



Hochschule Anhalt  
Anhalt University of Applied Sciences

FB Angewandte Biowissenschaften  
und Prozesstechnik (BWP)

# **Polare Lipide als potentielle Biomarker zur Authentifizierung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs**

## **Masterarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science (M.Sc.)

Anna Feulner

Mat. Nr.: 4062011

Studiengang: Biotechnologie

1. Gutachter: Dr. Sabine Rosahl

2. Gutachter: Dr. Sabine Andrée

Datum der Abgabe: 28.11.2017

## Abstract

Thirty-six Angus steers were used to analyse the effects of feeding system (grass (group 1), grass + 1 kg grain (group 2) or grass + 2 kg grain (group 3)) on the phospholipid profile and the fatty acid composition of total lipids and phospholipids.

To separate a wide range of phospholipids a Hybrid SPE method was used after extraction using chloroform and methanol. The phospholipidome was characterized by a silica hydrophilic interaction liquid chromatography column coupled with electrospray ionization and tandem mass spectrometry under negative ionization conditions. For the separation of several phospholipid classes like phosphatidylinositols, phosphatidylethanolamines, phosphatidylcholines, lysophosphatidylethanolamines, lysophosphatidylcholines and sphingomyelins a acetonitrile/methanol gradient was used. Ammonium acetate was used as modifier.

To find significant differences in the phospholipidome between the feeding groups, the platform *XCMS Online* was used. For the phospholipid PC (16: 0/18: 3), a significant difference ( $p < 0.05$ ) could be observed between group 1 and group 2 and a high significant difference ( $p < 0.001$ ) between group 1 and group 3. Thus, this phospholipid could be an indicator of additional grain feeding.

Total lipids of grass fed steers displayed lower proportions of saturated fatty acids (and monounsaturated fatty acids) and higher proportions of (n-3) polyunsaturated fatty acids, like alpha-linolenic acid (C18:3 n-3). In the phospholipid fraction of the same steers only lower levels of one (n-6) polyunsaturated fatty acid (C20:3 cis n-6) were observed. Thus, the composition of phospholipid fatty acids was only marginally affected by diet in contrast to the profile of total fatty acids.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>2</b>
2.1 Lipide.....	2
2.1.1 Fettsäuren.....	3
2.1.2 Phospholipide.....	4
2.1.2.1 Zusammensetzung und Aufbau.....	4
2.1.2.2 Funktionen.....	7
2.2 Hybrid SPE für Phospholipide.....	8
2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	10
2.4 Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC).....	11
2.5 Massenspektrometrie.....	12
2.5.1 Elektrospray-Ionisation (ESI).....	13
2.5.2 Ion-Trap.....	14
2.5.3 Time-of-flight (TOF).....	16
2.6 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).....	17
2.7 Datenanalyse.....	18
2.8 Lipid Identifizierung.....	20
2.9 Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	21
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1 Material.....	23
3.1.1 Geräte.....	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3 Chemikalien und Laufmittel.....	24
3.1.4 Verwendete Lösungen.....	25
3.1.5 Untersuchte Proben.....	26
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Probenvorbereitung.....	29
3.2.2 Lipidextraktion.....	29
3.2.3 Festphasenextraktion mittels Hybrid SPE.....	30
3.2.4 Vollanalyse.....	30

3.2.5	Fettsäurebestimmung .....	32
3.2.6	Fettsäurebestimmung PL-Fraktion.....	33
3.2.7	Parameter XCMS.....	33
3.2.8	Bestimmung der FA-Kettenverteilung asymmetrischer PL.....	34
3.2.9	Parameter der HPLC-MS/MS.....	35
3.2.9.1	Ion-Trap.....	35
3.2.9.2	TOF .....	38
3.2.10	Statistik und Linearität .....	41
3.2.10.1	Statistische Tests .....	41
3.2.10.2	Kalibrierung .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
4.1	Grundcharakterisierung der Proben .....	43
4.2	Methodenübertragung auf Rindfleisch.....	45
4.3	Vergleich der PL zwischen den Fütterungsgruppen .....	49
4.4	Linearität und Kalibrierungsbereich .....	60
4.5	Vergleich der gesamten FA zwischen den Fütterungsgruppen .....	63
4.6	Vergleich der FA der PL-Fraktion zwischen den Fütterungsgruppen .....	66
4.7	Vergleich der gesamten FA mit den FA der PL-Fraktion .....	68
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
5.1	Grundcharakterisierung .....	69
5.2	Methodenübertragung .....	69
5.3	PL-Profil.....	70
5.4	Relative Quantifizierung .....	71
5.5	FA-Profil .....	71
5.5.1	Gesättigte FA.....	71
5.5.2	Einfach ungesättigte FA.....	72
5.5.3	Mehrfach ungesättigte FA.....	73
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Literaturangaben</b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>102</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Phospholipidstruktur (Jemal, Ouyang, & Xia, 2010). .....	6
<b>Abbildung 2:</b> Interaktion zwischen Zirkonium-Ionen und PL (Aurand, Trinh, Ye, & Mi, 2008). .....	9
<b>Abbildung 3:</b> Mechanismus der Elektrospray-Ionisation (Ho, et al., 2003). .....	14
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung einer Ion-Trap (Ho, et al., 2003). .....	15
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung eines TOF (Ötleş, 2016). .....	16
<b>Abbildung 6:</b> XCMS Online Screenshot - Überblick der Ergebnisse (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012). .....	19
<b>Abbildung 7:</b> MRM Analyse (Lange, Picotti, Domon, & Aebersold, 2008). .....	22
<b>Abbildung 8:</b> PC-Standard 15:0, 15:0 (1,2-Dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin). .....	25
<b>Abbildung 9:</b> Abbildung an Getreide und Grassilage (kg TM/Tag) in den Versuchsgruppen (persönliche Mitteilung Dr. D. A. Brüggemann). .....	28
<b>Abbildung 10:</b> Rindfleischprobe Ausgangszustand (links), entfernte Fettschicht (Mitte) und homogenisiertes Muskelfleisch (rechts). .....	29
<b>Abbildung 11:</b> Einteilung der PL-Klassen (Feulner, 2014). .....	46
<b>Abbildung 12:</b> BPC positiver Ionisationsmodus + CNL 141 m/z All MSn (PE/LPE). ....	47
<b>Abbildung 13:</b> BPC positiver Ionisationsmodus + CNL 183 m/z All MSn (PC/SM). .....	47
<b>Abbildung 14:</b> BPC positiver Ionisationsmodus + CNL 59 m/z All MSn (PC/SM/LPC). .....	47
<b>Abbildung 15:</b> BPC positiver Ionisationsmodus + LPC 184 m/z All MSn (LPC). .....	48
<b>Abbildung 16:</b> TIC Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2. ....	49
<b>Abbildung 17:</b> TIC Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 3. ....	50
<b>Abbildung 18:</b> Struktur PC (16:0/18:3) [Lipid Maps]. .....	55
<b>Abbildung 19:</b> Bestimmung der FA-Kettenverteilung des PL PC (16:0/18:3). .....	55
<b>Abbildung 20:</b> Cloud Plot Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2. ....	56
<b>Abbildung 21:</b> Cloud Plot Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 3. ....	57
<b>Abbildung 22:</b> EIC 720,5697 – 730,7788 m/z. ....	58
<b>Abbildung 23:</b> Kalibrierung der Probe 2a (LPC 16:0). .....	62
<b>Abbildung 24:</b> Fettsäuremuster der verschiedenen Fütterungsgruppen. ....	65
<b>Abbildung 25:</b> Fettsäuremuster der PL-Fraktion der verschiedenen Fütterungsgruppen. ....	67
<b>Abbildung 26:</b> Vergleich der gesamten FA mit den FA der PL-Fraktion. ....	68

<b>Abbildung 27:</b> Bestimmung der FA-Kettenverteilung des PL PC (20:5/16:0).....	85
<b>Abbildung 28:</b> Bestimmung der FA-Kettenverteilung des PL PC (18:1/18:0).....	86
<b>Abbildung 29:</b> EIC 720,6488 m/z PE(P-16:0/20:5). ....	87
<b>Abbildung 30:</b> EIC 814,6513 m/z PC (16:0/18:3).....	87
<b>Abbildung 31:</b> EIC 801,6333 m/z PG 38:2. ....	88
<b>Abbildung 32:</b> EIC 802,6346 m/z PC P-34:1.....	88
<b>Abbildung 33:</b> EIC 789,7126 m/z PG 37:1. ....	89
<b>Abbildung 34:</b> EIC 774,5695 – 774,7371 m/z. ....	89
<b>Abbildung 35:</b> EIC 720,6470 m/z PE (P-16:0/20:5). ....	90
<b>Abbildung 36:</b> EIC 696,6760 m/z PE (P-16:0/18:3). ....	90
<b>Abbildung 37:</b> EIC 850,6816 m/z PC O-38:6. ....	91
<b>Abbildung 38:</b> EIC 864,6214 PC 38:6. ....	91
<b>Abbildung 39:</b> EIC 822,7013 m/z PC P-36:5.....	92
<b>Abbildung 40:</b> EIC 838,6259 m/z PC (20:5/16:0).....	92
<b>Abbildung 41:</b> EIC 799,6765 m/z PG 38:5. ....	93
<b>Abbildung 42:</b> EIC 814,6502 m/z PC (16:0/18:3).....	93
<b>Abbildung 43:</b> EIC 538,5292 m/z LPC P-16:0.....	94
<b>Abbildung 44:</b> EIC 554,5232 m/z LPC 16:0. ....	94
<b>Abbildung 45:</b> Kalibrierung der Probe 2a (LPC P-16:0).....	95
<b>Abbildung 46:</b> Kalibrierung der Probe 2b. ....	95
<b>Abbildung 47:</b> Kalibrierung der Probe 22a. ....	96
<b>Abbildung 48:</b> Kalibrierung der Probe 22b (PC(20:5/16:0).....	96
<b>Abbildung 49:</b> Kalibrierung der Probe 22b (P-36:5). ....	97
<b>Abbildung 50:</b> Kalibrierung der Probe 24b. ....	97
<b>Abbildung 51:</b> Kalibrierung der Probe 25a. ....	98
<b>Abbildung 52:</b> Kalibrierung der Probe 26a. ....	98
<b>Abbildung 53:</b> Kalibrierung der Probe 31a. ....	99
<b>Abbildung 54:</b> Kalibrierung der Probe 31b (PE (22:6/P-18:0). ....	99
<b>Abbildung 55:</b> Kalibrierung der Probe 31b (PE (P-16:0/18:3). ....	100
<b>Abbildung 56:</b> Kalibrierung der Probe 33b. ....	100
<b>Abbildung 57:</b> Kalibrierung der Probe 36b. ....	101

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Untersuchte Proben. ....	26
<b>Tabelle 2:</b> Parameter der Zwei-Gruppen-Analyse.....	33
<b>Tabelle 3:</b> Gradientenverlauf der LC-Methode (Ion-Trap).....	36
<b>Tabelle 4:</b> Gradientenverlauf der LC-Methode (TOF). ....	39
<b>Tabelle 5:</b> Ergebnisse der Vollanalysen.....	43
<b>Tabelle 6:</b> Ergebnisse der Vollanalysen – Zusammenfassung der Gruppen. ....	44
<b>Tabelle 7:</b> Typische Fragmente der verschiedenen PL-Klassen.....	45
<b>Tabelle 8:</b> Result Table Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2.....	51
<b>Tabelle 9:</b> Result Table Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 3.....	51
<b>Tabelle 10:</b> Identifizierung des PL 814,6513 m/z (Lipid Maps). ....	52
<b>Tabelle 11:</b> Identifizierung der PL 814,6513 mit Strukturformeln [LipidMaps].....	53
<b>Tabelle 12:</b> Result Table Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2 – Gruppe 1 und Gruppe 3 mit festgesetzten Parametern.....	57
<b>Tabelle 13:</b> Zuordnung der Verbindungen zur Probennummer mit höchster Intensität – Gruppe 1 – Gruppe 2.....	59
<b>Tabelle 14:</b> Zuordnung der Verbindungen zur Probennummer mit höchster Intensität – Gruppe 1 – Gruppe 3.....	59
<b>Tabelle 15:</b> Massen der Vorläufer- und Produkt-Ionen für MRM – Gruppe 1 – Gruppe 2. ....	60
<b>Tabelle 16:</b> Massen der Vorläufer- und Produkt-Ionen für MRM – Gruppe 1 – Gruppe 3. ....	61
<b>Tabelle 17:</b> Kalibrierung.....	62
<b>Tabelle 18:</b> Fettsäuremuster (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen. ....	63
<b>Tabelle 19:</b> Einteilung des Fettsäuremusters (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen. ....	64
<b>Tabelle 20:</b> Fettsäuremuster der PL-Fraktion (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen. ....	66
<b>Tabelle 21:</b> Einteilung des Fettsäuremusters der PL-Fraktion (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen. ....	67
<b>Tabelle 22:</b> Anfangsgewicht, Stallendgewicht und Energieaufnahme im Mittel der Fütterungsgruppen (persönliche Mitteilung Dr. D. A. Brüggemann). ....	69

<b>Tabelle 23:</b> Fettsäuremuster (% der Fettsäuren) nach Einteilung in n-3- und n-6-FA...	74
<b>Tabelle 24:</b> Identifizierung des PL 838,6259 m/z (Lipid Maps). .....	84
<b>Tabelle 25:</b> Identifizierung des PL 846,6322 m/z (Lipid Maps). .....	85

## Abkürzungsverzeichnis

BPC	Base Peak Chromatogramm
CNL	Constant Neutral Loss Chromatogramm
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Fettsäure
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LPL	Lysophospholipid
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPC	Lysophosphatidylcholin
MDS	Multidimensional Scaling Plot
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MUFA	Einfach ungesättigte Fettsäure
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCA	Principal Component Analysis Plot
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylserin
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure
SFA	Gesättigte Fettsäuren
SM	Sphingomyelin
SPE	Festphasenextraktion
TAG	Triacylglycerin
TIC	Total Ion Chromatogramm
TOF	Time of flight-Massenspektrometer

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollte überprüft werden, inwieweit das Futtermittel von Angusbullen einen Einfluss auf das Phospholipid-Profil nimmt.

36 Angusbullen wurden dabei in drei Gruppen ( $n = 12$ ) eingeteilt. Die erste Gruppe wurde ausschließlich mit Grassilage gefüttert. Gruppe 2 und 3 bekamen zusätzlich Getreide (Gruppe 2 + 1 kg Getreide, Gruppe 3 + 2 kg Getreide). Nach Lipidextraktion wurde die polare Lipidfraktion anhand einer Hybrid SPE Methode aufgereinigt und isoliert. Die Auftrennung der polaren Lipidfraktion erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), wobei eine hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) Kieselgelsäule zum Einsatz kam. Phospholipide der verschiedenen Klassen, wie Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Sphingomyelin (SM) wurden daraufhin mittels MS bzw.  $MS^2$  identifiziert. Dazu kam ein online Datenbanksystem zum Einsatz. Um signifikante Unterschiede des Phospholipidprofils zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen zu identifizieren, wurde die Plattform *XCMS Online* verwendet.

Da sich das Fettsäure-Profil (FA-Profil) der neutralen Lipide und in geringem Ausmaß das der Phospholipid-Fraktion (PL-Fraktion) durch den Einsatz von unterschiedlichen Futtermitteln ändern kann (Scollan, et al., 2001), wurde zusätzlich zum PL-Profil die FA-Zusammensetzung des gesamten intramuskulären Fettes als auch der polaren Lipidfraktion bestimmt. In den letzten Jahren nahm das Interesse an der FA-Zusammensetzung von Fleisch zu. Dies liegt zum einen daran, dass Fleisch in der Ernährung als eine Quelle von Fett und insbesondere von gesättigten Fettsäuren (SFA) angesehen wird. Diese können sowohl an verschiedenen Krebsarten als auch an koronaren Herzkrankheiten beteiligt sein (Wood, et al., 2002). Das Verhältnis von n-6/n-3 der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) spielt zudem bei der Bildung von Blutgerinnseln, welche zu Herzinfarkten führen können, eine Rolle (Enser, et al., 2001). Höhere Mengen an n-3 PUFA können besonders bei Wiederkäuern erreicht werden, welche Gras als Futtermittel erhielten. Gras besitzt einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3), aus der n-3 FA gebildet werden (Wood, et al., 2002).

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Lipide

Lipide stellen eine komplexe Substanzgruppe dar, welche aus tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Quellen mit einer Vielzahl von Methoden extrahiert werden können. Zu ihnen zählen, neben den langkettigen Fettsäuren (FA) und deren Derivaten, auch Sterole und Steroide sowie Carotinoide und andere verwandte Isoprenoide. Obwohl diese Verbindungen weitgehend unterschiedliche Strukturen besitzen, stammen sie zum Teil aus ähnlichen biologischen Vorläufern und weisen vergleichbare physikalische und chemische Eigenschaften auf. Darüber hinaus treten die meisten natürlichen Lipide in enger Assoziation mit Proteinen auf, entweder in Membranen als unlösliche Lipid-Protein-Komplexe oder als lösliche Lipoproteine. Einige Lipide sind als Energiequellen von großer Bedeutung. Daher kann die Oxidation von langkettigen FA, welche im Fettgewebe von Säugetieren als Triacylglyceride (TAG) gespeichert werden, bis zu 90% des gesamten Energiebedarfs decken. Lipide können als polare (Phospholipide (PL) und Glykolipide) und neutrale Lipide (Wachsester, Sterylester, Etherlipide und TAG) eingestuft werden. Die Polarität eines Lipids beeinflusst dessen Flüchtigkeit, Löslichkeit und unspezifische Bindung an andere polare Verbindungen (Akoh, 2008) (Hanahan, 1997) (Sikorski & Kolakowska, 2003) (Spiller, 1995).

Lipide, welche in Fleisch gefunden werden, können anhand ihrer Lage in drei Gruppen eingeteilt werden: subkutane, intermuskuläre und intramuskuläre Lipide. Intermuskuläre Lipide werden in der Regel in spezialisierten Bindegeweben in relativ großen Anordnungen abgelagert. Dagegen werden intramuskuläre Lipide in das Muskelgewebe integriert und sind damit weit verbreitet. Sie existieren in enger Assoziation mit Proteinen und enthalten einen hohen Prozentsatz der gesamten PL (Love & Pearson, 1971).

Die Lipidzusammensetzung von Fleisch hängt von mehreren Faktoren ab. Zu diesen zählen neben der Tierart, dessen Aufzuchtbedingungen, der Futtermittelzusammensetzung auch andere Faktoren wie die Art des Muskels (Boselli, Pacetti, Curzi, & Frega, 2008). "Rote Muskulatur" enthält in der Regel höhere Mengen an PL und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) im Vergleich mit "weißer Muskulatur" (Habeanu, et al., 2014) (Wood, et al., 2004).

### 2.1.1 Fettsäuren

Fettsäuren bilden die Hauptkomponente von PL, TAG und Sterolestern. Alle Fettsäuren besitzen eine Kohlenwasserstoffkette und eine Carboxylgruppe. Fettsäuren unterscheiden sich in erster Linie in ihrer Kettenlänge (im Allgemeinen 12 bis 22 Kohlenstoffatome) und in der Anzahl, Position und Konfiguration der Doppelbindungen. FA können entweder gesättigt oder ungesättigt sein. Die gesättigten FA (SFA) enthalten keine Doppelbindungen, während die ungesättigten Verbindungen mindestens eine Doppelbindung aufweisen. FA, die nur eine Doppelbindung enthalten, sind als einfach ungesättigt bekannt (MUFAs). Jene, die zwei oder mehrere Doppelbindungen aufweisen, sind mehrfach ungesättigt (PUFAs). Die Doppelbindungen können vom Carboxyl- oder Methyl-Ende gezählt werden. Die Anwesenheit der Doppelbindungen ist verantwortlich für die Konfigurationsisomerie in cis- oder trans-Position. Natürlich vorkommende Fettsäuren treten meist in der cis-Konfiguration auf (Chow, 2008) (Sikorski & Kolakowska, 2003) (Spiller, 1995).

