - Übergänge für oxidierte Phospholipide in LDL

Synonym	Masse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	DP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]
KOOA	647.38	121	10	39	14
HODAPC	705.46	61	10	45	14
KDdiAPC	719.44	86	10	43	14
HDdiAPC	721.45	86	10	45	10
PECPC	809.52	66	10	51	12
isoPGA ₂ _J ₂	811.54	141	10	49	16
PEIPC	827.53	146	10	51	14
isoLG_PG_Tx	829.55	86	10	53	12
isoPGG ₂	845.54	86	10	49	14
isoFuran_TxA ₂	847.56	56	10	49	14

5.4.3 HPLC – MS/MS – Analyse der LDL Proben:

Die zuvor hergestellten LDL – Proben werden sowohl im Full Scan (Prec. 184) als auch mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) detektiert. Dieses wird für jede Oxidationsmethode drei Mal durchgeführt. Ein Vorteil der MRM – Analyse gegenüber der Bestimmung der exakten Masse mittels FT – MS ist die höhere Sensitivität. Ein Nachteil in der Detektion mittels MS/MS besteht darin, dass nicht die exakten Massen erhalten werden. Da die Detektion nicht sehr spezifisch ist, müssen zur Identifizierung auch die Retentionszeiten der unterschiedlichen Substanzen verglichen werden. Auf Grund dessen handelt es sich bei den Massen 647.4, 719.4 und 721.5 wahrscheinlich nicht um oxidiertes PAPC, da die Retentionszeit nicht übereinstimmt.