Fleisch enthält eine Mischung von FA sowohl gesättigte als auch einfach und mehrfach ungesättigte. Diese treten vor allem in Form von Glycerinestern (Glyceride) auf. Die überwiegenden Ester sind TAG, begleitet von geringen Mengen an Mono- und Diacylglyceriden. SFA besitzen im Allgemeinen eine sehr geringe Reaktivität. Die Einführung einer oder mehrerer Doppelbindungen liefert ein aktives Zentrum, das die Stelle einer Vielzahl von Reaktionen sein kann - unerwünscht, wie im Falle einer Oxidation oder für industrielle Zwecke wünschenswert, wie Hydrierung oder für analytische Zwecke. Heutzutage ist weniger als die Hälfte des Fettes in Schweine- und Rindfleisch gesättigt. Die vorherrschenden SFA in Fleisch sind Stearinsäure (C18: 0) und Palmitinsäure (C16: 0). Stearinsäure macht etwa ein Drittel der SFA in Rindfleisch aus. MUFAs stellen die dominierenden ungesättigten FA in Fleisch dar und machen dabei etwa 40% des der ungesättigten in Fleisch aus. Die wichtigste MUFA in Fleisch ist Ölsäure (cis C18: 1 n-9). PUFAs besitzen eine strukturelle Rolle, da sie vor allem in Membran-Phospholipiden vorkommen. Es existieren zwei Arten von PUFA, die Omega-3 (n-3) und die Omega-6 (n-6) -Fettsäuren. Fleisch und Fleischprodukte, liefern ca. 17% n-6 und ca. 19% n-3 PUFAs (Chow, 2008) (Kerry, Kerry, & Ledward, 2002).

## 2.1.2 Phospholipide

### 2.1.2.1 Zusammensetzung und Aufbau

Die Gesamtheit aller PL einer Zelle setzt sich, aufgrund ihres chemischen Aufbaus, aus Glycerophospholipiden und Sphingomyelinen (SM) zusammen (siehe Abbildung 1) (Brouwers, 2011).

Glycerophospholipide bestehen aus einem Glycerin-Grundgerüst mit unterschiedlichen Substituenten an den drei Kohlenstoffatomen. Die sn-1-Position enthält einen Fettsäureester, einen Alkylether oder einen Vinylether, was zu Phosphatidyl-, Plasmanyl- und Plasmenyl- (Plasmalogen-) glycerophospholipiden führt. Die sn-2-Position kann entweder eine Fettsäureestergruppe enthalten oder die sn-2-Hydroxylgruppe kann ohne Veresterung frei bleiben, wobei letzteres die Lysophospholipid- (Lyso-) Klassen hervorruft (Jemal, Ouyang, & Xia, 2010). Die gebundenen Fettsäuren können in ihrer Länge zwischen 14 und 22 Kohlenstoffatomen variieren und besitzen 0 bis 6 Doppelbindungen (Peterson & Cummings, 2006). Die sn-3-Position ist mit einer Phosphorsäure verestert, welche wiederum verestert wird, um unterschiedliche polare Kopfgruppen zu erzeugen. In Abhängigkeit der polaren Kopfgruppen an der sn-3-Position werden Glycerophospholipide in verschiedene Klassen eingeteilt: Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) (Jemal, Ouyang, & Xia, 2010).

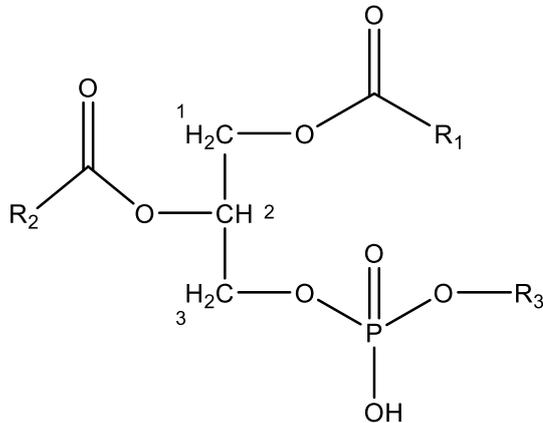
Auf der anderen Seite enthalten SM eine Alkylkette an der sn-1-Position, wobei die Hydroxylgruppe frei bleibt. Während die sn-2-Position ein Fettsäureamid enthält, weist die sn-3-Position die gleiche Kopfgruppe, welche in der PC-Klasse von Glycerophospholipiden gefunden wird (Jemal, Ouyang, & Xia, 2010). Die Nomenklatur der PL bezieht sich auf die polare Kopfgruppe sowie auf die Länge der Fettsäureketten und die Anzahl der Doppelbindungen (Lee & Kerns, 1999).

Die Fettsäurezusammensetzungen, die an den sn-1- und sn-2-Positionen der Phospholipide gebunden sind, unterscheiden sich. Während die sn-1-Position für gewöhnlich von SFA besetzt ist, dominieren an der sn-2-Position vor allem ungesättigte Fettsäuren, besonders langkettige PUFAs (Aksu, Dogan, & Sirkecioglu, 2017) (Muriel, Antequera, Petrón, Andrés, & Ruis, 2005).

## 1. Glycerophospholipide

(a) Phosphatidyl-

sn-1-Position:  $\text{CH}_2\text{-COO-R}_1$  (Acylester)



(b) Plasmanyl-

sn-1-Position:  $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}_1$  (Alkylether)

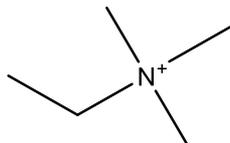
(c) Plasmenyl- oder Plasmalogen-

sn-1-Position:  $\text{CH}_2\text{-O-CH=CH-R}_1$  (Viylether)

Kopfgruppen:

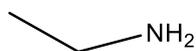
H

Phosphatidsäure (PA)



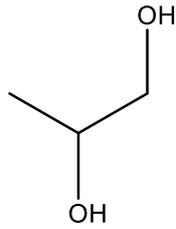
Choline

Phosphatidylcholin (PC)



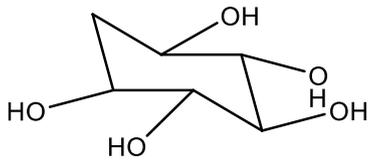
Ethanolamin

Phosphatidylethanolamin (PE)



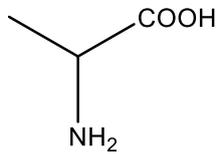
Glycerol

Phosphatidylglycerin (PG)



Inositol

Phosphatidylinositol (PI)



Serin

Phosphatidylserin (PS)

## 2. Sphingomyelin

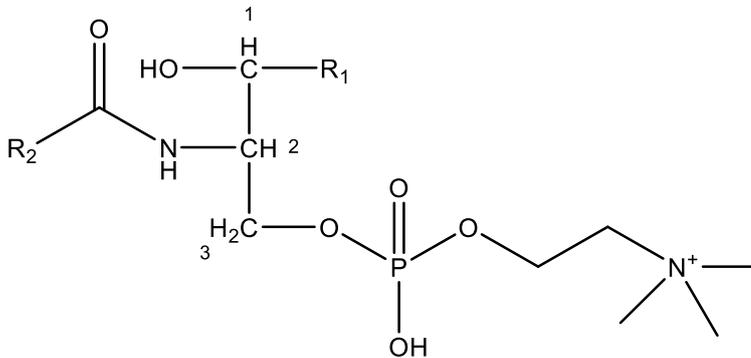


Abbildung 1: Phospholipidstruktur (Jemal, Ouyang, & Xia, 2010).

### 2.1.2.2 Funktionen

PL sind die Hauptbestandteile aller natürlichen Membranen, so dass sie in allen lebenden Organismen und deren dazugehörigen Nahrungsmittelprodukten auftreten (Nollet, 2004). Durch ihre polare Kopfgruppe und ihre unpolaren Fettsäuren erhalten PL ihren amphiphilen Charakter, der es ihnen ermöglicht Doppelschichten auszubilden (Peterson & Cummings, 2006).

Die FA-Zusammensetzung der PL hat großen Einfluss auf die Membrancharakteristiken, beispielsweise der Membranfluidität und somit der Bildung von *Lipid Rafts*. *Lipid Rafts* sind dynamische Membran-Mikrodomänen mit einem hohen Gehalt an Cholesterin und PL, welche überwiegend SFA tragen und an der Apoptose und zellulären Proliferation beteiligt sind. Diese Mikrodomänen sind für die Organisation und Regulierung wichtiger zellulärer Funktionen zuständig (Küllenberg, Taylor, Schneider, & Massing, 2012). PL sind wesentliche Strukturkomponenten aller Zellen und enthalten einen viel höheren Anteil an ungesättigten FA als TAG, einschließlich signifikanter Mengen an PUFA wie Arachidonsäure (20:4), was sie bei der Erwärmung anfälliger für Oxidationen macht (Nollet, 2012) (O'Brien, Nursten, Crabbe, & Ames, 1998).

Darüber hinaus spielen PL eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von ungesättigten FA als Vorläufer für die Eicosanoid-Synthese. Die Kettenlänge und der Sättigungsgrad der FA tragen zu den biologischen Eigenschaften der synthetisierten Eicosanoide bei. Je nachdem welche PL-gebundenen FA in der Zellmembran zur Verfügung steht, werden verschiedene Arten von Eicosanoiden synthetisiert. Zu diesen zählen unter anderem Leukotriene und Prostaglandine, welche an der Entstehung von Schmerz und Fieber sowie an der Blutgerinnung, der Regulierung des Blutdruckes und der Fortpflanzung beteiligt sind (Küllenberg, Taylor, Schneider, & Massing, 2012) (Voet, Voet, & Pratt, 2002).

PL stellen eine Quelle für essentielle Fettsäuren dar und zeigen zudem positive ernährungsphysiologische Wirkungen auf die menschliche Gesundheit. Dazu zählen das Verringern des Risikos an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die Reduzierung des Blutcholesterinspiegels und die Verbesserung der Gehirnfunktion (Nollet, 2004) (Restuccia, et al., 2011). Die ungesättigten FA, welche mit den Phospholipiden im Muskelgewebe assoziiert sind, spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Geschmacksbildung in gekochtem Fleisch.

Die Bedeutung von PL bezieht sich auch auf ihre vielen industriellen Anwendungen, welche hauptsächlich auf ihren Tensideigenschaften beruhen. Insbesondere in der Lebensmittelindustrie werden, in Kombination mit Proteinen, PL als Emulgatoren oder Emulsionsstabilisatoren eingesetzt (Restuccia, et al., 2011). Sie erleichtern die Dispersion von festen Partikeln in der Wasserphase und verbessern die Textur von mehrphasigen Nahrungsmittelmaterialeien (Sikorski & Kolakowska, 2003). Darüber hinaus können sie in Pflanzenöl als Antioxidans, aufgrund ihrer Chelatkapazitäten von Metallionen, fungieren (Nollet, 2004).

Neben ihrem biologischen und technologischen Einsatz werden PL für mehrere biomedizinische Anwendungen eingesetzt, wie die Emulgierung von Arzneimitteln und die Herstellung von Liposomen für die Kosmetik- und die Arzneimittelindustrie (Restuccia, et al., 2011). In lebenden Geweben spielen PL als Emulgatoren eine wichtige Rolle. Als Lipoproteine helfen sie dabei unpolare Lipide im Blut und anderen interzellulären Flüssigkeiten zu transportieren (Sikorski & Kolakowska, 2003).

## **2.2 Hybrid SPE für Phospholipide**

Der erste Schritt für die Analyse von Phospholipiden nach der Fettextraktion beinhaltet deren Abtrennung von den restlichen neutralen Lipiden. Dazu wird meist die Festphasenextraktion (SPE) bevorzugt, da sie zur Extraktion und Reinigung von Analyten eine hohe Selektivität und Extraktionsgeschwindigkeit besitzt sowie ein Automatisierungspotential besteht. Außerdem sind dabei, im Gegensatz zur Flüssig-Flüssig-Extraktion, viel geringere Mengen an organischen Lösungsmitteln erforderlich. (Ahmad, et al., 2012) (Peterson & Cummings, 2006).

Die SPE kann auf zwei unterschiedliche Arten verwendet werden. Zum einen können störende Matrixelemente, welche sich in der Probe befinden, auf der Säule zurückgehalten werden, während die Analyten eluieren. Zum anderen, wie in dieser Arbeit angewandt, werden die gewünschten Verbindungen auf der Säule zurückgehalten, da die Wechselwirkungen zwischen ihnen und der festen Phase stärker sind als die mit dem Lösungsmittel oder den Matrixbestandteilen (Hübschmann, 2009) (Xu, Ye, & Zhao, 2012).

Die Hybrid SPE Methode zeichnet sich dadurch aus, dass Zirkonium-Ionen funktionell an die stationäre Phase der Hybrid SPE gebunden sind (siehe Abbildung 2). Es erfolgt dabei keine Retention einer Vielzahl an basischen, neutralen und sauren Verbindungen. Die Hybrid SPE Methode beginnt mit dem Aufbringen der Probe. Dabei binden die in der Probe enthaltenen neutralen Lipide sowie die polaren PL an den Zirkonium-Ionen der Säule. Die Phosphatgruppe, welche in allen Phospholipiden vorkommt, wirkt dabei als starke Lewis Base, was auf deren zwitterionische Struktur zurückzuführen ist. Die Zirkonium-Ionen wirken dagegen aufgrund ihrer leeren d-Orbitale als starke Lewis Säure. Dabei kommt es zu einer hochselektiven Lewis Säure-Basen-Interaktion. Durch Spülen mit Lösungsmitteln, welche als immer stärkere Lewis Basen wirken, werden zunächst die neutralen Lipide von den Zirkonium-Ionen verdrängt. Bei diesen Waschschrritten verbleiben die PL jedoch auf der Säule. Mit dem Aufbringen einer sehr starken Lewis-Base, kann im letzten Schritt der Hybrid SPE Methode die hoch selektive Lewis Säure-Basen-Interaktion zwischen den PL und den Zirkonium-Ionen aufgehoben werden. (Aurand, Trinh, Ye, & Mi, 2008).

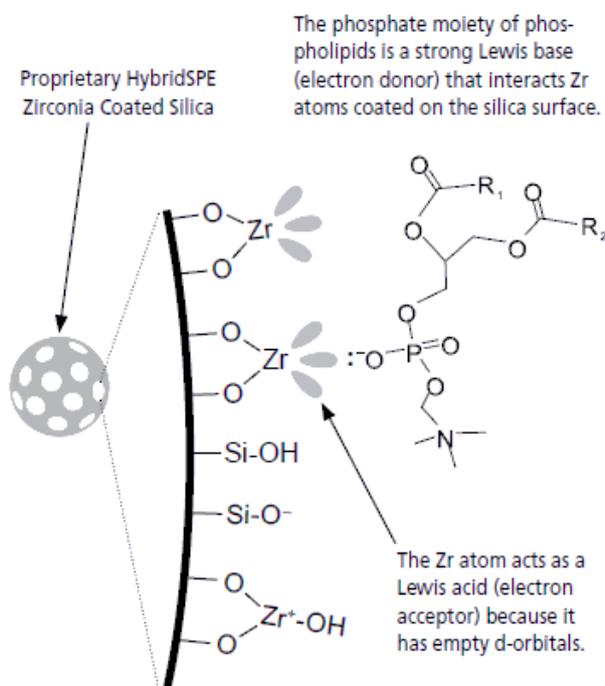


Abbildung 2: Interaktion zwischen Zirkonium-Ionen und PL (Aurand, Trinh, Ye, & Mi, 2008).

## 2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine spezifische Form der Säulenchromatographie, welche unter anderem in der Biochemie und Analytik verwendet wird, um eine Vielzahl an aktiven Verbindungen zu trennen, zu identifizieren und zu quantifizieren (Malviya, Bansal, Pal, & Sharma, 2010). Das HPLC System wird über ein Computerprogramm geregelt, welches chromatographische Profile und alle Daten der individuellen Peaks erfasst. (Waksmundzka & Sherma, 2011).

HPLC verwendet entweder eine fest- oder flüssigbeschichtete stationäre Phase und eine flüssige mobile Phase. Die Trennung von Analyten wird durch Adsorption des Analyten an die stationäre Phase erreicht. Die zu analysierende Probe wird in den Strom der mobilen Phase eingeführt und durch spezifische chemische oder physikalische Wechselwirkungen an der stationären Phase verzögert. Die Retentionszeit variiert in Abhängigkeit von den Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase, den zu analysierenden Molekülen und dem verwendeten Lösungsmittel. Zu den üblichen Lösungsmitteln gehören alle mischbaren Kombinationen von Wasser oder organischen Flüssigkeiten (am häufigsten sind Methanol und Acetonitril). Der eingestellte Gradient trennt die Analytmischung in Abhängigkeit von der Affinität des Analyten für die aktuelle mobile Phase. Die Wahl der Lösungsmittel, Additive und Gradienten hängt von der Art der stationären Phase und dem Analyten ab (Malviya, Bansal, Pal, & Sharma, 2010) (Peterson & Cummings, 2006). Zur Trennung von PL-Klassen stellt HPLC in Verbindung mit einer Gradientenelution, aufgrund des breiten Polaritätsbereiches der PL, die am häufigsten verwendete Technik dar. Beginnend mit einem Lösungsmittel mit niedriger Polarität und endend mit einem Lösungsmittelgemisch höherer Polarität ermöglicht es eine gute Trennung aller PL-Klassen. Ammoniumhydroxid oder Ammoniak kann zur einer besseren Trennung der PL führen. Ammoniumsalz hilft zudem einen Abbau der Säule zu verhindern (Nollet & Toldrá, 2009).

HPLC bietet Geschwindigkeit, Auflösung, hohe Empfindlichkeit und Spezifität. Zudem verwendet es niedrigere Temperaturen als gaschromatographische Methoden, wodurch das Risiko der Isomerisierung von ungesättigten FA verringert wird (Peterson & Cummings, 2006).

## 2.4 Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC)

Für die Analyse komplexer Lipidmischungen können mehrere LC-Konfigurationen verwendet werden. Die drei wichtigsten sind dabei die Umkehrphasen-Chromatographie (RP), die Normalphasen-Chromatographie (NP) und die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) (Cajka & Fiehn, 2014).

Der Wirkmechanismus der RPLC von Lipiden basiert auf der Lipophilie, welche durch die Kohlenstoffkettenlänge und die Anzahl der Doppelbindungen bestimmt wird. So werden Lipidspezies, welche längere Acylketten enthalten, aus der LC-Säule später als kürzere Kettenlipide eluiert und gesättigte Acylstrukturen eluieren nach mehrfach ungesättigte Analoga. NPLC und HILIC dagegen unterscheiden verschiedene Lipidspezies nach ihren hydrophilen Eigenschaften, sodass Lipide nach ihren repräsentativen polaren Kopfgruppenklassen getrennt werden können (Cajka & Fiehn, 2014) (Frega, Pacetti, & Boselli, 2012).

HILIC stellt eine Trennungsalternative zu NPLC dar. Im Gegensatz zur NPLC, welches unpolare Lösungsmittel verwendet und Wasser aus der mobilen Phase ausschließt, kann der prozentuale Anteil an Wasser in der mobilen Phase während der HILIC-Trennung variieren. Das Elutionsmittel sollte dabei mindestens 2,5% Wasser und > 60% eines organischen Lösungsmittels wie Acetonitril (ACN) enthalten. Die LC-Technik basiert auf einer Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen dem Laufmittel und dem Lösungsmittelfilm, der sich auf der Oberfläche der polaren stationären Phase bildet. (Cajka & Fiehn, 2014) (Olsen & Pack, 2013) (Wörmer, Lipp, Schröder, & Hinrichs, 2013).

Während HILIC eindeutige Retentionseigenschaften für hydrophile Verbindungen aufweist, spiegelt diese Zunahme des Interesses auch die Vorteile von HILIC gegenüber RP-Methoden in Situationen wider, in denen beide Techniken anwendbar wären. Diese Vorteile ergeben sich vor allem aus dem hohen organischen Gehalt der mobilen Phasen und der daraus resultierenden hohen Flüchtigkeit und niedrigen Viskosität. Durch die Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) führt die Verwendung von polaren Lösungsmitteln zu einem positiven Effekt auf die Ionisationseffizienz der Elektronenspray-Ionisation was wiederum zu einer höheren Sensitivität führt. Ein weiterer Vorteil von HILIC ist die Kompatibilität mit Probenvorbereitungsmethoden wie der SPE (Cajka & Fiehn, 2014) (Wörmer, Lipp, Schröder, & Hinrichs, 2013). Im Vergleich zu NPLC bietet HILIC zudem

eine bessere Reproduzierbarkeit und Robustheit. Lipidtrennungen unter HILIC-Bedingungen werden üblicherweise an kürzeren (100 - 150 mm) Mikrobohrsäulen durchgeführt. Diese Säulen werden mit einer Durchflussrate von 0,1 - 1 mL/min und bei Temperaturen von 25-40 °C betrieben. Die Analysezeit liegt typischerweise im Bereich von 15 - 60 min (Cajka & Fiehn, 2014).