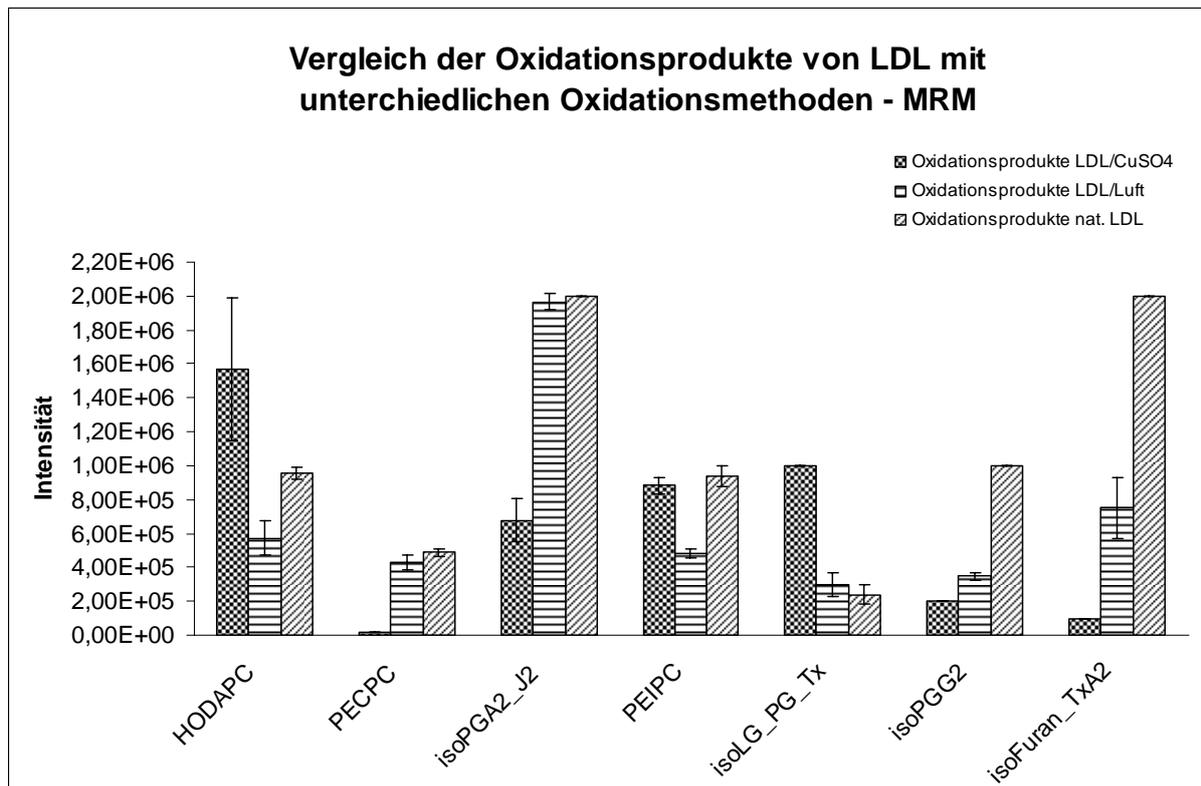


Abbildung 52: Vergleich der Ergebnisse der MRM – Analysen

Abbildung 52 gibt einen Vergleich der Intensitäten ausgewählter Oxidationsprodukte der *in vitro* oxidierten und der natürlichen LDL – Proben. Im Full Scan ist ersichtlich, dass bei der Oxidationsmethode mit Cu^{2+} als Katalysator deutlich mehr und vor allem kurzkettenige Oxidationsprodukte entstanden sind, wohingegen bei den beiden anderen Proben weniger Oxidationsprodukte detektiert werden können, und diese überwiegend zu der langkettigen Klasse gehören (siehe Tab. 27).

5.4.4 HPLC – FT – MS – Analyse der LDL Proben:

Die in Abschnitt 5.4.1 hergestellten Proben werden mittels FT – MS auf Oxidationsprodukte von PAPC untersucht. Jede Probe wird drei Mal vermessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt mit Xcalibur 2.0.7.

Tabelle 26: HPLC-FT-MS Methode zur Bestimmung der Oxidationsprodukte in LDL

Parameter	Einstellungen
Stationäre Phase	RP-C18; 100 mm x 1 mm i.d., 1.9 µm particle size
Mobile Phase	A: H ₂ O/10 mM Ammoniumacetat/0.1 % HCOOH B: Acetonitril/2-Propanol (5:2) HCOOH (0.1%), Ammoniumacetat (10mM)
Injektionsvolumen	5 µL
Flussrate	250 µL/min
Scanbereich	m/z 400 – 1050
IS	5000 V (positive Ionisation)
TEM	250°C

Tabelle 27: Gefundene Oxidationsprodukte – Vergleich der Oxidationsmethoden (FT – MS)

Synonym	Summenformel	M [g*mol ⁻¹]	ox. LDL/CuSO ₄	ox. LDL/Luft	nat. LDL
Lyso-PC	C ₂₄ H ₅₀ O ₇ NP	495,33245	√	√	√
POVPC	C ₂₉ H ₅₆ O ₉ NP	593,36694	√	-	-
KHdiAPC	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₁ NP	635,34339	√	-	-
PONPC	C ₃₃ H ₆₄ O ₉ NP	649,43182	√	-	-
HODAPC	C ₃₆ H ₆₈ O ₁₀ NP	705,45803	√	-	-
HETE-PC	C ₄₄ H ₈₀ O ₉ NP	797,55702	√	√	√
PECPC	C ₄₄ H ₇₆ O ₁₀ NP	809,52063	√	√	√
isoPGA ₂ _J ₂	C ₄₄ H ₇₈ O ₁₀ NP	811,53628	√	-	√
HPETE-PC	C ₄₄ H ₈₀ O ₁₀ NP	813,55193	√	√	√
PEIPC	C ₄₄ H ₇₈ O ₁₁ NP	827,53119	√	-	√
isoLG_PG_TxB ₂	C ₄₄ H ₈₀ O ₁₁ NP	829,54684	√	-	-
isoPGF ₂	C ₄₄ H ₈₂ O ₁₁ NP	831,56249	√	√	√
isoPGG ₂	C ₄₄ H ₈₀ O ₁₂ NP	845,54175	√	-	-
isoFuran_TxA ₂	C ₄₄ H ₈₂ O ₁₂ NP	847,55740	√	-	-

Einen Überblick über die gefundenen Oxidationsprodukte von PAPC gibt Tabelle 26, wobei (√) bedeutet, dass diese Verbindung in der Probe vorhanden ist und (-), dass die jeweilige Verbindung nicht detektiert werden kann. Die Strukturen der einzelnen Oxidationsprodukte sind in Abschnitt 5.3.1 in Tabelle 20 abgebildet.