## 2.5 Massenspektrometrie

Nachdem eine Phospholipidprobe ionisiert worden ist, wird sie auf der Basis ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ -Verhältnis) durch ein Massenspektrometer getrennt (Peterson & Cummings, 2006). Das Massenspektrometer ist ein Universaldetektor, welcher für die Analyse von Bestandteilen mit Molekulargewichten bis über 100.000 Da verwendet werden kann. Es wird verwendet, um die Identität einer Verbindung zu bestätigen und liefert oftmals ausreichende Daten, um dessen Struktur zu bestimmen (Gross, 2011) (Peterson & Cummings, 2006) (Weston & Brown, 1997).

Die Illustration erfolgt in einem Massenspektrum. Dabei handelt es sich um eine zweidimensionale Darstellung der Signalintensitäten gegen das  $m/z$ -Verhältnis. In den meisten Fällen entspricht das Signal mit dem größten  $m/z$ -Verhältnis dem Molekülpeak. Dieser resultiert aus der Ionisation des intakten Moleküls. Der Molekülpeak wird oftmals von mehreren Peaks mit kleinerer  $m/z$  begleitet, welche durch Fragmentierung des Moleküls entstehen. Der Peak mit der größten Intensität wird als Basispeak bezeichnet (Gross, 2011).

Das Massenspektrometer Einlasssystem für die Flüssigkeitschromatographie, oft als *Interface* zwischen den beiden Teiltechniken bezeichnet, ist dazu da, den Großteil der unerwünschten mobilen Phase soweit wie möglich zu entfernen, während dennoch die maximale Menge des Analyten in das Massenspektrometer gelangen soll. Es ist zum einen verantwortlich für eine zuverlässige und effiziente Übertragung der Analyten von der flüssigen Phase in die Gasphase. Zum anderen ist es für ein wichtiges Element der massenspektrometrischen Analyse verantwortlich: Der Ionisation (Ardrey, 2003) (Lee & Kerns, 1999).

Es existieren zahlreiche Typen von Massenspektrometern, welche sich in Ionisationsquelle und Massenanalysator unterscheiden. Für die Analyse von Phospholipiden können im Allgemeinen drei Haupttypen von Analysatoren verwendet werden: Quadrupole und Ionenfallen sowie Time-of-Flight-Massenspektrometer (Peterson & Cummings, 2006).

### **2.5.1 Elektrospray-Ionisation (ESI)**

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) stellt ein weiches Ionisationsverfahren dar, welches eine Ionisation von polaren, thermolabilen und meist nichtflüchtigen Bestandteilen erlaubt (Frega, Pacetti, & Boselli, 2012). Gekoppelt mit HPLC, für die molekulare Fraktionierung vor der massenspektrometrischen Analyse, ist HPLC/ESI-MS zu einer sehr leistungsfähigen Technik geworden, welche in der Lage ist, sowohl kleine als auch große Moleküle verschiedener Polaritäten in einer komplexen biologischen Probe zu analysieren (Ho, et al., 2003).

ESI verwendet elektrische Energie um Ionen aus der Lösung in die gasförmige Phase zu überführen, bevor sie einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden können. Die Übertragung von ionischen Spezies in die Gasphase umfasst drei Schritte: (1) Dispergieren eines Sprays: Die in Lösung befindliche Probe gelangt durch eine schmale Öffnung in die Ionenquelle. Es entsteht ein Spray, auf das ein elektrisches Potential übertragen wird, wodurch eine ionisierte Lösung entsteht. (2) Lösungsmittelverdampfung: Durch Verdampfen des Lösungsmittels wird die Ladung auf den Analyten aufgebracht. Die Polarisierung des elektrischen Feldes führt zu einer Erhöhung gleichgerichteter Ladungen an der Oberfläche der Tröpfchen. (3) Reicht die Oberflächenspannung der Tröpfchen nicht mehr aus, um die abstoßenden Kräfte der Oberflächenionen auszugleichen, zerbrechen die Tröpfchen in kleinere, was den verfügbaren Oberflächenbereich erhöht (siehe Abbildung 3). Schließlich erreicht die elektrische Feldstärke innerhalb der geladenen Tröpfchen einen kritischen Punkt, an dem es kinetisch und energetisch möglich ist, dass Ionen an der Oberfläche der Tröpfchen in die gasförmige Phase ausgestoßen werden. Die emittierten Ionen werden dann in den Massenanalysator zur nachfolgenden

Analyse der Molekularmasse und Messung der Ionenintensität beschleunigt. Das elektrische Potential kann sich in der Polarität unterscheiden und erzeugt negative Ionen (Moleküle, die ein Proton verloren haben) oder positive Ionen (Moleküle, die ein Proton erhalten haben) (Ho, et al., 2003) (Peterson & Cummings, 2006) (Wilm, 2011).

Positive oder negative ESI geschieht entweder an der Phosphatgruppe oder an der Kopfgruppe der PL. Normalerweise erscheinen positiv geladene PL wie PC und SM als Ionen im positiven Modus durch die Addition von H, Na oder Acetat. PE, PI, PG und PS bilden dagegen Ionen im negativen Modus durch die Abgabe von H (Frega, Pacetti, & Boselli, 2012).

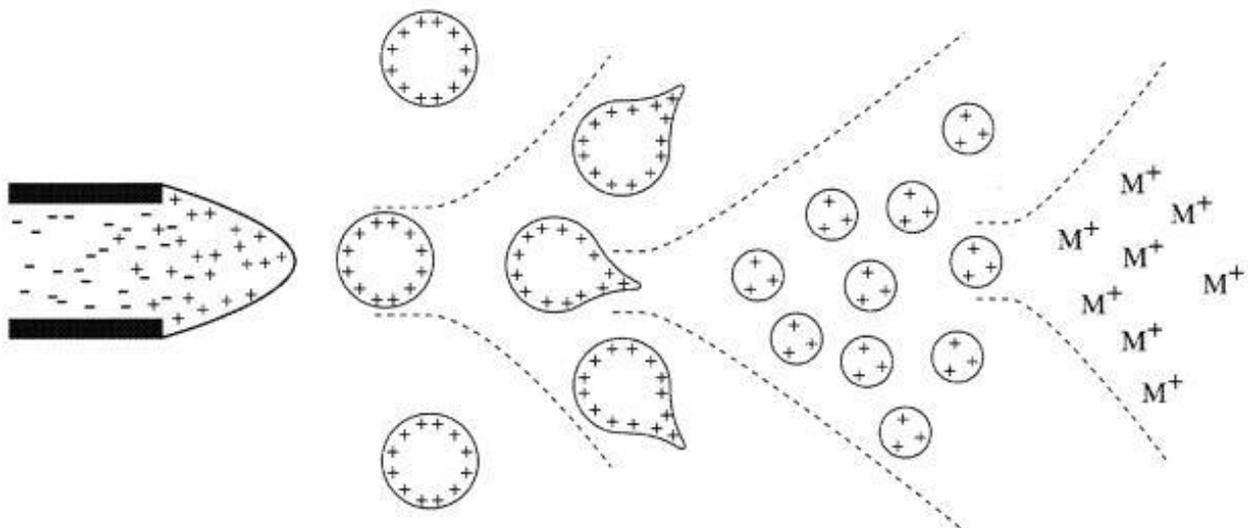


Abbildung 3: Mechanismus der Elektrospray-Ionisation (Ho, et al., 2003).

## 2.5.2 Ion-Trap

Die Ion-Trap, welche gelegentlich auch als Quadrupol-Ion-Trap bezeichnet wird, ist ein dreidimensionaler Quadrupol. Sie fungiert sowohl als Ionenspeicher, in dem gasförmige Ionen für eine bestimmte Zeitspanne eingeschlossen werden können, als auch als Massenspektrometer mit großem Massenbereich und hoher Empfindlichkeit. Es handelt sich um eine Vorrichtung mit niedriger (nominaler) Auflösung, welche in der Lage ist, sowohl schnell zu scannen, als auch tolerant gegenüber relativ hohen Betriebsdrücken zu sein.

Als Speichervorrichtung begrenzt sich die Ion-Trap auf gasförmige Ionen, welche entweder positiv oder negativ geladen sein können. Ein Nachteil der Ion-Trap stellt die relativ geringe Massengenauigkeit dar, welche zum Teil auf die begrenzte Anzahl von Ionen zurückzuführen ist (Aebersold & Mann, 2003) (Ardrey, 2003) (March, 2009).

Sie besteht aus drei Elektroden: der Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden. Diese Elektroden bilden einen Hohlraum, in dem es möglich ist, Ionen zu speichern, zu fragmentieren und zu analysieren (siehe Abbildung 4). Beide Endkappenelektroden besitzen ein kleines Loch in ihren Zentren durch das sich die Ionen hindurchbewegen können. Die Ringelektrode ist symmetrisch zwischen den beiden Endkappenelektroden angeordnet. Ionen treten durch das Multipol und die Eingangskappenelektrode in die Ion-Trap ein. Durch das Anlegen verschiedenerer Spannungen an den Elektroden können Ionen anhand ihres  $m/z$ -Verhältnisses eingefangen bzw. ausgeworfen werden. Das Ringelektroden-HF-Potential, ein Wechselfeldpotential mit konstanter Frequenz und variabler Amplitude, wird an die Ringelektrode angelegt, um ein dreidimensionales Potentialfeld zu erzeugen. Dies hält die Ionen auf einer stabilen Bahn innerhalb der Fangzelle. Durch Änderung dieses Potentials werden die Ionen in axialer Richtung, in Reihenfolge des ansteigenden  $m/z$ -Verhältnisses, zum Detektor hin ausgestoßen (Ho, et al., 2003) (Sherma, 2003).

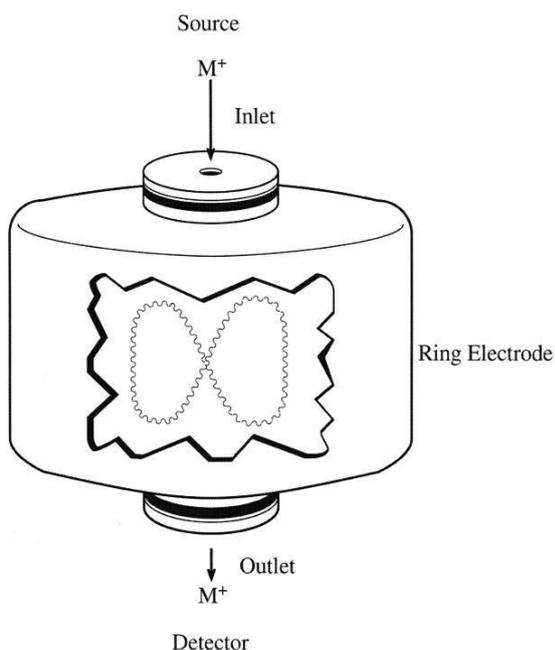


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Ion-Trap (Ho, et al., 2003).

### 2.5.3 Time-of-flight (TOF)

Die Time-of-Flight-Massenspektrometrie (TOF) ist ein Verfahren, bei dem das  $m/z$ -Verhältnis eines Ions über eine Zeitmessung bestimmt wird. Es zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit, einen fast unbegrenzten Massenbereich, einer hohen spektralen Auflösung und Genauigkeit aus (Sriveena, Srividya, Ajitha, & Uma Maheswara Rao, 2015).

Der Massenanalysator besteht aus einer pulsierenden Elektrode, einem Flugrohr und einem Reflektoren. (siehe Abbildung 5). Die erzeugten Ionen werden beschleunigt, um eine konstante kinetische Energie zu erhalten. Anschließend erfolgt der Ausstoß der Ionen in ein Flugrohr. Dies passiert unter Verwendung eines elektrischen Feldgradienten, der orthogonal zum Ionenstrahl orientiert ist. Diese orthogonale Beschleunigung wirkt sich positiv auf die Masseauflösungsleistung aus, was durch die Verwendung eines Reflektors (Ionenspiegels) weiter verstärkt wird. Die Vorrichtung besteht aus einer Reihe von Ringelektroden, welche Verzögerungsfelder erzeugen. Diese fokussieren Ionen, welche die gleichen  $m/z$ -Verhältnisse besitzen, jedoch etwas andere kinetische Energien. Ionen mit höherer Energie dringen tiefer in sie hinein und verlängern damit die Zeit ihrer Reflexion. Folglich treffen Ionen desselben  $m/z$ -Verhältnisses mit unterschiedlichen Anfangsenergien fast zur gleichen Zeit auf den Detektor. Zusätzlich wird die Masseauflösungsleistung wesentlich verbessert, indem die Ionen zweimal entlang der TOF-Flugröhre verlaufen, bevor sie den Detektor erreichen (Fay & Kussmann, 2010) (Ötles, 2016).

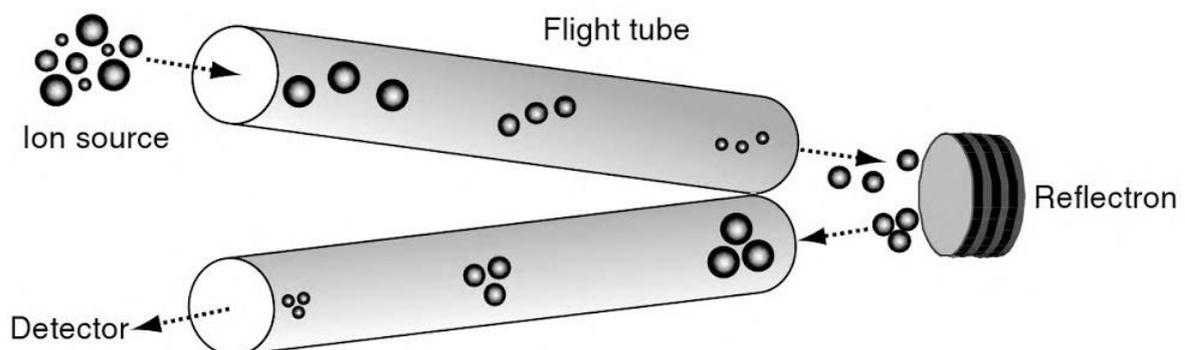


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines TOF (Ötles, 2016).

Diese Analysatoren trennen beschleunigte Ionen auf Grundlage ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Ionen werden dabei durch ein elektrisches Feld beschleunigt und erreichen Geschwindigkeiten, welche von ihren  $m/z$ -Verhältnissen abhängen. Dementsprechend erreichen kleinere Ionen als erstes den Detektor. Durch Messen der Flugzeit der Ionen und der bekannten exemplarischen Daten können die  $m/z$ -Werte abgeleitet werden (Herbert & Johnstone, 2003) (Fay & Kussmann, 2010) (Siuzdak, 1996).

## 2.6 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die Tandem-Massenspektrometrie ist eine allgemeine Methode, an der mindestens zwei Stufen der Massenanalyse beteiligt sind. Das erste MS isoliert Ionen eines spezifischen  $m/z$ -Verhältnisses. Diese, als Vorläuferionen bezeichnet, werden dann einem zweiten MS-Experiment zugeführt, angeregt und weiter fragmentiert. Die entstehenden Ionen werden als Produktionen bezeichnet und in einem zweiten MS analysiert. Es ist möglich die Anzahl der Stufen der MS zu erhöhen, indem aus dem zweiten MS wiederum Ionen ausgewählt werden können, welche dann ebenfalls angeregt, fragmentiert und anschließend in einer dritten MS analysiert ( $MS^3$ ). Dieser Schritt kann bis zu  $MS^n$  (wobei  $n$  die Anzahl der Generationen von Ionen ist, welche analysiert werden) erweitert werden (deHoffmann & Stroobant, 2007) (Hesse, Meier, & Zeeh, 2012).

Durch die Tandem-Massenspektrometrie können größere strukturelle Information gewonnen, als auch höhere Sensitivitäten, durch Verringerung des Grundlinienrauschens, erreicht werden (Postle, Wilton, Hunt, & Attard, 2007).

Verschiedene PL können damit anhand charakteristischer Produktionen mittels verschiedener Datenbanken identifiziert werden. Zudem können nicht nur die FA-Zusammensetzung, sondern oftmals auch dessen Zugehörigkeit zur sn-1- oder sn-2-Position bestimmt werden.

## 2.7 Datenanalyse

Die gleichzeitige Trennung und Detektion von Metaboliten, die sowohl LC als auch MS-Methoden verwenden, erzeugen komplexe Datensätze, welche eine signifikante Vorverarbeitung erfordern. Dies führt jedoch zu Datenmengen, welche zu groß sind, um sie manuell auszuwerten. Zur Automatisierung der Datenanalyse stehen deshalb eine Vielzahl von Softwareprogrammen zur Verfügung. Oftmals ist es das Ziel, zu bestimmen, welche Merkmale zwischen zwei oder mehreren Probengruppen dysreguliert sind. (Mahieu, Genenbacher, & Patti, 2016) (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012) (Smith, Want, O'Maille, Abagyan, & Siuzdak, 2006).

Im vergangenen Jahrzehnt wurden mehrere Softwareprogramme zur automatisierten Verarbeitung von LC/MS-basierten metabolomischen Daten eingeführt, darunter auch frei verfügbare Software wie *MetAlign*, *MZmine* und *XCMS Online* sowie kommerzielle Produkte wie *Mass Profiler Pro* oder *Metabolic Profiler* (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

Im Jahr 2006 wurde die *XCMS-Software* als eines der ersten Programme veröffentlicht, um eine vollständige Lösung für den oben beschriebenen bioinformatischen *Workflow* zur Verarbeitung von ungezielten metabolomischen Daten bereitzustellen. Das „X“ im *XCMS*-Akronym wird verwendet um zu beschreiben, dass die Software auf jede Form der Chromatographie angewendet werden kann. Bisher wurde *XCMS* jedoch am häufigsten dazu verwendet, LC/MS-basierte metabolomische Daten zu verarbeiten. Da für diese erste Version von *XCMS R* als Programmiersprache verwendet wurde und viele Benutzer nicht über ausreichende Programmierkenntnisse verfügten, wurde eine intuitive grafische Schnittstelle entwickelt. Diese Plattform, genannt *XCMS Online*, wurde als Lösung für den gesamten ungezielten metabolomischen *Workflow* konzipiert, von der rechnerisch aufwendigen Rohdatenverarbeitung bis hin zur direkten Metabolitenzuordnung durch die *METLIN-Datenbank*. *XCMS Online* ist *cloudbasiert*. Benutzer laden Daten durch einfaches *Drag and Drop* in das Programm hoch. Parameter werden ausgewählt und die Verarbeitung erfolgt aus der *Cloud*. Ergebnisse können dann online eingesehen oder zur späteren Verwendung heruntergeladen werden (Gowda, et al., 2014) (Mahieu, Genenbacher, & Patti, 2016) (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

Nach dem Hochladen der Rohdateien kann in Abhängigkeit der verwendeten Geräte, in welcher die Daten erfasst wurden, zwischen vordefinierten Parametersätzen gewählt

werden. Diese können auch individuell angepasst werden. Beispielsweise ist es möglich, dass *Signal/Noise-Verhältnis* zu ändern, um die Massentoleranz für den Identifizierungsschritt einzustellen oder die Methoden zu ändern, welche für die Merkmalerkennung, die Retentionszeitkorrektur, das Alignment und die Annotation zuständig sind. *XCMS Online* verwendet nichtlineare Methoden, um die Retentionszeit zwischen den Proben zu korrigieren. Als Visualisierung und zur Qualitätskontrolle dieses Korrekturverfahrens wird eine Überlagerung aller gesamten Ionenchromatogramme (TIC) vor (siehe Abbildung 6a) und nach (siehe Abbildung 6c) der Retentionszeitkorrektur zusätzlich zu den Retentionszeitkorrekturkurven (siehe Abbildung 6b) dargestellt. Potenziell problematische Proben mit extremen Abweichungen können anhand der Korrekturkurve erkannt und ggf. aus dem Datensatz entfernt werden (Gowda, et al., 2014) (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

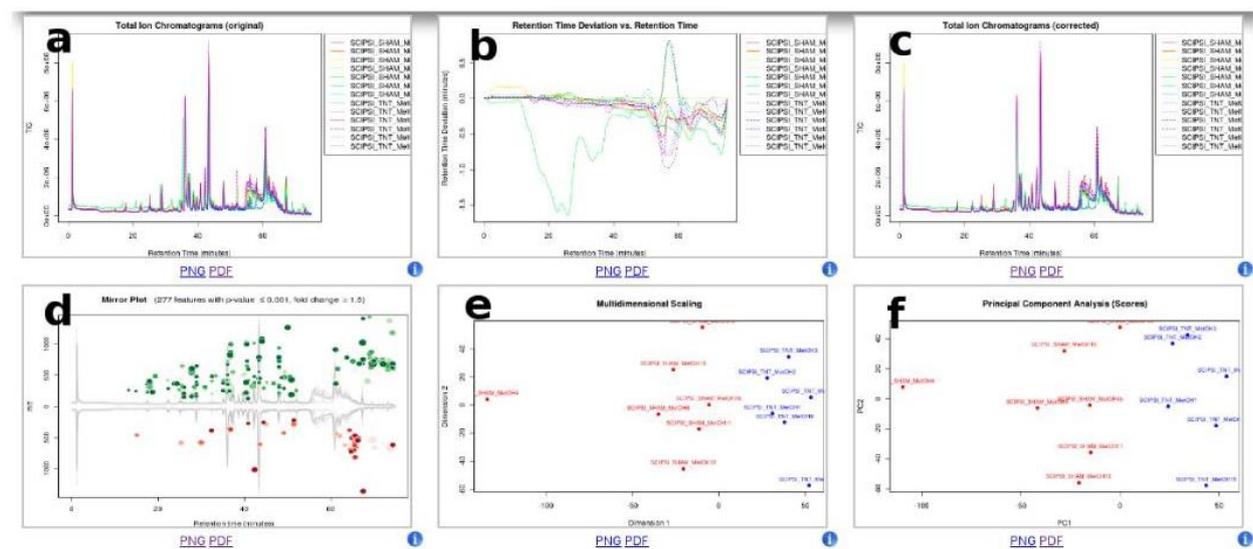


Abbildung 6: *XCMS Online* Screenshot - Überblick der Ergebnisse (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

Eine Darstellung der dysregulierten Merkmale zeigt der sogenannte *Mirror Plot* (siehe Abbildung 6d). Dieser wird verwendet um Ionen darzustellen, deren Intensitäten zwischen den Proben Gruppen, gemäß den festgelegten statistischen Schwellenwerten, abweichen. Merkmale, welche herunterreguliert sind, werden als rote Kreise auf der Unterseite des *Plots* dargestellt, während Merkmale, die hochreguliert sind, als grüne Kreise auf der Oberseite dargestellt werden. Der Farbton wird verwendet, um  $p$ -Werte darzu-

stellen. Hellere Kreise kennzeichnen niedrigere  $p$ -Werte. Die Größe des Kreises entspricht dem ( $\log$ ) *fold change* des Merkmals, d.h. der durchschnittlichen Differenz der relativen Intensitäten des Peaks zwischen den Probengruppen. Größere Kreise entsprechen Peaks mit größeren *fold change*. Die TICs nach Retentionszeitkorrektur sind im Hintergrund grau dargestellt (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

Zudem werden in der Ergebnisausgabe zwei weitere Plots dargestellt: ein *Multidimensional Scaling Plot* (MDS) (siehe Abbildung 6e) und ein *Principal Component Analysis Plot* (PCA) (siehe Abbildung 6f). Diese basieren auf den Intensitäten aller ausgerichteten Features und können Ähnlichkeiten zwischen den Proben darstellen oder bei der Identifizierung von potentiellen Ausreißern helfen (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

## 2.8 Lipid Identifizierung

Die *Lipid Maps* Strukturdatenbank (LMSD, <http://www.lipidmaps.org>) umfasst Strukturen und Annotationen biologisch relevanter Lipide. Im Januar 2017 enthielt die LMSD > 40.000 Lipidstrukturen und stellt damit die größte öffentlich verfügbare Lipid-Datenbank der Welt dar (Fahy, Sud, Cotter, & Subramaniam, 2007).

Das LMSD-Klassifikationssystem umfasst acht Lipidkategorien mit jeweils einer eigenen Unterklassifizierungshierarchie. Bestimmte Klassen von Lipiden wie Acylglyceride und Phospholipide, welche aus einem invarianten Kern (Glycerin, Kopfgruppe) und einem oder mehreren Acyl-/ oder Alkyl-Substituenten zusammengesetzt sind, eignen sich gut für eine Identifizierung. Diese Moleküle neigen dazu, in kollisionsinduzierten Experimenten, welche zu einem Verlust von Acyl-Seitenketten, einem neutralen Verlust von Fettsäuren und einem Verlust von Wasser oder anderen diagnostischen Ionen führen, je nach Art der Kopfgruppe in einer vorhersagbaren Weise zu fragmentieren (Fahy, Sud, Cotter, & Subramaniam, 2007) (Sud, et al., 2007) (Vinaixa, et al., 2016).

Die *Lipid Maps*-Gruppe entwickelte eine Reihe von Suchwerkzeugen, welche es dem Benutzer ermöglichen, einen  $m/z$ -Wert von Interesse einzugeben und eine Liste von passenden Strukturkandidaten zu erhalten. Zudem wurde eine Liste von berechneten Neutralverlust-Ionen und anderen „hochwahrscheinlichen“ Produktionen angegeben. Die MS-

Vorhersage kann durch die Eingabe einer Liste von Produktion-Ionen erweitert werden (Fahy, Sud, Cotter, & Subramaniam, 2007) (Sud, et al., 2007).

Das Online-Suchwerkzeug für Glycerophospholipide basiert auf Produktionen-Massen für allgemein beobachtete Fragmente entsprechend ihrer Acylketten-Ionen, dem neutralen Verlust der Acylketten, dem Verlust von Wasser und Kopfgruppen spezifischen Fragmentierungen sowie Kombinationen aus diesen. Die Abfrage-Schnittstelle akzeptiert  $m/z$ -Werte mit dazugehörigen Intensitäten für das Vorläufer-Ionen sowie einer Liste von Produkt-Ionen, welche dann mit den Datenbankeinträgen verglichen werden können, um eine Liste von wahrscheinlichen Strukturen (basierend auf der Vorläufer-Ion-Übereinstimmung) sowie einem *Fragment-Score* (basierend auf der Anzahl der Produkt-Ion-Übereinstimmungen) zu erzeugen (Fahy, Sud, Cotter, & Subramaniam, 2007) (Sud, et al., 2007).

## 2.9 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

*Multiple Reaction Monitoring*, wie sie vorwiegend bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern durchgeführt wird, stellt eine bevorzugte Technik für die quantitative Massenspektrometrie dar. Bei diesem Prozess ist die MS-Analysenzeit nur auf Analyten spezifischer Massen fokussiert, während alle anderen ausgeschlossen werden. Eine noch höhere Spezifität wird durch die Fragmentierung des Analyten erreicht, bei dem gleichzeitig sowohl Vorläufer- als auch Produkt-Ionen überwacht werden. Diese Reaktion muss vorher definiert werden, um die Ionenpaare oder Übergänge für den interessierenden Analyten beobachten zu können (Kitteringham, Jenkins, Lane, Elliott, & Park, 2009) (Rossi & Sinz, 2001).

Während eines MRM Experiments dient der erste und der dritte Quadrupol als Massenfiter, um spezifisch vordefinierte  $m/z$ -Verhältnisse des Vorläufer- sowie des Produkt-Ions zu selektieren (siehe Abbildung 7). Der zweite Quadrupol dient als Kollisionszelle, welcher mit Hilfe eines Kollisionsgases das Vorläufer-Ion fragmentiert. Das vom dritten Quadrupol selektierte Produkt-Ion wird anschließend vom Detektor aufgezeichnet (Lange, Picotti, Domon, & Aebersold, 2008) (Rossi & Sinz, 2001).

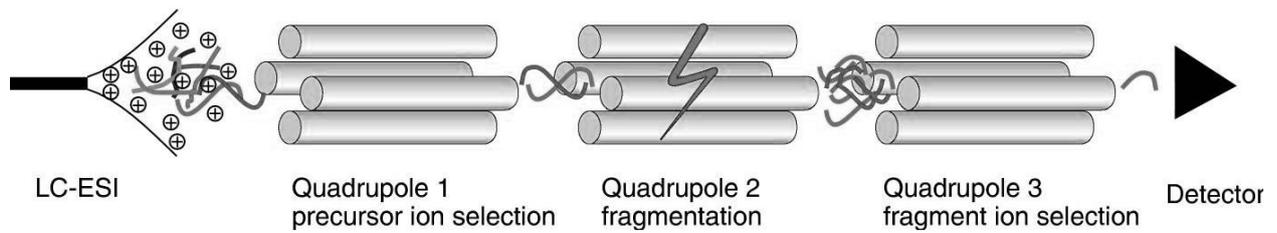


Abbildung 7: MRM Analyse (Lange, Picotti, Domon, & Aebersold, 2008).

Da Massenfilter 1 und 3 auf jeweils eine vorgegebene Masse fixiert werden ( $m_1$  und  $m_2$ ), können nur Signale für Vorläufer-Ionen der Masse  $m_1$  registriert werden, wenn sie zur Bildung von Produkt-Ionen der Masse  $m_2$  führen. Anhand dieser zweifachen Massenfokussierung kann eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität erreicht werden. MRM stellt somit die Methode der Wahl für die Quantifizierung von Analyten aus komplexen biologischen Proben dar, mit der Voraussetzung, dass Vorkenntnisse zum Fragmentierungsverhalten einer Verbindung existieren (Hesse, Meier, & Zeeh, 2012) (Lange, Picotti, Domon, & Aebersold, 2008).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Homogenisator:	Edmund Bühler GmbH HO4A
HPLC:	Agilent, 1100 Serie
Ion-Trap:	Agilent, LC/MSD TRAP SL
HPLC:	ThermoFisher, UltiMate 3000 RS
TOF:	Bruker, maXis UHR QToF System
Mikroliterpipetten:	Eppendorf, Research Plus 100 – 100 µL; 20 – 200 µL
Rotationsverdampfer:	Büchi, Vacuum Controller V-850; Büchi, Rotavapor R-210; Büchi, Heating Bath B-491; Büchi, Vacuum Pump V-700
SPE-Apparatur:	Macherey-Nagel
Ultraschallbad:	Bandelin, Sonorex
Waage:	Sartorius, CPA423S
Zerkleinerer:	Retsch, GM 200

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritze:	Norm-Ject, 2-teilig, latex- und silikonölfrei
Eppendorfspitzen:	VWR für Eppendorf, 100 – 1000 µL; 20 – 200 µL, 1 – 10 µL
Faltenfilter:	Macherey-Nagel, Durchmesser 18,5 cm
Hybrid SPE Säule:	Supleco, 30 mg/mL SPE Tubes
Mikroreaktionsgefäße:	Eppendorf, Safe-lock Tubes, 1,5 mL

Spritzenfilter:	Sartorius Stedim, Minisart RC4
Vials:	WICOM, Gewindeflasche, 1,5 mL Inhalt, 8 mm, klar
Vialdeckel:	WICOM, 8 mm Schraubkappe mit eingelegten Silicon/Teflon-Septen (weiss/rot)

### 3.1.3 Chemikalien und Laufmittel

Acetonitril:	Promochem, LC-MS
Ameisensäure:	FLUKA, LC-MS
Ammoniumacetat:	FLUKA, LC-MS
Chloroform:	Honeywell, p.A.
Eluent A:	Acetonitril (LC-MS) : H <sub>2</sub> O FLUKA 9:1 mit 2,5 mmol/L Ammoniumacetat (LC-MS)
Eluent B:	Methanol (LC-MS) : H <sub>2</sub> O FLUKA 9:1 mit 2,5 mmol/L Ammoniumacetat (LC-MS)
Methanol:	Merck, zur Rückstandsanalyse
Methanol:	Promochem, LC-MS
Natriumsulfat:	Merck, wasserfrei
Seesand:	Merck
Wasser:	FLUKA, LC-MS

### 3.1.4 Verwendete Lösungen

Lösung A:	Chloroform (p.A.) : Methanol (zur Rückstandsanalyse) 2:1 (v/v)
Lösung B:	Acetonitril (LC-MS) mit 1 % Ameisensäure (LC-MS) (v/v)
Lösung C:	Acetonitril (LC-MS)
Lösung D:	2,0 M Ammoniumlösung in Methanol
Lösung E:	Acetonitril (LC-MS) : H <sub>2</sub> O FLUKA 9:1 mit 2,5 mmol/L Ammoniumacetat (LC-MS) [entspricht Eluent A]
Lösung F:	1 mg/mL PC-Standard (15:0; 15:0) [1,2-Dipentadecanoyl- sn-glycero-3-phosphocholin] in Methanol (LC-MS)
Lösung G:	100 µg/mL PC-Standard (15:0; 15:0) [1,2-Dipentadecanoyl- sn-glycero-3-phosphocholin] in Lösung A
PL-Mix:	Phospholipidmischung aus Sojabohnen (Analytical standard, Supelco)  enthält: L-α-LPC, L-α-PC, L-α-PE, L-α-PI
PL-Mix-Combi	PL-Mix 1:20 mit Eluent A  + 0,1 mg/mL LPE (Eigelb) + 0,1 mg/mL SM (Eigelb)
PC-Standard:	15:0; 15:0 (1,2-Dipentadecanoyl-sn-glycero-3- phosphocholin) (LGC Standards) (siehe Abbildung 8)

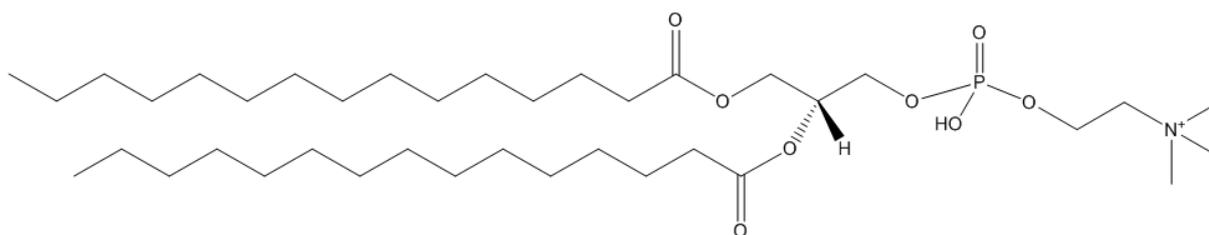


Abbildung 8: PC-Standard 15:0, 15:0 (1,2-Dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin).

### 3.1.5 Untersuchte Proben

In Tabelle 1 sind alle in dieser Forschungsarbeit untersuchten Proben mit Tier-Nummer, Schlachttag und Gruppenzuordnung aufgelistet. Zudem wurden das Gesamtgewicht der jeweiligen Probe, das Gewicht des entfernten Fettes und das daraus resultierende Gewicht des homogenisierten Muskelfleisches angegeben.

Tabelle 1: Untersuchte Proben.

<b>Nr.</b>	<b>Tier-Nr.</b>	<b>Schlachttag</b>	<b>Gruppe</b>	<b>Gesamtgewicht [g]</b>	<b>Gewicht Fett [g]</b>	<b>Gewicht Fleisch [g]</b>
1	7910	15.07.2015	1	132,00	39,94	92,06
2	8756	15.07.2015	1	135,52	20,10	115,42
3	5851	15.07.2015	2	153,95	16,08	137,87
4	7902	15.07.2015	2	232,62	50,70	181,92
5	7903	15.07.2015	2	214,86	67,10	147,76
6	1635	15.07.2015	3	144,42	32,56	111,86
7	7904	15.07.2015	3	166,80	33,67	133,13
8	6903	15.07.2015	2	148,67	36,46	112,21
9	6905	15.07.2015	1	171,73	38,52	133,21
10	7897	15.07.2015	1	208,76	33,77	174,99
11	6902	15.07.2015	3	219,85	35,68	184,17
12	7900	15.07.2015	3	219,84	60,64	159,20
13	5326	22.07.2015	1	213,66	50,58	163,08
14	7916	22.07.2015	1	191,83	40,39	151,44
15	7914	22.07.2015	2	233,69	67,44	166,25
16	6770	22.07.2015	2	218,22	57,23	160,99
17	4725	22.07.2015	3	185,33	52,39	132,94
18	2391	22.07.2015	3	143,94	17,49	126,45
19	7912	22.07.2015	3	214,95	38,34	176,61
20	7911	22.07.2015	3	231,11	59,90	171,21
21	7913	22.07.2015	2	231,02	54,47	176,55
22	4723	22.07.2015	1	189,57	46,18	143,39

<b>23</b>	4722	22.07.2015	2	189,50	61,03	128,47
<b>24</b>	3379	22.07.2015	1	172,84	31,29	141,55
<b>25</b>	6774	29.07.2015	1	381,05	136,30	244,75
<b>26</b>	7920	29.07.2015	1	143,77	31,99	111,78
<b>27</b>	7923	29.07.2015	3	225,51	47,12	178,39
<b>28</b>	9921	29.07.2015	3	191,99	30,71	161,28
<b>29</b>	9922	29.07.2015	2	196,35	45,96	150,39
<b>30</b>	9924	29.07.2015	2	194,86	17,95	176,91
<b>31</b>	77	12.08.2015	1	238,57	111,01	127,56
<b>32</b>	78	12.08.2015	3	481,29	203,53	277,76
<b>33</b>	93	12.08.2015	1	463,35	127,67	335,68
<b>34</b>	3931	12.08.2015	2	245,36	87,34	158,02
<b>35</b>	3935	12.08.2015	3	542,07	175,71	366,36
<b>36</b>	4730	12.08.2015	2	454,78	188,20	266,58

Um Getreide als Futtermittel einzusparen bzw. auf eine Eiweißergänzung im Futtermittel zu verzichten, wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Grub in Kooperation mit der Angus-Group Gundelfingen Fütterungsversuche mit Angusbullen durchgeführt. Insgesamt wurden 70 Angusbullen aus verschiedenen Bundesländern mit einem mittleren Alter von 297 Tagen und einem mittleren Gewicht von 357 kg verwendet. Diese wurden anhand ihres Lebendgewichts und Alter gleichmäßig in drei Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 9). Dabei erhielten die Tiere der ersten Fütterungsgruppe ausschließlich Grassilage mit Mineralfutterergänzung. Die beiden anderen Gruppen bekamen zusätzlich zur Grassilage täglich 1 bzw. 2 kg Getreide (Körnermais und Getreide 50:50). In allen Gruppen wurde ein mittleres Schlachtagter von etwa 580 Tagen erreicht (persönliche Mitteilung Dr. D. A. Brüggemann).

Gruppe 1: Grassilage

Gruppe 2: Grassilage + 1 kg Getreide

Gruppe 3: Grassilage + 2 kg Getreide

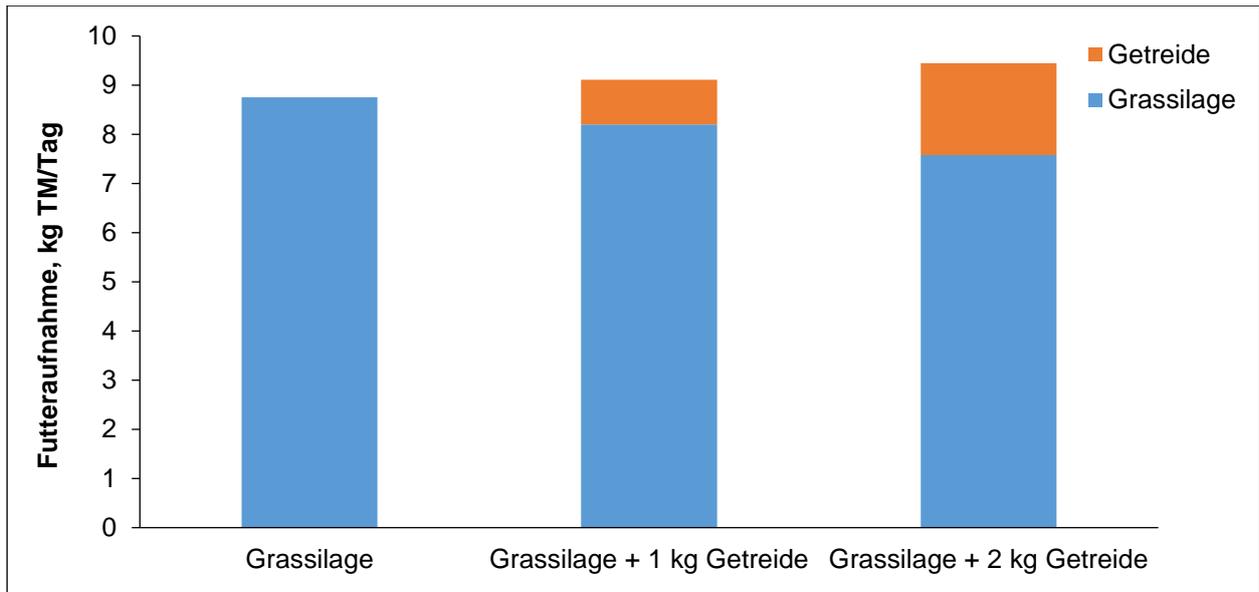


Abbildung 9: Abbildung an Getreide und Grassilage (kg TM/Tag) in den Versuchsgruppen (persönliche Mitteilung Dr. D. A. Brüggemann).