Die Massen der einzelnen Analyten werden mit einer Massengenauigkeit von +/- 5 ppm bestimmt. Zusätzlich werden die Produktionenspektren der einzelnen Verbindungen auf charakteristische Fragmente hin untersucht. Eine Massengenauigkeit von +/- 5 ppm ist in den Produktionenspektren allerdings nicht mehr gegeben, wodurch die Summenformeln der Fragmentationen nicht bestimmt werden können.

20101126-LDL-nat-1 #652-746 RT: 10.54-11.68 AV: 4 SM: 7G NL: 4.24E1
 F: ITMS + p ESI d Full ms2 798.56@cid35.00 [165.00-810.00]

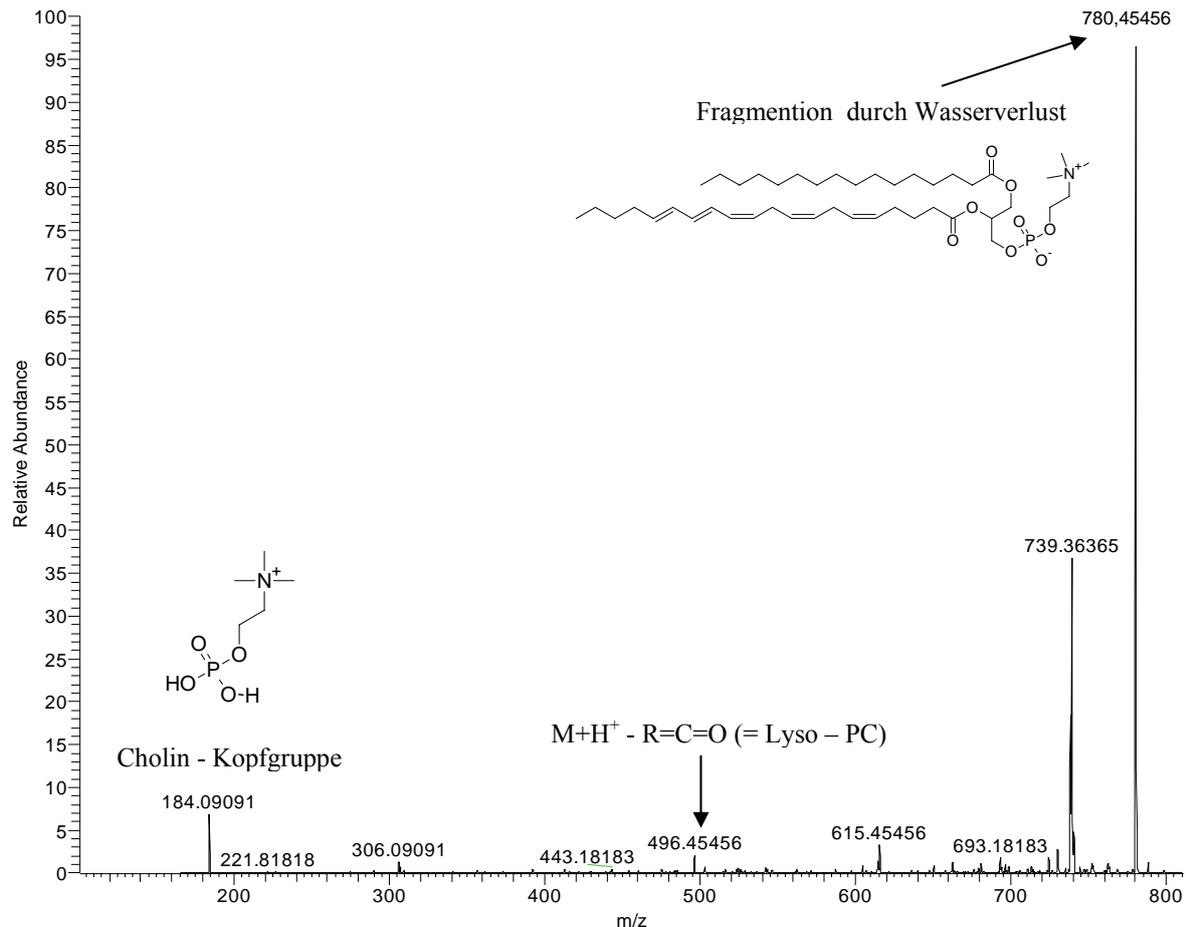


Abbildung 53: Beispiel eines Produktionenspektrums [HETE – PC (FT – MS – Messung)]

Wie erwartet, können in der LDL – Probe nach in vitro Oxidation mit CuSO_4 am meisten Oxidationsprodukte nachgewiesen werden.

Auf den ersten Blick scheint verwunderlich, dass bei der natürlichen LDL – Probe mehr Oxidationsprodukte der Arachidonsäure gefunden werden, als bei der an Luftsauerstoff oxidierten Probe. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass einige Oxidationsprodukte, die in natürlichem LDL detektiert werden, Zwischenstufen darstellen. Ein Beispiel dafür ist das PEIPC, aus dem durch Wasserverlust PECPC entsteht (siehe Abschnitt 2.5, Abb. 5 – Reaktionsschema der Radikalinduzierten Oxidation von PAPC). Eine weitere mögliche Erklärung ist die verminderte Sensitivität des FT – MS im Vergleich zum Triple – Quadrupol – System. Ein direkter Vergleich der Intensitäten der Massen der Oxidationsprodukte zwischen FT – MS und MS/MS ist auf Grund der geringen Spezifität der MS/MS – Messung nicht möglich.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass oxidativ veränderte Phospholipide in der Pathogenese unterschiedlicher Krankheiten wie Artherosklerose, Alzheimer, Parkinson, Diabetes, Krebs, etc. eine bedeutende Rolle spielen.