Für die nachfolgenden Versuche wurden 36 dieser 70 Rinder untersucht. Bei den verwendeten Teilstücken handelte es sich um Roastbeef-Scheiben mit einem Gesamtgewicht zwischen 130 und 550 g.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Probenvorbereitung

Die verschiedenen Rindfleischproben wurden von ihrer äußeren Fettschicht befreit. Das erhaltene Muskelfleisch wurde mittels eines Zerkleinerers homogenisiert, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

In der nachfolgenden Abbildung sind sowohl der Ausgangszustand der Rindfleischproben, die entfernte äußere Fettschicht, als auch das homogenisierte Muskelfleisch dargestellt.



Abbildung 10: Rindfleischprobe Ausgangszustand (links), entfernte Fettschicht (Mitte) und homogenisiertes Muskelfleisch (rechts).

### 3.2.2 Lipidextraktion

In ein 100 mL Bühlerglas wurden nacheinander 5 g Seesand, 10 g wasserfreies Natriumsulfat und 3 g der homogenisierten Probe eingewogen. Anschließend wurden 25 mL der Lösung A sowie 1 mL der Lösung G dazugegeben. Die Mischung wurde dann für 90 s bei Raumtemperatur und 3000 U/min gemixt und über einen Faltenfilter in einen Rundkolben filtriert. Die erhaltene Lösung wurde daraufhin mit einem Rotationsverdampfer soweit wie möglich eingengt. Dieses geschah zunächst bei 40 °C und 337 mbar und anschließend bei 300 mbar. Der Rest wurde mit Stickstoff wiederum bei 40 °C im Wasserbad abgeblasen. Durch Zugabe von 2 mL der Lösung B sowie den Einsatz eines Ultraschallbades erfolgte die Resuspendierung.

### 3.2.3 Festphasenextraktion mittels Hybrid SPE

Zur Isolierung der Phospholipide durch eine Festphasenextraktion mittels Hybrid SPE wurden vier Schritte durchgeführt. Zu Beginn wurde jeweils 1 mL des Fettextraktes auf die Kartusche aufgegeben. Diese konnte anschließend durch ein Vakuum, welches mittels Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, durch die Säule gezogen und in einem 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß aufgefangen werden.

1. Schritt: Resuspension (Fraktion FA1)
2. Schritt: Lösung B (Fraktion FA2)
3. Schritt: Lösung C (Fraktion FA3)
4. Schritt: Lösung D (Fraktion PL)

Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels Stickstoff bei 40 °C bis zur Trockene eingengt. Es erfolgte anschließend die Resuspension mit 1 mL der Lösung E und unter Verwendung eines Ultraschallbades. Die einzelnen Fraktionen der Proben wurden durch eine 1 mL Einmalspritze mit Spritzenfilter in Vials filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 3.2.4 Vollanalyse

Zur Charakterisierung der Proben wurden Vollanalysen durchgeführt. Diese umfassten die Bestimmung der vier Hauptkomponenten des Fleisches. Dabei wird der prozentuale Anteil an Protein, Fett, Wasser und Asche ermittelt. Nach Addition der einzelnen Ergebnisse sollte ein Wert von 100 % ( $\pm 0,5$  %) erreicht werden.

Zur Wasserbestimmung wurden 2 – 4 g der homogenisierten Probe in eine vorgetrocknete Abdampfschale mit einem Pistill in 30 g Seesand eingekratzt. Diese wurde anschließend für 10 min bei 600 Watt im Mikrowellenofen getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator wurden sie zurückgewogen.

Für die Bestimmung des Fettanteils wurde der Inhalt der Sandschale der Wasserbestimmung quantitativ in eine Extraktionshülse überführt. Diese kamen in einen Extraktions-

aufsatz (Büchi 810 mit Ölbad und Umwälzkühler). Nach Befüllen der Lösungsmittelbecher mit ca. 170 mL Petroleumbenzin, erfolgte die Extraktion für 2 h. Die Becher mit Fettrückstand wurden im Mikrowellenofen (600 W) für 10 min getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und anschließend ausgewogen.

Um den Gehalt an Asche zu bestimmen wurde eine Abdampfschale, welche zuvor im Trockenschrank aufbewahrt und im Exsikkator abgekühlt wurde, ausgewogen. Nach Einstreichen von 2 – 4 g der homogenisierten Probe mit einem Löffelspatel erfolgte die Zugabe von 1 mL Magnesiumacetatlösung. Die Schale wurde für 2 h bei 103 °C im Trockenschrank vorgetrocknet und anschließend im Muffelofen mit Mikrowellentechnik (CEM Phoenix) bei 600 °C 1 h lang verascht. Nach Abkühlen im Exsikkator erfolgte die Rückwaage.

Für die Bestimmung des Proteinanteils nach Kjeldahl wurden ca. 1 g der homogenisierten Probe in ein Abwägeschiffchen (stickstofffrei) eingewogen. Dieses wurde in ein Aufschlussglas gegeben, welches mit einem Kjeltab bestückt wurde. Anschließend wurden 13 mL konzentrierte Schwefelsäure dazugegeben. Die Proben wurden in Aufschlussgläsern gegeben und mittels Turbotherm (Gerhardt Vapodest 50sC) zuerst 20 min bei 100 % Leistung und anschließend für 50 min bei 80 % Leistung aufgeschlossen. Durch das Kochen der homogenisierten Probe in konzentrierter Schwefelsäure entsteht eine Ammoniumsulfatlösung. Das Salz Kaliumsulfat in den Kjeltabs dient dabei zur Erhöhung des Siedepunktes und Kupfer(II)Sulfat als Katalysator zur Verkürzung der Aufschlusszeiten. Die entstandenen säurehaltigen Dämpfe wurden mittels Turobsog abgesaugt. Nach dem Klarwerden der Flüssigkeit wurden die Gläser abgekühlt. Im Vapodest 50sC wurde jedes Probenglas automatisch mit ca. 100 mL dest. Wasser und ca. 45 mL Natronlauge versetzt. Um Ammoniumsulfat in Ammoniak umzuwandeln muss dabei ein Laugenüberschuss vorhanden sein. Mit Wasserdampfzugabe wurde die Flüssigkeit im Glas zum Sieden gebracht. Dabei entstanden alkalische Ammoniakdämpfe, welche im Schlangenkühler abgekühlt wurden. Dieses Destillat wurde in ca. 70 mL Borsäure aufgefangen. Der Anfangs-pH-Wert der Borsäure wurde mit einer pH-Elektrode gemessen. Durch das eingeleitete alkalische Destillat veränderte sich der pH-Wert. Vapodest 50sC titrierte anschließend mittels Salzsäure, bis der Anfangs-pH-Wert erreicht wurde. Anhand der titrierten mL konnte der Proteingehalt der jeweiligen Probe berechnet werden.

### 3.2.5 Fettsäurebestimmung

Die Probenvorbereitung erfolgte in Anlehnung an Schulte und Weber (1989).

In ein 100 mL Bühlerglas wurden 5 g Seesand, 10 g wasserfreies Natriumsulfat und 5 g der homogenisierten Probe eingewogen. Nachdem 25 mL Methanol-Dichlormethan (1:2, mit 0,13772 g/L Butylhydroxytoluol als Stabilisator) dazugegeben wurden, wurde die Mischung für 90 s bei 3500 U/min gemixt und über einen Faltenfilter mit etwas Natriumsulfat in einen 100 mL Erlenmeyerkolben filtriert. 750 µL des Filtrats wurden in Vials überführt und 250 µL 0,2 molare Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung (TMSH) dazugegeben. Die so hergestellten Fettsäuremethylester wurden mittels Gaschromatographen (Hewlett Packard 6890) analysiert. Als Trennsäule wurde eine J&W Scientific DB-23 Kapillarsäule (Fa. Agilent Technologies Inc. US) (60 m Länge, Durchmesser 250 µm, 0,25 µm Filmdicke) verwendet.

Die Messbedingungen waren wie folgt:

Injektionstemperatur: 250 °C

Trärgas: Wasserstoff 1,3 mL/min

Split: 1:10

Injektionsvolumen: 1 µL

Temperaturprogramm:

80 °C (5 min)

auf 190 °C in 2 °C/min

auf 220 °C in 1 °C/min

220 °C (20 min)

Detektor: FID

Detektortemperatur: 250 °C

Die Auswertung erfolgte mit *OpenLAB CDS ChemStation Workstation* (Fa. Agilent Technologies Inc. US). Die Anteile der einzelnen Fettsäuren wurden über die Peakflächen (Flächenprozent) ermittelt.

### 3.2.6 Fettsäurebestimmung PL-Fraktion

Zur Bestimmung des Fettsäuremusters in der PL-Fraktion wurde die Lipidextraktion, wie bereits im Kapitel 3.2.2 beschrieben, durchgeführt. Der verwendete Interne Standard (Lösung G) wurde jedoch für diese Untersuchung nicht zugesetzt. Die Festphasenextraktion erfolgte analog zu der im Kapitel 3.2.3 beschriebenen Methode. Für die Fettsäurebestimmung wurde dann nur die Fraktion PL herangezogen. Diese wurde, nach Resuspendierung durch Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  TMSH und 750  $\mu\text{L}$  Methanol-Dichlormethan (1:2, mit 0,13772 g/L Butylhydroxytoluol), über einen Spritzenfilter filtriert und entsprechend der vorhergegangenen Methode zur Fettsäurebestimmung analysiert und ausgewertet.

### 3.2.7 Parameter XCMS

Die gewonnenen LC/MS-Daten wurden mittels *XCMS Online*, welches unter <https://xcmsonline.scripps.edu> frei verfügbar ist, auf deren Unterschiede hinsichtlich der Intensität der gefundenen Verbindungen analysiert.

Die Parametereinstellungen für die Zwei-Gruppen-Analyse werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2: Parameter der Zwei-Gruppen-Analyse.

Kategorie	Parameter
Merkmalerkennung	matchedFilter $\Delta m/z = 50$ ppm min peak width= 10 s max peak width = 60 s
Retentionszeitkorrektur	None profStep = 1
Alignment	bw = 10 minfrac = 0,5 mzwid = 0,05

	minsamp = 1 max = 100
Statistik	Unpaired t-test p-value (high significant) = 0.01 fold change = 1,5 p-value (significant) = 0,05
Annotation	ppm error = 25 m/z absolute error = 0,1

Die Ergebnisse, einschließlich *Result Tables*, *Cloud-Plots*, TIC und Extracted Ion Chromatogramm (EIC), wurden direkt aus *XCMS Online* exportiert.

### 3.2.8 Bestimmung der FA-Kettenverteilung asymmetrischer PL

Zur Bestimmung der FA-Kettenverteilung asymmetrischer PL existieren mehrere massenspektrometrische Methoden. Die am häufigsten verwendete Methode nutzt die Tatsache, dass das sn-2-Carboxylation eine höhere Intensität als das sn-1-Carboxylation besitzt. Im negativen Ionisationsmodus sind die Carboxylationen (R1-COO und R2-COO) häufig vertreten und können somit zur Ableitung der sn-Position herangezogen werden (Brouwers, 2011).

Handelt es sich bei dem PL um LPE oder LPC, wird für die Bestimmung der Kettenverteilung das Verhältnis der Intensität des  $[M + H - H_2O]^+$ -Peaks und der des Phosphocholin-Ions (m/z 184) bzw. der Produkt-Ionen aus Phosphoethanolamin-Verlust herangezogen. Ein Verhältnis größer 1 deutet dabei auf eine sn-1-gebundene FA, bzw. kleiner 1 auf eine sn-2-gebundene FA hin (Losito, et al., 2013).

### 3.2.9 Parameter der HPLC-MS/MS

Die verwendete LC-Methode wurde der Literatur von Losito et al. (2013) entnommen und angepasst. Dabei wurde ein anderer Gradientenverlauf gewählt. Bei der MS-Methode handelte es sich um eine gerätespezifische Selbstentwicklung.

#### 3.2.9.1 Ion-Trap

##### HPLC (PL HI N2 NEU.M (LC + Trap))

##### Geräte:

Agilent 1100

Degasser G1379A

Binary Pump G1312A

WPS G1367A (Autosampler)

Column Compartment G1316A

MWD G1365B (Multiple Wavelength Detector)

6310 IonTrap SL

##### Software

ChemStation for LC 3D Systems

6300 Series IonTrap LC/MS Software 6.1

6300 Series TrapControl Version 6.1

Eluent A: ACN (LCMS): H<sub>2</sub>O FLUKA=90:10 mit 2,5 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc  
(193 mg/L) (LCMS)

Eluent B: MeOH (LCMS): H<sub>2</sub>O FLUKA=90:10 mit 2,5 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc  
(193 mg/L) (LCMS)

Säule: Kinetex 2.6 µm HILIC 100Å; 150\*3 mm Fa. Phenomenex

Vorsäule: Security Guard ULTRA Cartridges UHPLC HILIC for 3 mm ID  
Columns

Fluss: 0.3 mL/min

Gradient:

Tabelle 3: Gradientenverlauf der LC-Methode (Ion-Trap).

Zeit [min]	Eluent B [%]	Fluss [mL/min]
0.00	9.0	0.300
6.00	9.0	0.300
11.00	36.0	0.300
25.00	36.0	0.300
26.00	100.0	0.300
39.00	100.0	0.300
40.00	9.0	0.300

Post-Time: 20 min

Stop-Time: 60 min

Injektionsvolumen: 2 µL (oder abweichend)

Injection-Mode: Needle Wash (Flushport; ACN : H<sub>2</sub>O= 90:10%)

Säulentemperatur: 30 °C

Säulenschaltventil: Column 1

### Ion-Trap

Source ESI

Ion Polarity Negative

Scan Begin 100 m/z

Scan End 1200 m/z

	<b>Segment1</b>	<b>Segment2</b>
Zeit	0 - 25 min	25 - 60 min

---

Mode	SaveSpectra	SaveSpectra
	ON	OFF
Divert Valve	Source	Waste
Mode	Auto MS (2)	MS

ICC: ON  
Target: 30000  
Max. Accu Time: 300.00 ms  
Averages: 5

Nebulizer: 40 psi  
Dry Gas: 8 L/min  
Dry Temp: 350 °C  
Number of  
Precursor ions: 4  
Threshold Abs.: 1000  
Threshold Rel.: 5 %  
Active Exclusion: ON  
Excluded after: 2 Spectra  
Release after: 0.3 min  
MS/MS Frag Ampl.: 1.7V  
MS/MS Include: 300.00 – 1200.00 m/z  
Group Length: 1

### Data Analysis

*Bruker Compass DataAnalysis 4.2*

*QuantAnalysis 2.2*

### 3.2.9.2 TOF

#### HPLC (pl\_re.m)

##### Geräte:

Dionex UltiMate 3000RS

SRD 3600 (Degasser)

DGP 3600RS (Dual Gradient Pump)

WPS 3000 TRS (Autosampler)

TCC 3000RS (Column Compartment)

MWD 3000 (Multiple Wavelength Detector)

Bruker Daltonics maXis

##### Software

Chromelion Express/ DCMS Link

Compass for otofSeries 1.7

otofControl Version 3.4

Bruker Daltonics Hystar 3.2 SR4

Eluent A: ACN (LCMS): H<sub>2</sub>O FLUKA=90:10 mit 2.5 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc  
(193 mg/L) (LCMS)

Eluent B: MeOH (LCMS): H<sub>2</sub>O FLUKA=90:10 mit 2.5 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc  
(193 mg/L) (LCMS)

Säule: Kinetex 2.6 µm HILIC 100Å; 150\*3 mm Fa. Phenomenex

Vorsäule: Security Guard ULTRA Cartridges UHPLC HILIC for 3 mm ID  
Columns

Fluss: 0.3 mL/min

Gradient:

Tabelle 4: Gradientenverlauf der LC-Methode (TOF).

Zeit [min]	Eluent B [%]	Fluss [mL/min]
0.00	9.0	0.300
6.00	9.0	0.300
11.00	36.0	0.300
25.00	36.0	0.300
26.00	100.0	0.300
39.00	100.0	0.300
40.00	9.0	0.300

Post-Time: 20 min  
 Stop-Time: 60 min  
 Injektionsvolumen: 2 µL (oder abweichend)  
 Injection-Mode: Needle Wash (300 µL; 30 µL/s)  
 Säulentemperatur: 30 °C  
 Säulenschaltventil: 6\_1 (0 - 27 min) / 1\_2 (27 - 60 min)

Tof (LC\_PL\_neg\_neu.m)

Source: ESI  
 Ion Polarity: Negative  
 Scan Begin: 50 m/z  
 Scan End: 1200 m/z

	<b>Segment1</b>	<b>Segment2</b>	<b>Segment3</b>
Zeit:	0 - 25 min	25 - 25.5 min	25.5 - 60 min
Mode:	SaveSpectra	SaveSpectra	SaveSpectra
	ON	ON	OFF
Spectra Rate:	10.00 Hz	1.00 Hz	-
Divert Valve:	Waste	Source	Waste
Mode:	Auto MS/MS	MS	-

End Plate Offset: 500 V  
 Capillary: 3000 V  
 Nebulizer: 4.0 bar  
 Dry Gas: 8.0 L/min  
 Dry Temp: 180 °C  
 Funnel 1 RF: 400.0 Vpp  
 Multipole RF: 400.0 Vpp  
 Quadrupole Ion Energy: 4 eV  
 Low Mass: 150.00 m/z  
 Pre Pulse Storage: 10.0 µs

Basic Stepping Mode

Collision RF: 350.00 – 1600.00 Vpp  
 Transfer Time: 75.0 – 100.0 µs  
 Timing: 50 – 50 %

Calibration (TOF): Formiate Cluster (neg)  
 Zooming: 0.01 %  
 Calibration Mode: HPC

Calibration Segment (Internal): Segment2

Auto MS/MS

Precursor Ions: 4  
 Threshold  
 Absolute: 73 cts  
 Relative: 0 %  
 Smart Exclusion : ON/ 5\*  
 Active Exclusion : ON/ Exclude After 3 Spectra, Release After 0.50 min

Mass Range : 400 – 1200 m/z

## Fragmentation

### Isolation+Fragmentation List

Isol Mass	Isol Width	Coll Energy	Charge Status
500.0	8.00	35.0	1
1000.0	10.00	50.0	1
2000.0	15.00	70.0	1

Fallback Charge: 1

## Basic Stepping Mode

Collision Energy: 100 – 200 %

Timing: 50 – 50 %

## Data Analysis

*Bruker Compass DataAnalysis 4.2*

*QuantAnalysis 2.2*

### **3.2.10 Statistik und Linearität**

#### **3.2.10.1 Statistische Tests**

Mit dem t-Test ist es möglich, durch Beobachtungen einer Stichprobe, Rückschlüsse über Eigenschaften der Mittelwerte intervallskalierter Variablen zu gewinnen (Brosius, 2013).

Zur Berechnung von Mittelwertsunterschieden der FA aus Gesamtprobe und PL-Fraktion sowohl zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 als auch zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 wurde der t-Test für unabhängige Stichproben gewählt.

$$t = \sqrt{n} \cdot \frac{\bar{x} - \mu_0}{s}$$

t = Testgröße

n = Anzahl der Stichproben

$\bar{x}$  = Stichprobenmittelwert

$\mu_0$  = Erwartungswert der Stichproben

s = Stichprobenstandardabweichung

Dabei wird überprüft, ob sich die Mittelwerte der Gruppen hinsichtlich ihrer Grundgesamtheit signifikant voneinander unterscheiden. Zu den Voraussetzungen für einen solchen t-Test zählen neben mindestens intervallskalierten Variablen und einer Normalverteilung auch eine Varianzhomogenität (Brosius, 2013). Diese kann anhand eines F-Tests überprüft werden. Dieser vergleicht die Streuungen um die Mittelwerte der Gruppen miteinander und entscheidet, ob sich diese signifikant voneinander unterscheiden.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

F = Testgröße

$s_{1/2}^2$  = Varianz (Quadrat der Standardabweichung)

### 3.2.10.2 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden die Probennummern herangezogen, welche hinsichtlich der identifizierten unterschiedlichen PL zwischen den verschiedenen Gruppen die höchste Intensität aufwiesen. Mittels MRM konnten dabei Spektren der Fragmentierung dieser spezifischen Zielverbindungen, in einem zuvor vorgegebenen Zeitraum, aufgenommen werden. Die Proben wurden in einer Dreifachbestimmung mit unterschiedlichen Injektionsvolumina gemessen und mit dem Programm *Compass QuantAnalysis 2.2* von Bruker ausgewertet. Dabei wurden die EIC der spezifischen Peaks integriert und die Flächen gegen die gemessenen Injektionsvolumina in einem Diagramm dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Grundcharakterisierung der Proben

Zur Vollständigkeit wurden für alle untersuchten Proben zusätzlich Vollanalysen in Doppelbestimmung durchgeführt. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 5: Ergebnisse der Vollanalysen.

<b>Nr.</b>	<b>Fett [%]</b>	<b>Wasser [%]</b>	<b>Protein [%]</b>	<b>Asche [%]</b>	<b>Summe [%]</b>
<b>1</b>	2,24	74,98	21,61	1,08	99,92
<b>2</b>	2,35	74,32	22,22	1,10	99,99
<b>3</b>	2,94	73,17	22,40	1,08	99,60
<b>4</b>	2,25	74,73	21,55	1,12	99,64
<b>5</b>	2,32	74,52	22,08	1,08	99,99
<b>6</b>	2,51	74,10	22,24	1,11	99,97
<b>7</b>	4,54	72,79	21,71	1,06	100,10
<b>8</b>	5,51	71,57	22,24	1,06	100,37
<b>9</b>	2,93	73,28	22,44	1,11	99,75
<b>10</b>	1,20	75,63	21,81	1,14	99,78
<b>11</b>	2,97	73,22	22,93	1,12	100,24
<b>12</b>	3,65	72,92	22,03	1,10	99,71
<b>13</b>	1,62	74,50	22,91	1,10	100,14
<b>14</b>	1,69	75,20	22,09	1,09	100,07
<b>15</b>	2,76	73,75	21,76	1,06	99,33
<b>16</b>	3,48	73,09	22,24	1,07	99,88
<b>17</b>	3,16	72,29	22,62	1,08	99,14
<b>18</b>	2,94	72,97	22,40	1,09	99,39
<b>19</b>	2,14	74,82	21,80	1,12	99,88
<b>20</b>	4,18	72,13	22,54	1,07	99,92
<b>21</b>	2,61	73,49	22,59	1,14	99,83
<b>22</b>	3,66	72,71	22,79	1,12	100,28

<b>23</b>	2,26	74,05	22,40	1,12	99,84
<b>24</b>	1,69	73,78	23,58	1,14	100,18
<b>25</b>	2,25	73,99	22,51	1,12	99,87
<b>26</b>	5,89	71,26	21,48	1,07	99,70
<b>27</b>	4,74	71,87	21,85	1,09	99,55
<b>28</b>	2,72	73,55	22,34	1,11	99,71
<b>29</b>	1,76	75,09	21,75	1,08	99,69
<b>30</b>	1,62	74,57	22,32	1,13	99,63
<b>31</b>	3,25	73,78	21,75	1,09	99,88
<b>32</b>	4,67	71,81	22,43	1,08	99,98
<b>33</b>	1,79	74,50	22,12	1,13	99,54
<b>34</b>	2,85	74,36	21,21	1,08	99,50
<b>35</b>	2,09	74,72	21,52	1,13	99,47
<b>36</b>	4,24	71,61	22,66	1,12	99,63

Nach Zuordnung der untersuchten Proben in die jeweiligen Fütterungsgruppen, wurden Mittelwerte gebildet und Standardabweichungen berechnet. Diese sind nachfolgend dargestellt.

Tabelle 6: Ergebnisse der Vollanalysen – Zusammenfassung der Gruppen.

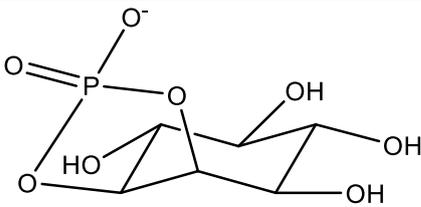
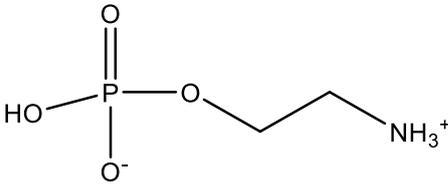
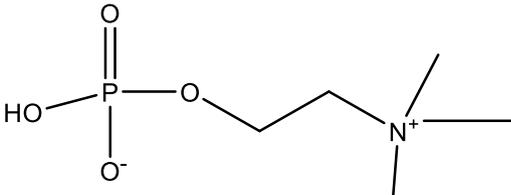
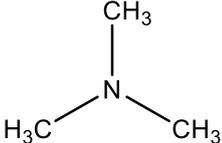
	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>Fett [%]</b>	2,55 ± 1,22	2,88 ± 1,05	3,36 ± 0,93
<b>Protein [%]</b>	22,28 ± 0,58	22,10 ± 0,42	22,20 ± 0,40
<b>Asche [%]</b>	1,11 ± 0,02	1,10 ± 0,03	1,10 ± 0,02
<b>Wasser [%]</b>	73,99 ± 1,13	73,67 ± 1,10	73,10 ± 0,99

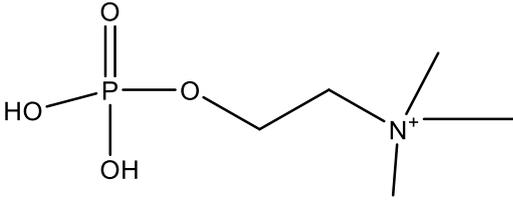
Aus Tabelle 6 wird deutlich, dass mit steigendem Anteil an Getreide im Futtermittel der Tiere auch der prozentuale Fettanteil im Fleisch zugenommen hat.

## 4.2 Methodenübertragung auf Rindfleisch

Aus vorangegangenen Arbeiten (Feulner, 2014) konnte bereits bestätigt werden, dass die verwendete Hybrid SPE-Methode in der Lage ist selektiv PL zu extrahieren. Dazu wurde untersucht, in welchen Fraktionen der Hybrid SPE-Methode der zugesetzte PL-Standard (EIC 764,7 m/z ( $[M + Ac - H] - (M + 60 - 1)$ ) im negativen Ionisationsmodus) nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde eine HPLC/HILIC-Methode für Putenfleisch auf die Trennung der verschiedenen PL-Klassen anhand der nachfolgenden Fragmente überprüft.

Tabelle 7: Typische Fragmente der verschiedenen PL-Klassen.

PL-Klasse	Fragment	Scan mode
<b>PI</b>  (Xia & Jemal, 2009)		EIC 241 m/z neg. Mode
<b>PE/LPE</b>  (Xia & Jemal, 2009)		CNL 141 m/z pos. Mode
<b>PC/SM</b>  (Yang, Zhao, Gross, & Han, 2009)		CNL 183 m/z pos. Mode
<b>PC/LPC/SM</b>  (Fang & Barcelona, 1998)		CNL 59 m/z pos. Mode

<p><b>LPC</b></p> <p><b>(Losito, et al., 2013)</b></p>		<p>EIC 184 m/z</p> <p>pos. Mode</p>
--	--	-------------------------------------

Dabei wurde ein PL-Mix bestehend aus PI, PE, PC und LPC verwendet. Mit Hilfe der Auswertesoftware *Compass DataAnalysis 4.2* von Bruker konnten diese PL-Klassen im positiven als auch im negativen Ionisationsmodus über ihre charakteristischen EIC und Constant Neutral Loss Chromatogramme (CNL) identifiziert werden. Aus späteren Auswertungen der Proben ergaben sich dann zusätzlich die Retentionszeitbereiche für LPE und SM.

Die Einteilung der PL-Klassen konnte wie folgt vorgenommen werden.

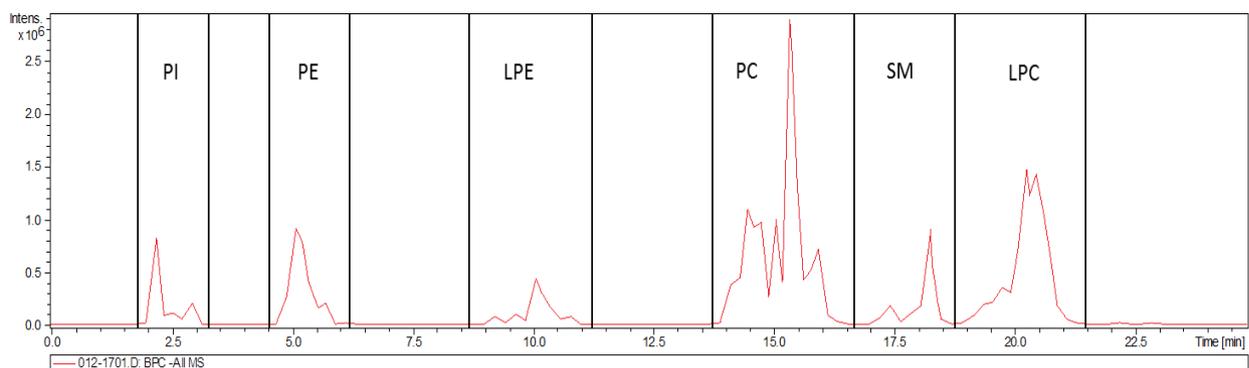


Abbildung 11: Einteilung der PL-Klassen (Feulner, 2014).

Zur Überprüfung, ob diese HPLC/HILIC-Methode auf Rindfleisch übertragbar ist, wurde eine Identifizierung der PL-Klassen exemplarisch anhand einer Rindfleisch-Probe vorgenommen und mit den vorherigen Ergebnissen für Putenfleisch verglichen.

In den nachfolgenden Abbildungen werden die Base Peak Chromatogramme (BPC) (rot dargestellt) im positiven Ionisationsmodus als auch die für die PL-Klassen charakteristischen EIC und CNL (blau dargestellt) abgebildet. Mit Hilfe eines EIC lassen sich ausgewählte m/z-Werte bzw. Massenbereiche, mit einem CNL typische Fragmente, welche durch die Abspaltung von neutralen Fragmenten entstehen, darstellen.

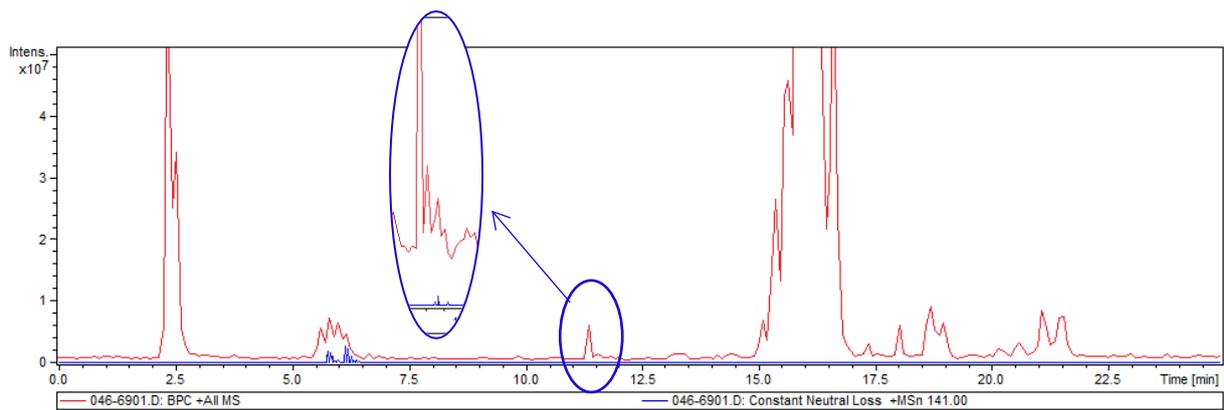
PE/LPE: CNL 141 m/z

Abbildung 12: BPC positiver Ionisationsmodus + CNL 141 m/z All MSn (PE/LPE).

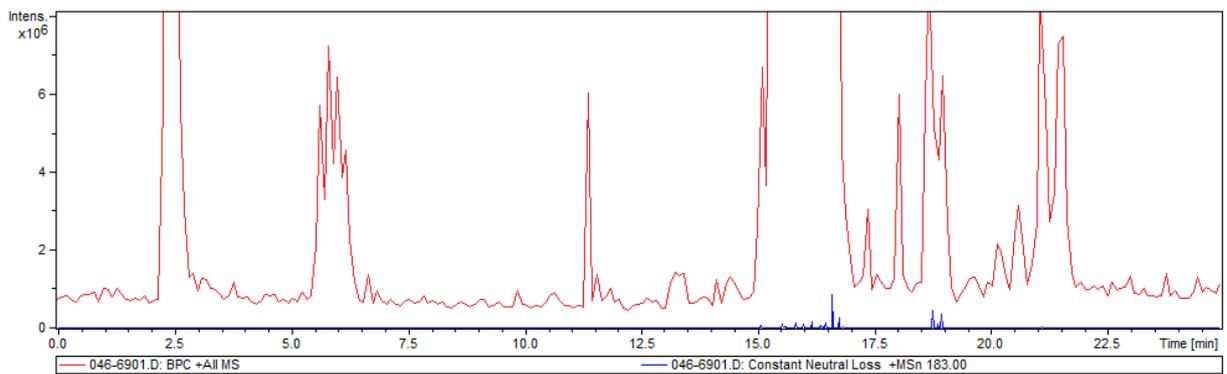
PC/SM: CNL 183 m/z

Abbildung 13: BPC positiver Ionisationsmodus + CNL 183 m/z All MSn (PC/SM).

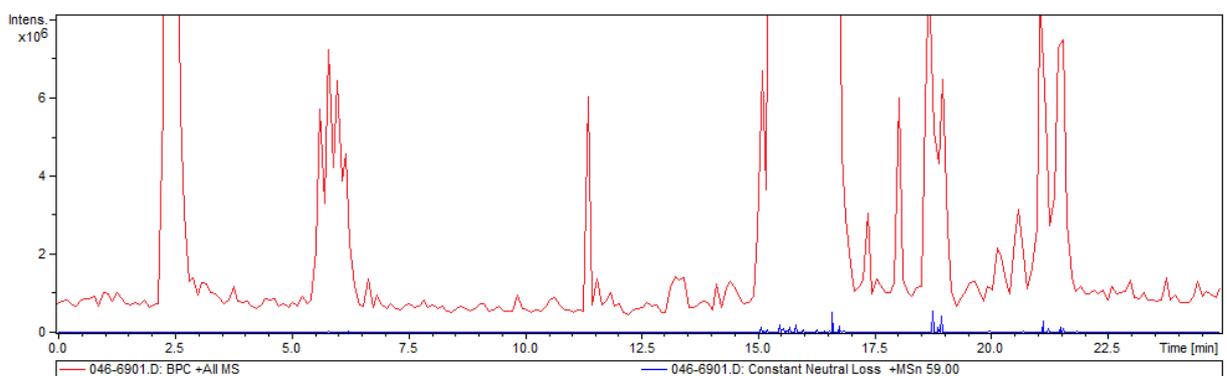
PC/SM/LPC: CNL 59 m/z

Abbildung 14: BPC positiver Ionisationsmodus + CNL 59 m/z All MSn (PC/SM/LPC).

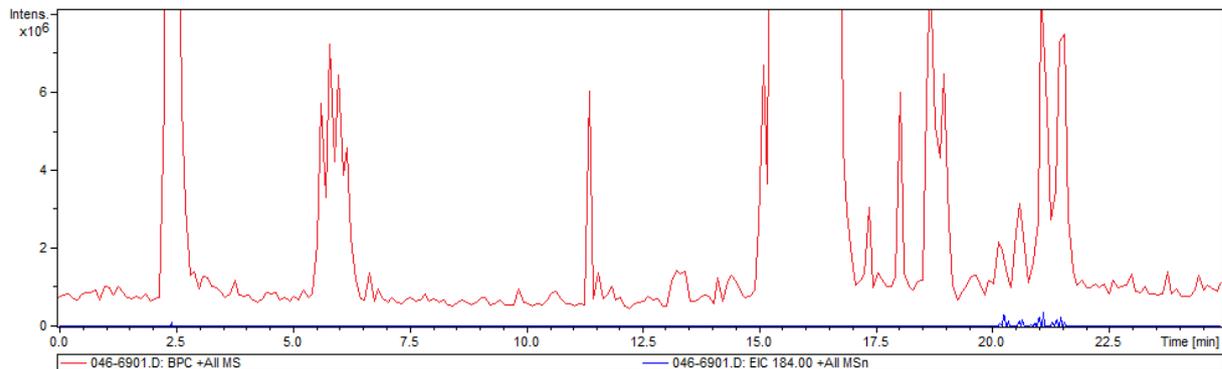
LPC: EIC 184 m/z

Abbildung 15: BPC positiver Ionisationsmodus + LPC 184 m/z All MSn (LPC).

Anhand der EIC und CNL konnten die PL-Klassen PE, PC, SM und LPC erfolgreich identifiziert werden. Ein Nachweis der PI anhand eines EIC von 241 m/z (Inositolphosphat-Ion – H<sub>2</sub>O) war jedoch nicht möglich. Auch konnten LPE nur in sehr wenigen Proben aufgefunden und identifiziert werden.