Auf Grund der strukturellen Vielfalt, der geringen Konzentrationen und der komplexen Probenmatrix gestaltet sich die Analytik dieser Substanzen äußerst schwierig.

Da die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) einige Vorteile im Vergleich zu anderen Analysenmethoden wie Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS) oder Immunassays bietet, gewinnt diese bei der Bestimmung von Markern für oxidativen Stress an immer größerer Bedeutung. Zu diesen Vorteilen zählen höhere Sensitivität, Spezifität und die Möglichkeit der Bestimmung mehrerer Analyten gleichzeitig. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass an LC-MS/MS Methoden Probenvorbereitungstechniken, wie z.B. Festphasenextraktion gekoppelt werden können. Außerdem bietet sich die Möglichkeit einer automatisierten 2-dimensionalen LC/LC – Methode gekoppelt mit Tandem – Massenspektrometrie.

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde eine PAPC – Standardsubstanz mit unterschiedlichen Oxidationsmethoden, u.A. der kupferinduzierten Lipidperoxidation und Oxidation an Luftsauerstoff, modifiziert. Mit Hilfe dieser oxidierten Standardsubstanz wurde eine geeignete HPLC – MS/MS Methode zur Abtrennung der Oxidationsprodukte der Arachidonsäure von unoxidierten Lipiden entwickelt wobei die Identifizierung der Analyten mit Hilfe des Vorläuferionenmodus m/z 184 erfolgte. Die chromatographische Auftrennung des Substanzgemisches wurde an vier unterschiedlichen stationären Phasen mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen im HILIC – Modus durchgeführt. Eine vollständige Abtrennung der oxidierten Phospholipide von den anderen Lipiden konnte allerdings nicht erzielt werden.