### 4.3 Vergleich der PL zwischen den Fütterungsgruppen

Zur Auffindung von Unterschieden im Phospholipidmuster zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen wurde die Plattform *XCMS Online* verwendet. Dafür wurden die Rohdaten aus den Ion-Trap-Versuchen im *mzXML*-Format hochgeladen und eine Zwei-Gruppen-Analyse mit dem in Kapitel 3.2.7 festgelegten Parametern durchgeführt. Es wurde dabei sowohl Gruppe 2 als auch Gruppe 3 mit der Kontrollgruppe (Gruppe 1) verglichen. Dabei wurden zunächst alle TIC der beiden Gruppen in einem Diagramm dargestellt. Da sich bei den hier durchgeführten Versuchen keine Abweichungen der Retentionszeiten ergaben, musste dementsprechend keine Retentionszeitkorrektur durchgeführt werden (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Mit dieser Korrektur könnten Proben mit extremen Abweichungen erkannt und aus dem Datensatz entfernt werden (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

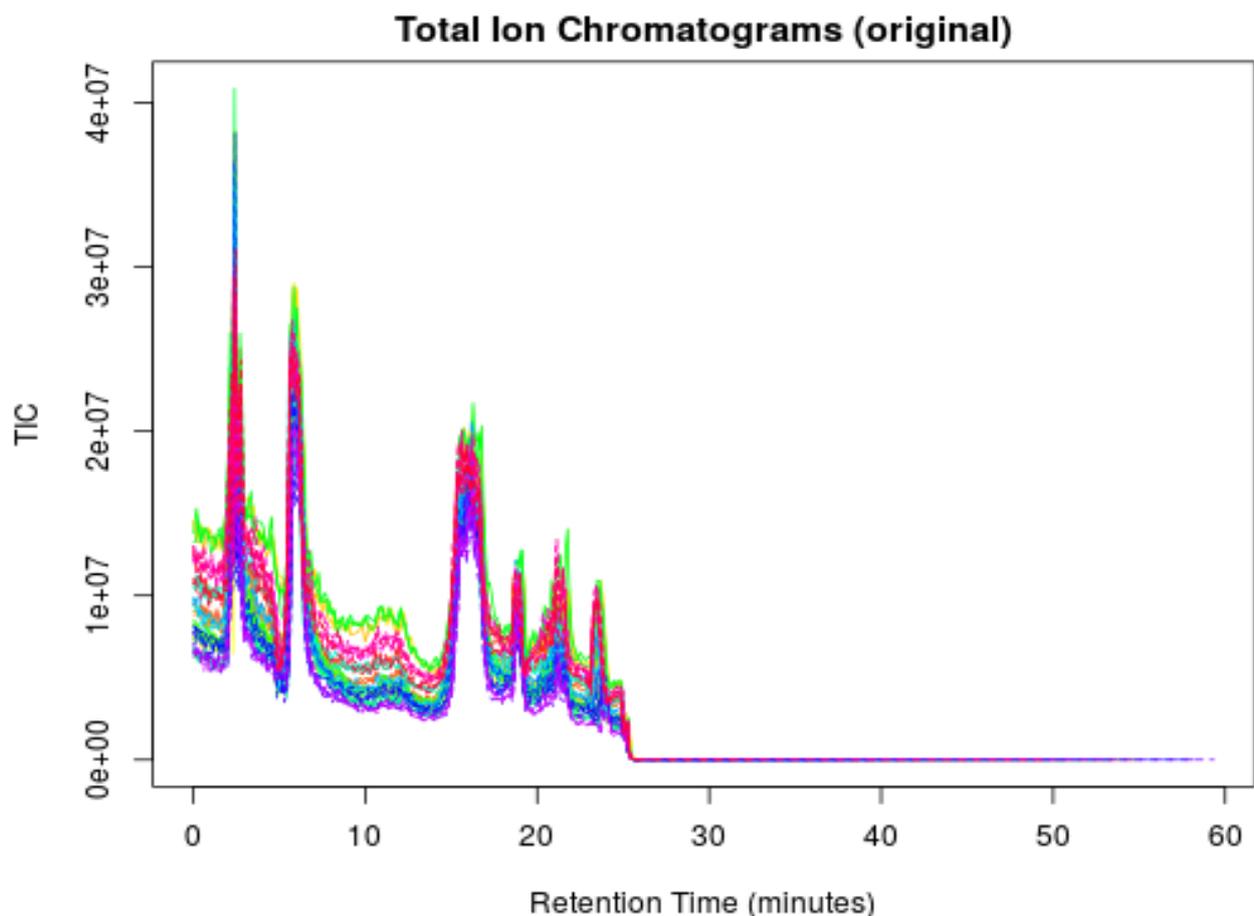


Abbildung 16: TIC Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2.

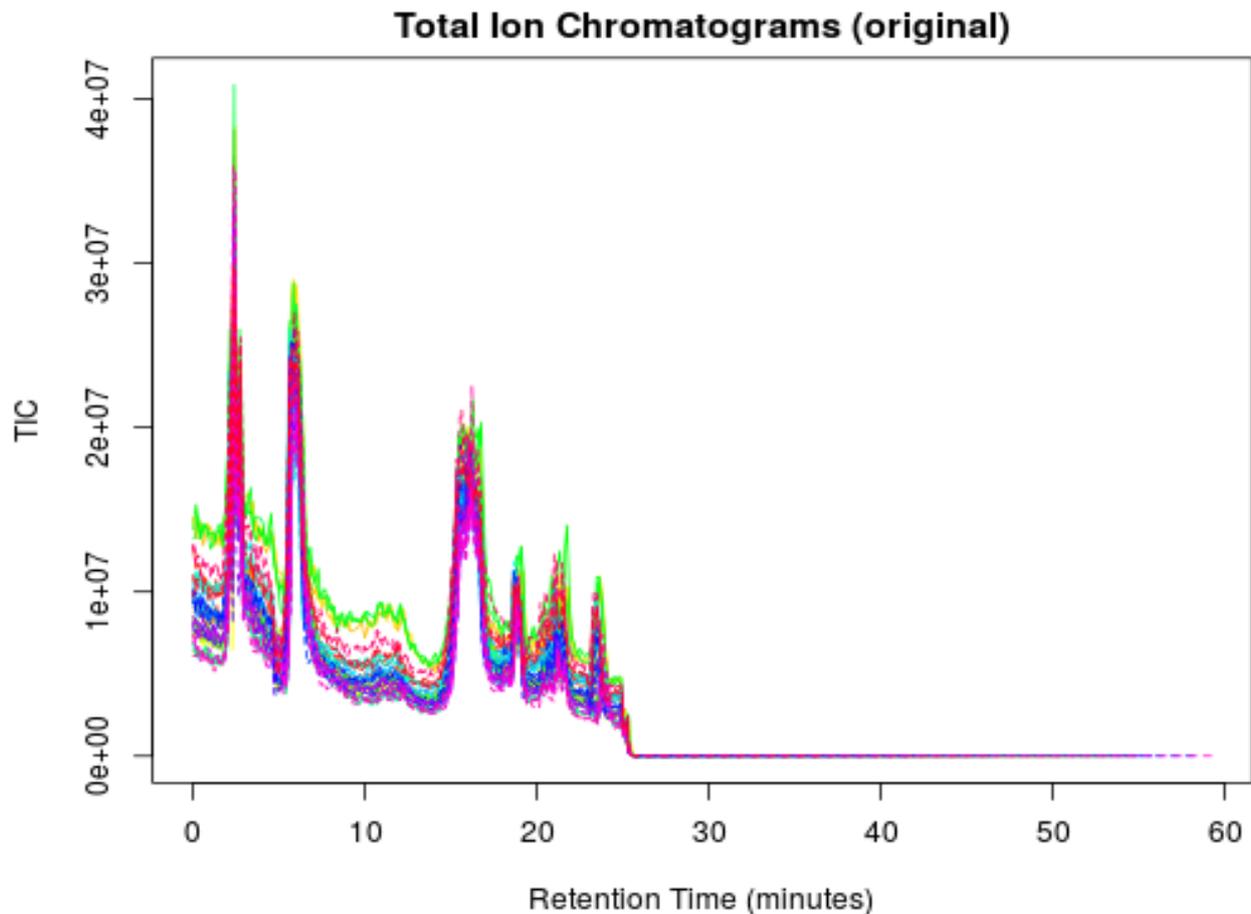


Abbildung 17: TIC Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 3.

Nach Ausgabe der *Result Table*, welche für jede gefundene Verbindung, die sich zwischen den Fütterungsgruppen unterscheidet, unter anderem die mittleren Retentionszeiten, Intensitäten und  $m/z$ -Verhältnisse auflistet, wird zudem aufgezeigt, ob diese Verbindung hoch oder herunterreguliert ist (UP/DOWN). Das bedeutet, dass die Intensität einer herunterregulierten Verbindung in Gruppe 1 höher ist als in Gruppe 2 bzw. 3. Dies wird durch die Darstellung des *Cloud Plots* verdeutlicht, welcher zudem anhand des Farbtons der Kreise die entsprechenden  $p$ -Werte und anhand der Größe den *fold change* dieser Verbindung anzeigt (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012).

Bei dem Vergleich der PL zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 konnten sechs Verbindungen aufgefunden werden, wovon fünf herunterreguliert, d.h. höhere Intensitäten in der Gruppe 1 besaßen. Vergleichend dazu konnten für den Vergleich der Gruppen 1 und 3 elf Verbindungen erhalten werden, bei denen alle herunterreguliert waren. Eine Verbindung konnte dabei weder mittels TOF- noch anhand der Ion-Trap-Daten identifiziert werden.

Tabelle 8: *Result Table* Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2.

fold	pvalue	up/down	mzmed [m/z]	rtmed [min]	maxint	Identifizierung
1,4	0,01841	DOWN	720,6488	5,86	1.958.531	PE P-36:5
1,3	0,03765	DOWN	846,6322	15,90	877.284	PC (18:1/18:0)
1,3	0,00593	DOWN	814,6513	16,27	2.239.711	PC (16:0/18:3)
2,8	0,01044	DOWN	801,6333	16,38	720.511	PG 38:2
1,8	0,04616	UP	802,6346	16,47	1.374.065	PC P-34:1
1,3	0,03056	DOWN	789,7126	18,78	2.372.580	PG 37:1

Tabelle 9: *Result Table* Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 3.

fold	pvalue	up/down	mzmed [m/z]	rtmed [min]	maxint	Identifizierung
1,4	0,00145	DOWN	774,6447	5,67	941.450	PE P-40:6
1,3	0,03444	DOWN	720,6470	5,91	1958531	PE P-36:5
1,4	0,00949	DOWN	696,6760	6,21	1.051.265	PE P-34:3
1,3	0,00156	DOWN	850,6816	15,43	1.532.034	PC O-38:6
1,3	0,00612	DOWN	864,6241	15,51	522.749	PC 38:6
1,2	0,02398	DOWN	822,7013	15,52	2138602	PC P-36:5
1,8	0,00870	DOWN	838,6259	15,71	1.391.949	PC (20:5/16:0)
1,7	0,00502	UP	801,7155	15,97	892.293	-
1,4	0,00260	DOWN	799,6765	16,05	954.786	PG 38:3
1,6	0,00005	DOWN	814,6502	16,32	2.472.919	PC (16:0/18:3)
1,7	0,00396	DOWN	538,5292	20,74	633.733	LPC P-16:0
1,3	0,03643	DOWN	554,5232	21,57	1.808.606	LPC 16:0

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand der TOF-Daten, da es sich dabei um eine hochauflösendere Technik handelt und somit eine genauere Identifizierung möglich war. Dafür wurde die online Datenbank *Lipid Maps* verwendet. Hier konnten die MS/MS-Daten der einzelnen Verbindungen aus *DataAnalysis* im PKL-Format eingetragen werden. Als Parameter wurden eine Vorläufer- und Produkt-Ionen Massentoleranz von  $\pm 0,001$  m/z gewählt. Zudem wurden Ergebnisse, welche nicht mindestens vier Ionenübereinstimmungen aufwiesen, verworfen. Bei den in Tabelle 8 und Tabelle 9 grau

hinterlegten PL handelte es sich um die Identifizierung anhand der TOF-Daten bzw. Ion-Trap-Daten, bei denen keine zweifelsfreie Identifizierung mittels *Lipid Maps* möglich war, d.h. es traten weniger als vier Übereinstimmungen auf bzw. musste eine höhere Massentoleranz gewählt werden. Nachfolgend wird beispielhaft eine Identifizierung mittels *Lipid Maps* dargestellt. Das PL mit der Masse 814,6513 konnte nach Eintragung der MS/MS-Daten als PC (16:0/18:3) identifiziert werden (siehe Tabelle 10). Dabei stehen die grün hinterlegten Felder für Übereinstimmungen der Datenbank mit den vorhandenen MS/MS-Daten.

Tabelle 10: Identifizierung des PL 814,6513 m/z (*Lipid Maps*).

Abbreviation	# of matches	m/z	Description
<a href="#">PC(16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))</a>	10		
		814.56	Precursor ion [M+acetate]-
		740.52 (0.01)	Loss of CH <sub>3</sub> and acetate from precursor ion
		669.45	Loss of choline and acetate from precursor ion
		502.29	Loss of sn1 acyl chain as (RCH=C=O), CH <sub>3</sub> and acetate from precursor ion
		484.28	Neutral loss of sn1 RCOOH group, loss of CH <sub>3</sub> and acetate from precursor ion
		480.31 (0.00)	Loss of sn2 acyl chain as (RCH=C=O), CH <sub>3</sub> and acetate from precursor ion
		462.30 (0.00)	Neutral loss of sn2 RCOOH group, loss of CH <sub>3</sub> and acetate from precursor ion

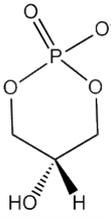
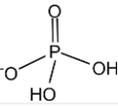
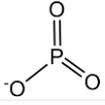
		277.22 (0.00)	sn2 RCOO- ion
		255.23 (0.00)	sn1 RCOO- ion
		224.07 (0.00)	Glycerophosphocholine with loss of CH3 and H2O
		168.04 (0.00)	Phosphocholine with loss of CH3
		153.00 (0.00)	Glycerol-3-phosphate ion with loss of H2O
		96.97	H2PO4- ion
		78.96 (0.00)	PO3- ion

In einer weiteren Tabelle können zusätzlich die Strukturformeln der übereinstimmenden m/z-Werte angezeigt werden (siehe Tabelle 11). Zudem wird die Gesamtstruktur des Phospholipids dargestellt (siehe Abbildung 18).

Tabelle 11: Identifizierung der PL 814,6513 mit Strukturformeln [LipidMaps].

m/z	Ion Description	Structure
814.5604	Precursor ion [M+acetate]-	
740.5236	Loss of CH3 and acetate from precursor ion	

669.4501	Loss of choline and acetate from precursor ion	
502.2939	Loss of sn1 acyl chain as ketene (RCH=C=O), CH3 and acetate from precursor ion	
484.2834	Neutral loss of sn1 RCOOH group, loss of CH3 and acetate from precursor ion	
480.3096	Loss of sn2 acyl chain as ketene (RCH=C=O), CH3 and acetate from precursor ion	
462.2990	Neutral loss of sn2 RCOOH group, loss of CH3 and acetate from precursor ion	
277.2173	sn2 RCOO- ion	
255.2330	sn1 RCOO- ion	
224.0693	Glycerophosphocholine with loss of CH3 and H2O	
168.0431	Phosphocholine with loss of CH3	

152.9958	Glycerol-3-phosphate ion with loss of H <sub>2</sub> O	
96.9696	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ion (from phosphate)	
78.9591	PO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ion (from phosphate)	

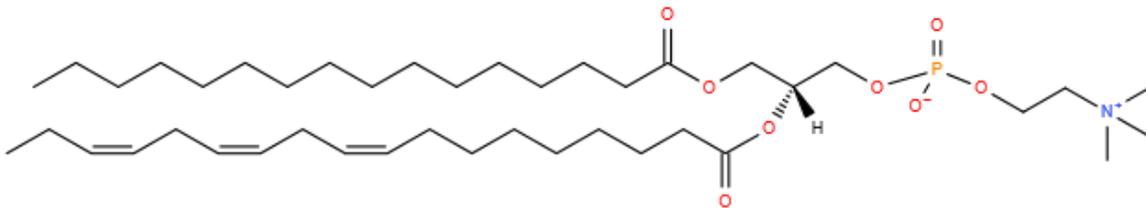


Abbildung 18: Struktur PC (16:0/18:3) [Lipid Maps].

Um zu bestimmen, an welcher Position sich die einzelnen FA befinden, wurde die Methode entsprechend dem Kapitel 3.2.8 angewandt (siehe Abbildung 19). Da das sn-2-Carboxylation meist eine höhere Intensität als das sn-1-Carboxylation besitzt, kann über die entsprechenden Massen die FA-Verteilung bestimmt werden (Brouwers, 2011). Die sn-Verteilung der restlichen PL wurde im Anhang dargestellt (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28)

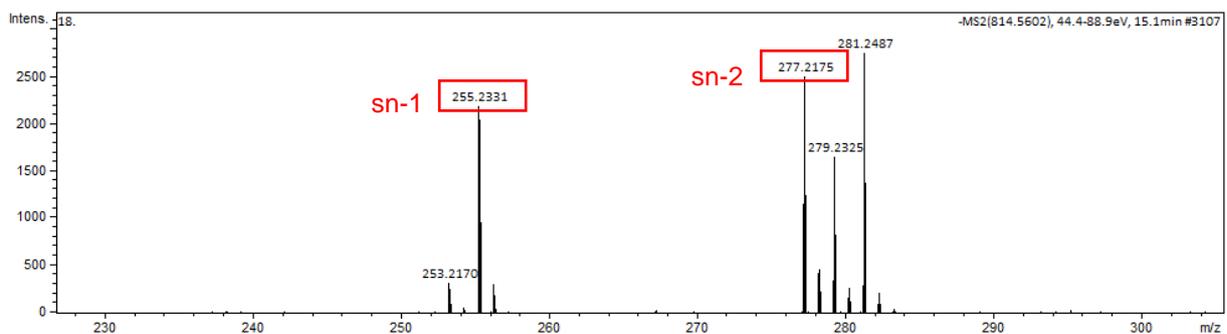


Abbildung 19: Bestimmung der FA-Kettenverteilung des PL PC (16:0/18:3).

Neben der Ausgabe als *Result Table* können die Ergebnisse der Zwei-Gruppen-Analyse mittel *XCMS Online* auch als *Cloud Plot* ausgegeben werden. Während bei der Darstellung als Tabelle auch Ergebnisse mit einem *fold change* kleiner als 1,5 und einem *p*-Wert größer als 0,01 angezeigt wurden, werden in den nachfolgenden *Cloud Plots* nur Verbindungen mit den vorher eingestellten hochsignifikanten Parametern dargestellt. Dabei wurden für den Vergleich der Gruppe 1 und der Gruppe 2 eine Verbindung, für den Vergleich der Gruppe 1 und der Gruppe 3 fünf Verbindungen mit den festgesetzten hochsignifikanten Parametern gefunden. Zu diesen zählen eine Verbindung, welche bereits bei der Aussortierung der *Result Table* als Isotop erkannt wurde und eine Verbindung, welche nicht fehlerfrei identifiziert werden konnte.

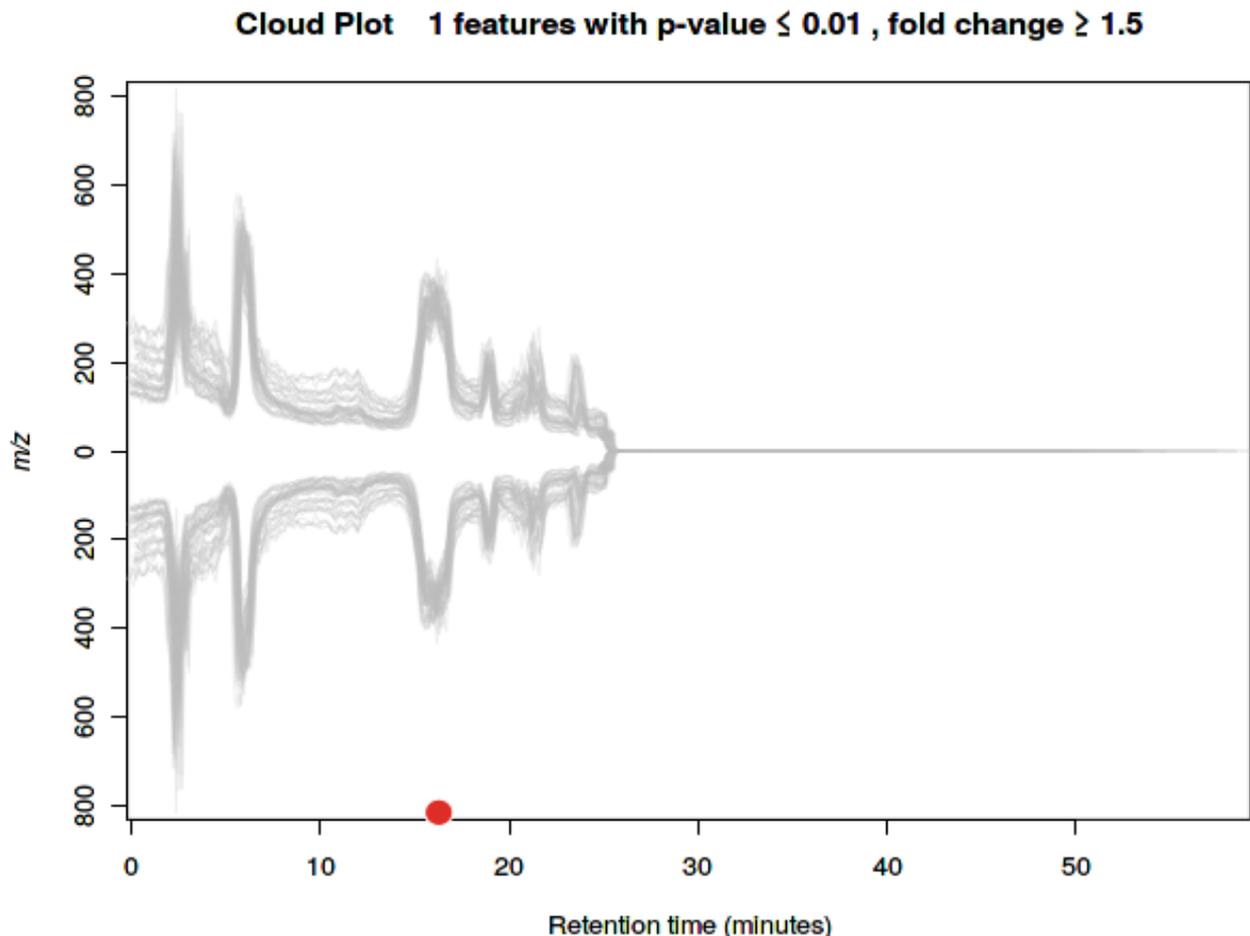


Abbildung 20: *Cloud Plot* Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2.