Des Weiteren wurden die Oxidationsprodukte von PAPC identifiziert, in dem die exakten Massen dieser mittels FT – ESI – MS bestimmt wurden. Um Suppressionseffekte bei der Ionisierung der Analyten so gering wie möglich zu halten, erfolgte die chromatographische Trennung 2-dimensional, d.h. die Trennung der Lipide erfolgte mit der zuvor entwickelten HILIC – Methode nach Kopfgruppen, gefolgt von einer Trennung mittels RP – UHPLC, bei welcher die Lipide der einzelnen Fraktionen nach der Länge ihrer Fettsäuren getrennt wurden. Die Ionisation erfolgte sowohl im positiven als auch im negativen ESI – Modus. Der Vorteil der positiven Ionisierung liegt darin, dass die Ionisationseffizienz für Phosphatidylcholine deutlich besser ist im Vergleich zum negativen Modus, ein Vorteil der negativen Ionisation dagegen ist, dass hier nach Fragmentierung die oxidierten Fettsäuren identifiziert werden können.

Schlussendlich sollte die Anwendbarkeit der im Rahmen dieser Masterarbeit entwickelten HILIC – MS/MS – Methode auf eine reelle Probe demonstriert werden. Dazu wurde in vitro oxidiertes und

natives LDL mit Hilfe dieser Methode auf Oxidationsprodukte von PAPC untersucht. Die *in vitro* Oxidation von LDL wurde dabei zum Vergleich mit zwei unterschiedlichen Oxidationsmethoden durchgeführt. Die HILIC – MS/MS – Analyse von LDL erfolgte im MRM – Modus, da hierbei eine größere Sensitivität erzielt werden konnte. Um das bestmöglich Ergebnis zu erhalten wurden dazu sämtliche Source- und Compound Parameter für die gewünschten Analyten optimiert. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass dabei nicht die exakten Massen der Analyten erhalten werden, wodurch sich eine Identifizierung der Oxidationsprodukte schwierig gestaltet, da in einer komplexen realen Probe wie LDL oft mehrere Substanzen mit *Prec. 184*, deren Massen sehr ähnlich sind, vorkommen können.

Des Weiteren wurden die exakten Massen der Oxidationsprodukte in LDL mit FT – MS bestimmt. Um den Verlust der Analyten in Grenzen zu halten wurde die Probe vorab nicht mit der HILIC – MS/MS Methode fraktioniert, sondern es wurde lediglich eine chromatographische Trennung mittels RP – UHPLC vorgenommen. Wie erwartet, konnte in der LDL – Probe, welche *in vitro* mit $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oxidiert wurde, am meisten Oxidationsprodukte detektiert werden, während bei der mit Luftsauerstoff oxidierten und der nicht oxidierten LDL – Probe eine geringere Anzahl von Oxidationsprodukten nachgewiesen werden konnte. Ein Nachteil bei dieser Analysenmethode liegt jedoch in der verringerten Sensitivität, wodurch viele Oxidationsprodukte, die in zu geringen Konzentrationen in der Probe enthalten sind, nicht detektiert werden können.

Die massenspektrometrische Analyse von oxidierten Phospholipiden nimmt bereits eine zentrale Rolle in der Lipidanalytik ein. Obwohl schon intensive Forschungsarbeit auf diesem Bereich geleistet wurde, sind noch viele Fragestellungen offen und erfordern einiges an Entwicklungsarbeit. Zukünftig sind weitere Verbesserungen auf diesem Gebiet, betreffend Probendurchsatz, Robustheit, niedrigeres LOD und LOQ zu erwarten. Außerdem ist eine detaillierte Kenntnis über die Veränderungen an Phospholipiden, welche durch oxidativen Stress induziert werden, wie die Einführung neuer funktioneller Gruppen und die genaue Position dieser innerhalb der Alkylkette essentiell für das Verständnis der biologischen Aktivität der oxidierten Spezies.

7. Chemikalien- und Geräteliste

Tabelle 28: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Firma
Acetonitril	Chromosolv	Sigma Aldrich, BRD
Ameisensäure 98 – 100 %	p.a.	Merck, Germany
Ammoniak 28 % in Wasser	≥ 99,99 %	Sigma Aldrich, USA
Ammoniumformiat	Puriss p.a.	Fluka, Germany
Chloroform	p.a.	Merck, Germany
Cyclohexan	LiChrosolv	Merck, BRD
CuSO ₄ *5 H ₂ O		
Methanol	Chromosolv	Sigma Aldrich, BRD
Methyl – tert – Butyl – Ether	for HPLC, 99,9%	Sigma Aldrich, BRD
Milli – Q – Wasser		
PBS – Puffer, pH 7.2 – 7.3		Apotheke LKH – Klinikum, Graz
2 – Propanol	Chromosolv	Fluka, BRD
Tetrahydrofuran	HPLC grade	Sigma Aldrich, BRD
1-hexadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-dieicosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-didocosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Standard	Avanti
1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecaenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Standard	Avanti
1-octadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	Standard	Avanti
1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphoserine	Standard	Avanti
1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecaenoyl)-sn-glycero-3-phosphoserine	Standard	Avanti
1-octadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1-eicosanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	Standard	Avanti
1,2-didodecanoyl-sn-glycerol	Standard	Avanti

1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,2-dioctadecanoyl-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,2,3-trihexadecanoyl-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,2-dihexadecanoyl-3-nonadecanoyl-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,2,3-trioctadecanoyl-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,3-dioctadecanoyl-2-(9Z-octadecaenoyl)-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,3-dioctadecanoyl-2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-sn-glycerol	Standard	Avanti
1,3-dioctadecanoyl-2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-sn-glycerol	Standard	Avanti
Sphingomyelin	Standard	Larodan

Tabelle 29: Liste der verwendeten Geräte

Verwendete Geräte
Agilent 1100 Series gekoppelt mit 4000 Q Trap TM MS/MS-System
Thermo Accela HPLC – System gekoppelt mit Thermo Scientific* LTQ FT Ultra MS
Nucleosil 100 – 5 OH, 250 x 3.0 mm i.d. HPLC - Säule
Nucleosil 100 – 5 OH, 250 x 10.0 mm i.d. HPLC - Säule
Betasil Silica – 100, 150 x 1.0 mm i.d., 5 µm i.d. HPLC – Säule
YMC Pack Amino, 150 x 3.0 mm i.d., 12 nm, S – 3 µm HPLC – Säule
YMC Pack PVA – SIL, 250 x 3.0 mm i.d., 12 nm, S – 5 µm
RP-C18; 100 mm x 1 mm i.d., 1.9 µm particle size, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA
Hanna Instruments pH 213 Microprocessor pH Meter
Thermo Savant SC250EXP Speed – Vac Concentrator
Transferringpipetten Eppendorf Research (0,5 – 10 µL, 2 – 20 µL, 10 – 100 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL, 500 – 5000 µL)
Überkopfschüttler Heidolph Reax 2
Ultraschallbad Elma S30 Elmasonic
Vortexer Yellow line TTS 2
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 L-R
HLC Thermomixer

8. Literatur

- [1] Bligh and Dyer, *Can. J. Biochem.*, **1959**, 37, 911 – 917
- [2] Burkitt Mark J., *Archives of Biochemistry an Biophysics*, **2001**, Vol. 394, No. 1, 117 – 135
- [3] Català Angel, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2009**, 157, 1-11
- [4] Dalferth Patricia Friederike, Dissertation: „Oxidativ modifiziertes LDL: „Untersuchungen zu einer Bildung und seinen zellulären Effekten“, **2000**
- [5] Davis Bill, *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, Vol. 283, No. 10, 6428 – 6437
- [6] Dejaegher Bieke, *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, 698-715
- [7] Domingues M.Rosário M., *Chemistry and Physics of Lipids*, **2008**, 156, 1-12
- [8] Folch J., M. Lees, G.H. Sloane – Stanley, *J. Biol. Chemistry*, **1957**, 226, 497 – 509
- [9] Fruhwirth Gilbert, *Biochemica et Biophysica Acta*, **2007**, 1772, 718-736
- [10] Furman C., Martin-Nizard F., Fruchart J.-C., Duriez P., Teissier E., *J. Biochem. Molecular Toxicology*, **1999**, Vol. 13, No. 6, 316 – 323
- [11] Halliwell Barry, *FEBS Letters*, **1992**, 307, 108-112
- [12] Karlson Peter, Doenecke Detlef, Koolman Jan, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, Thieme-Verlag, Stuttgart, **2005**
- [13] Karonen Maarit, Ossipov Vladimir, Sinkkonen Jari, Loponen Jyrki, Haukiojy Erkki, Pihaja Kalevi, *Phytochem. Anal.*, **2006**, 17, 149-156
- [14] Khaselev and Murphy, *Journal of Lipid Research*, **2000**, Vol. 41, 564 – 572
- [15] Lankmayr, Raber, Skriptum “Trenntechniken”, Nawi Graz, **2010**
- [16] McCalley David V., *J. of Chromatography A*, **2010**, 1217, 3408-3417
- [17] Oshinowo Lawrence, Dissertation: „Über die Einsatzmöglichkeiten der HPLC und HPLC/MS und ihre Adaption im Rahmen eines on-line Hochdurchsatzscreenings von Naturstoffextrakten“, **2004**
- [18] Raith Klaus, Dissertation: „Beiträge zur Anwendung der Massenspektrometrie in der Lipidanalytik“, **1999**
- [19] Schaefer A., Küchler T., Simat T.J., Steinhart H., *J. of Chromatography A*, **2003**, 1017, 107-116
- [20] Siegenthaler Walter, Blum Hubert E., *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage, Thieme - Verlag, Stuttgart, **2006**
- [21] Spickett Corinne M., *BioFactors*, **2005**, 24, 17-31
- [22] Trötz Müller Martin, Dissertation: „Methodenentwicklung zur Identifizierung und Bestimmung von organischen Verbindungen“, **2009**
- [23] Vietzke Jens-Peter, Dissertation: „Hautlipidanalytik mit der Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie (LC-MS)“, **2000**
- [24] Wang Chang, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 525, 1-10

- [25] Watson Andrew D., Leitinger Norbert, Navab Mohamad, Faul Kym F., Hörkkö Sohovi, Witztum Joseph L., Palinski Wulf, Schwenke Dawn, Robert Salomon G., Wei Sha, Subbanagounder Ganesamoorthy, Fogelman Alan M., Berliner Judith A., *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, Vol. 272, No. 21, 13597-13607
- [26] Watson Andrew D., *The Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274, 24787-24798
- [27] Wu Junyan, Dissertation: "Development and evaluation of new silica based polar and/or mixed modal stationary phases for HPLC", **2009**
- [28] Yu-Ling, Jing-Huei, Chung-Yu Wu, Mine-Yine Liu, *Analytical Biochemistry*, **2007**, 367, 210-218
- [29] <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/9/9a/Zellmembran.png>, 2010
- [30] <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/06/06H315/t2.pdf>, 2010
- [31] http://www.ipc.uni-karlsruhe.de/mik/15_363.php (FT-MS), 2010
- [32] <http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/pdf/script/script5.pdf> (FT-MS), 2010
- [33] www.thermoscientific.com, 2010
- [34] www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html, 2010
- [35] www.textronica.com/images/ltq_ft_smaller.jpg, 2010
- [36] http://static1.comsol.com/shared/images/stories/waters_corp_hplc_systems/html/figure2.jpg, 2010
- [37] <http://de.wikipedia.org/wiki/Lipoprotein>, 2010
- [38] <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/images/bildmsbauelemente.jpg>, 2010
- [39] http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/mambo/index.php?option=com_content&task=view&id=28&Itemid=40, 2010
- [40] http://www.analyticjournal.de/images_glossar/quadropol_ms_messverfahren_ipi.gif, 2010
- [41] <http://gentechscientific.com/wp-content/uploads/HP-1100-Series-HPLC-System-with-DAD.jpg>, 2010
- [42] <http://www.kitmondo.com/images%5Clisting%5CQTrap%204000.jpg>, 2010
- [43] <http://www.toxberlin.de/FT/Download/Grundlagen%20LCMS.pdf>, 2010