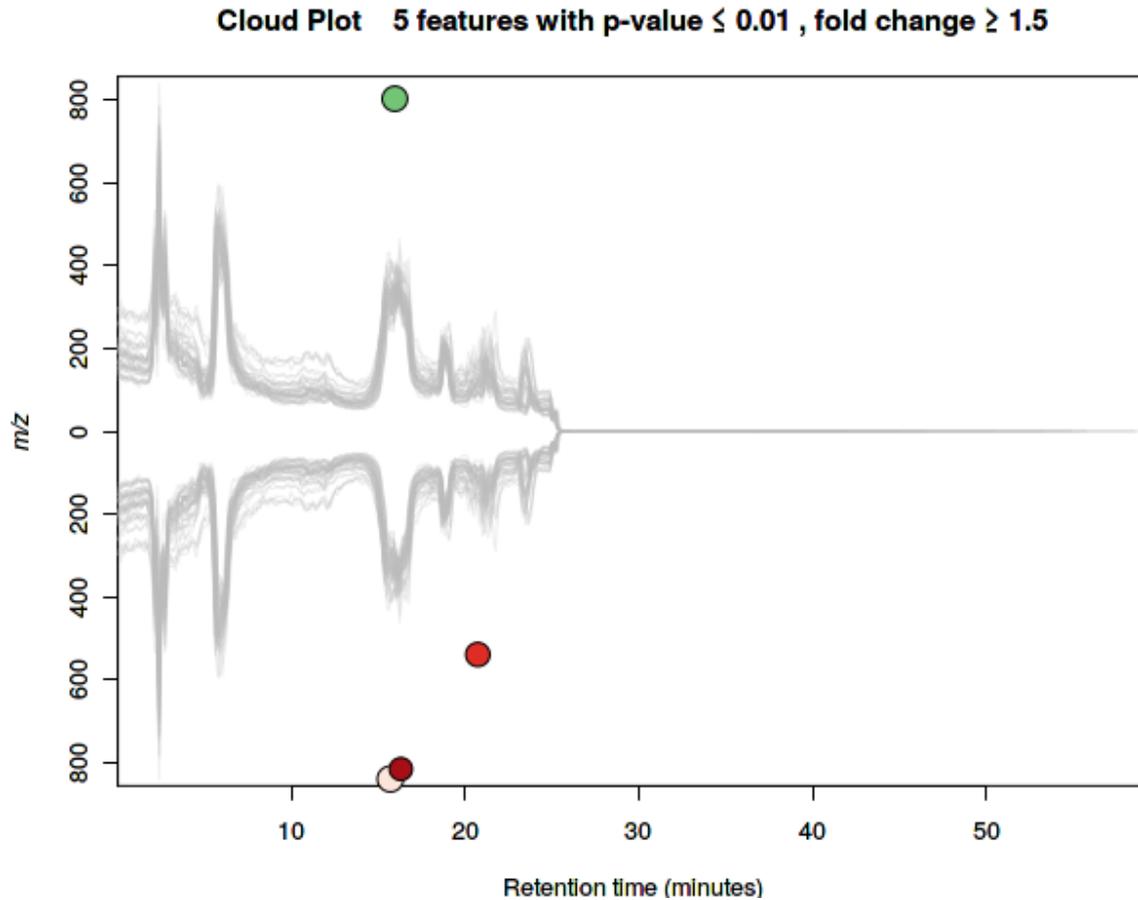


Abbildung 21: *Cloud Plot* Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 3.

Diese hochsignifikanten Ergebnisse, welche einen  $p$ -Wert kleiner 0,01 und einen *fold change* größer als 1,5 besitzen, wurden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 12: *Result Table* Vergleich der PL – Gruppe 1 und Gruppe 2 – Gruppe 1 und Gruppe 3 mit festgesetzten Parametern.

fold	pvalue	up/down	mzmed [m/z]	rtmed [min]	maxint	Identifizierung
2,8	0,01044	DOWN	801,6333	16,38	720.511	PG 38:2
1,8	0,00870	DOWN	838,6259	15,71	1.391.949	PC (20:5/16:0)
1,7	0,00502	UP	801,7155	15,97	892.293	-
1,6	0,00005	DOWN	814,6502	16,32	2.472.919	PC (16:0/18:3)
1,7	0,00396	DOWN	538,5292	20,74	633.733	LPC P-16:0

Das Variationsmuster jeder Verbindung innerhalb des Gruppenvergleichs kann über das entsprechende EIC veranschaulicht werden. Ein Beispiel für ein solches EIC ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Die EICs der restlichen Verbindungen wurden im Anhang abgebildet (siehe Abbildung 29 - Abbildung 44).

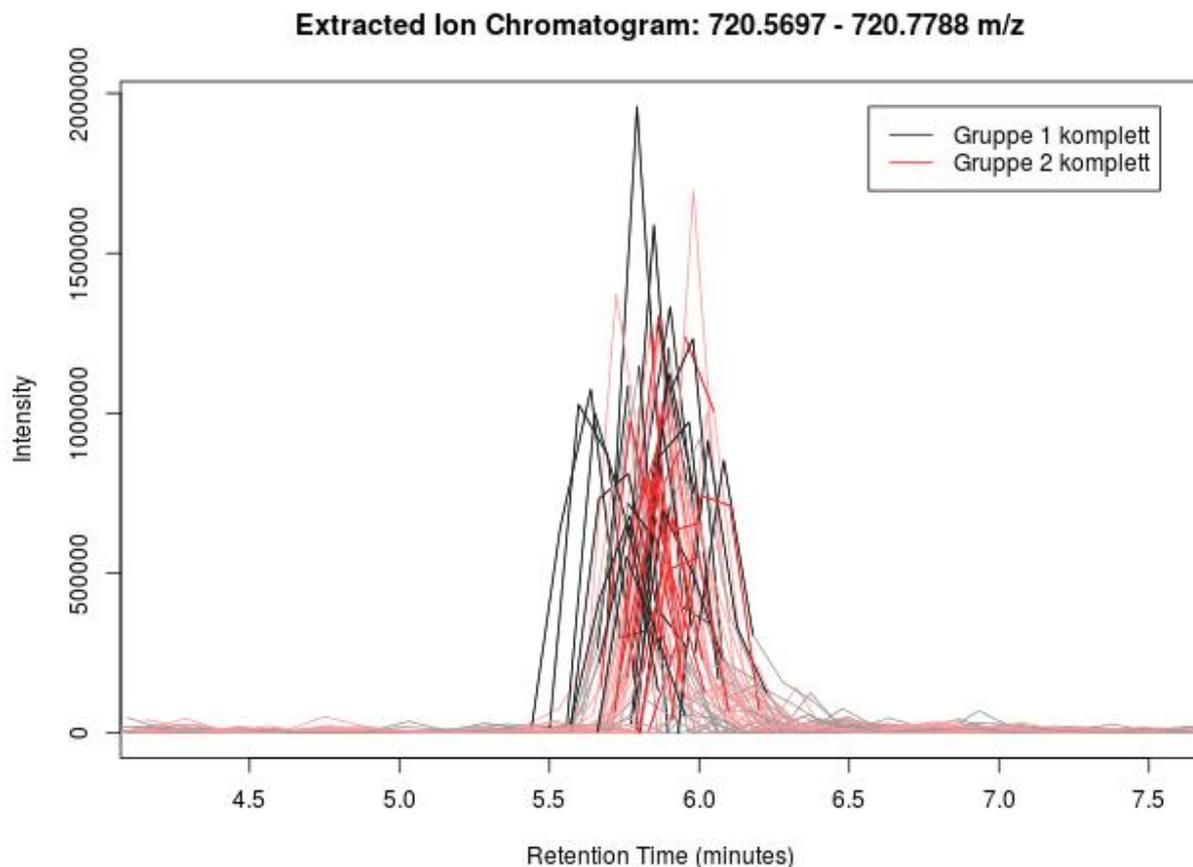


Abbildung 22: EIC 720,5697 – 730,7788 m/z.

Da es mit *XCMS Online* nicht möglich war, anhand des entsprechenden EIC der Vorläufer-Ionen der Verbindung, die Probennummer mit der höchsten Intensität herauszufinden, wurde erneut das Programm *DataAnalysis* verwendet. Diese Proben wurden dann für die darauffolgenden Kalibrierungen verwendet.

Die Verbindungen mit der entsprechenden Probennummer der höchsten Intensität sind für beide Gruppenvergleiche in den nachfolgenden zwei Tabellen dargestellt.

Tabelle 13: Zuordnung der Verbindungen zur Probennummer mit höchster Intensität – Gruppe 1 – Gruppe 2.

fold	pvalue	up/down	mzmed [m/z]	rtmed [min]	maxint	Identifizierung	Nr.
1,4	0,01841	DOWN	720,6488	5,86	1.958.531	PE P-36:5	<b>26b</b>
1,3	0,03765	DOWN	846,6322	15,90	877.284	PC (18:1/18:0)	<b>33b</b>
1,3	0,00593	DOWN	814,6513	16,27	2.239.711	PC (16:0/18:3)	<b>25b</b>
2,8	0,01044	DOWN	801,6333	16,38	720.511	PG 38:2	<b>24b</b>
1,8	0,04616	UP	802,6346	16,47	1.374.065	PC P-34:1	<b>36b</b>
1,3	0,03056	DOWN	789,7126	18,78	2.372.580	PG 37:1	<b>31a</b>

Tabelle 14: Zuordnung der Verbindungen zur Probennummer mit höchster Intensität – Gruppe 1 – Gruppe 3.

fold	pvalue	up/down	mzmed [m/z]	rtmed [min]	maxint	Identifizierung	Nr.
1,4	0,00145	DOWN	774,6447	5,67	941.450	PE P-40:6	<b>31b</b>
1,3	0,03444	DOWN	720,6470	5,91	1958531	PE P-36:5	<b>26b</b>
1,4	0,00949	DOWN	696,6760	6,21	1.051.265	PE P-34:3	<b>31b</b>
1,3	0,00156	DOWN	850,6816	15,43	1.532.034	PC O-38:6	<b>22a</b>
1,3	0,00612	DOWN	864,6241	15,51	522.749	PC 38:6	<b>2b</b>
1,2	0,02398	DOWN	822,7013	15,52	2138602	PC P-36:5	<b>22b</b>
1,8	0,00870	DOWN	838,6259	15,71	1.391.949	PC (20:5/16:0)	<b>22b</b>
1,7	0,00502	UP	801,7155	15,97	892.293	-	-
1,4	0,00260	DOWN	799,6765	16,05	954.786	PG 38:3	<b>26a</b>
1,6	0,00005	DOWN	814,6502	16,32	2.472.919	PC (16:0/18:3)	<b>25b</b>
1,7	0,00396	DOWN	538,5292	20,74	633.733	LPC P-16:0	<b>2a</b>
1,3	0,03643	DOWN	554,5232	21,57	1.808.606	LPC 16:0	<b>2a</b>

#### 4.4 Linearität und Kalibrierungsbereich

Um die Linearität einer analytischen Methode zu überprüfen, sollte diese innerhalb eines gegebenen Bereiches Testergebnisse liefern, welche direkt proportional zur Konzentration bzw. der Menge des Analyten in der Probe sind. Anhand einer Regression kann die Art der Abhängigkeit zwischen Variablen charakterisiert werden. Zu diesen Variablen zählen die erhaltenen Messwerte (Peakflächen) und die verschiedenen Konzentrationen bzw. Mengen des Analyten. Dabei stellt die lineare Regression die am einfachsten und häufigsten eingesetzte funktionelle Abhängigkeit dar. Der Grad der Abhängigkeit zwischen den Variablen einer Kalibrierfunktion kann durch einen Korrelationskoeffizienten ( $R$ ) angegeben werden (Kromidas, 2011).

Mittels *Multiple Reaction Monitoring* konnte für die Kalibrierung anhand einer zweifachen Selektion der Ionen eine sehr hohe Empfindlichkeit erreicht werden. Dazu müssen vorab jedoch sowohl das Masse/Ladungs-Verhältnis des Vorläufer- als auch des Produkt-Ions, welches die höchste Intensität besitzt, bekannt sein. Diese sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 15: Massen der Vorläufer- und Produkt-Ionen für MRM – Gruppe 1 – Gruppe 2.

fold	pvalue	up/down	Identifizierung	Nr.	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]
1,4	0,01841	DOWN	PE P-36:5	26b	720,6503	303,0985
1,3	0,03765	DOWN	PC (18:1/18:0)	33b	846,6684	772,5498
1,3	0,00593	DOWN	PC (16:0/18:3)	25b	814,6736	740,6882
2,8	0,01044	DOWN	PG 38:2	24b	801,6799	726,6686
1,8	0,04616	UP	PC P-34:1	36b	802,6965	728,6407
1,3	0,03056	DOWN	PG 37:1	31a	789,7279	715,6878

Tabelle 16: Massen der Vorläufer- und Produkt-Ionen für MRM – Gruppe 1 – Gruppe 3.

fold	pvalue	up/down	Identifizierung	Nr.	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]
1,4	0,00145	DOWN	PE P-40:6	31b	774,6503	329.2072
1,3	0,03444	DOWN	PE P-36:5	26b	720,6503	303.0985
1,4	0,00949	DOWN	PE P-34:3	31b	696,683	277.1256
1,3	0,00156	DOWN	PC O-38:6	22a	850,6686	776.5577
1,3	0,00612	DOWN	PC 38:6	2b	864,6275	790.6017
1,2	0,02398	DOWN	PC P-36:5	22b	822,7259	748.6635
1,8	0,00870	DOWN	PC (20:5/16:0)	22b	838,6132	764.6002
1,4	0,00260	DOWN	PG 38:3	26a	799,6619	724.7010
1,6	0,00005	DOWN	PC (16:0/18:3)	25a	814,7319	740.6992
1,7	0,00396	DOWN	LPC P-16:0	2a	538,5311	464.4034
1,3	0,03643	DOWN	LPC 16:0	2a	554,5021	480.3744

Die Injektionsvolumina wurden zwischen 1 µL und 10 µL (1 µL, 3 µL, 5 µL, 7 µL, 10 µL) bzw. für Probe 2b zwischen 11 µL und 20 µL (11 µL, 13 µL, 15 µL, 17 µL, 20 µL) gewählt, da diese im ersten Kalibrierungsbereich keine Linearität aufwies. Für Probe 26b konnte bis zu einem Injektionsvolumen von 50 µL kein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Injektionsvolumen nachgewiesen werden. Für alle Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Mittels des Programms *Compass QuantAnalysis 2.2* von Bruker konnten anschließend, nach Eintragung der Masse/Ladungs-Verhältnisse der Vorläufer- und Produkt-Ionen, sowie der Retentionszeiten die Peakflächen der entsprechenden EIC gegen das Injektionsvolumen aufgetragen werden. Nachfolgend wird beispielhaft anhand der Probe 2a eine solche Kalibrierung mit Angabe des Korrelationskoeffizienten dargestellt. Die Kalibrierungen der restlichen Proben wurden im Anhang abgebildet (siehe Abbildung 45 - Abbildung 57). Messungen, welche sich außerhalb der Genauigkeitsgrenze von 20 % befanden, wurden für die Bestimmung des linearen Zusammenhangs vernachlässigt.

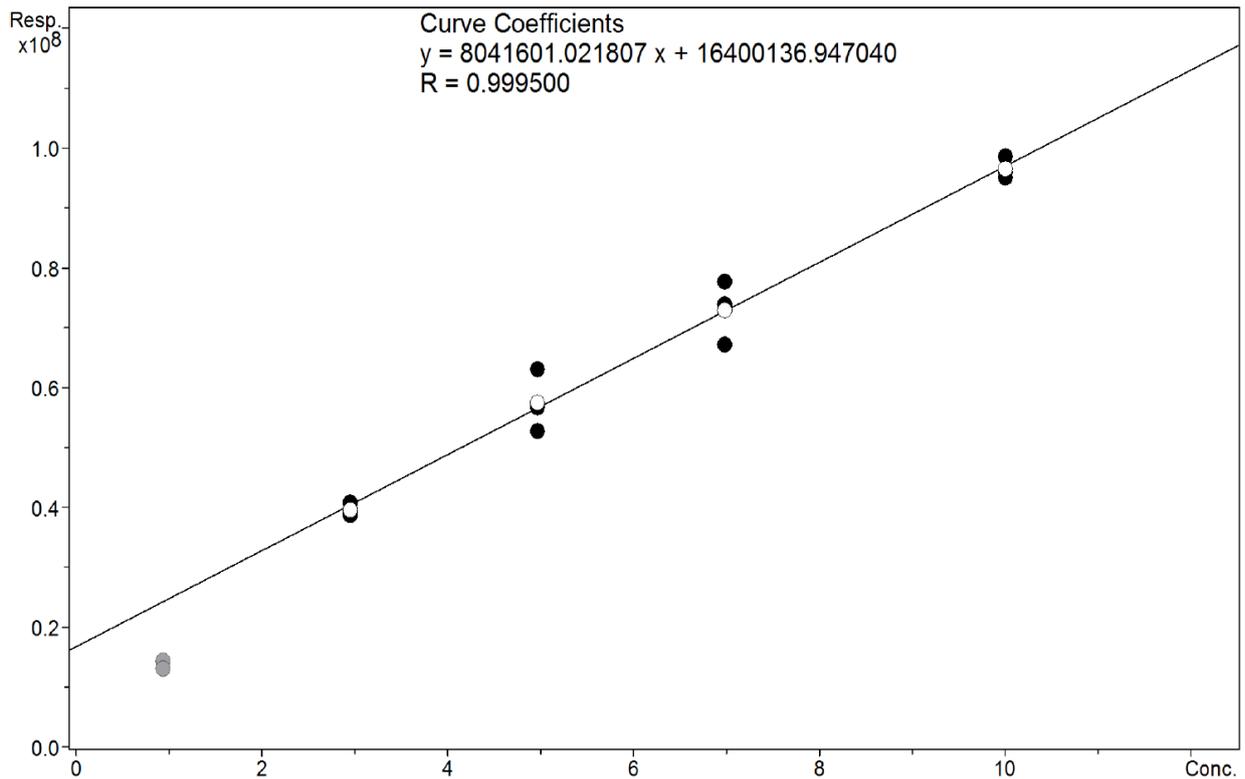


Abbildung 23: Kalibrierung der Probe 2a (LPC 16:0).

Für alle Proben, mit Ausnahme der Probe 31a ( $R = 0,9819$ ), konnten Korrelationskoeffizienten von 0,995 und höher erreicht werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Kalibrierung.

	PL	Volumen	Gleichung	R
<b>2a</b>	LPC 16:0	1 – 10 µL	$y = 8,0 \cdot 10^6 + 1,6 \cdot 10^7$	0,9995
<b>2a</b>	LPC P-16:0	1 – 10 µL	$y = 1,7 \cdot 10^6 + 3,8 \cdot 10^6$	0,9963
<b>2b</b>	PC 38:6	11 – 20 µL	$y = 7,2 \cdot 10^5 + 3,9 \cdot 10^6$	0,9996
<b>22a</b>	PC O-38:6	1 – 10 µL	$y = 7,5 \cdot 10^5 + 8,1 \cdot 10^6$	0,9990
<b>22b</b>	PC P-36:5	1 – 10 µL	$y = 2,3 \cdot 10^6 + 2,3 \cdot 10^7$	0,9998
<b>22b</b>	PC (20:5/16:0)	1 – 10 µL	$y = 1,3 \cdot 10^6 + 8,5 \cdot 10^6$	0,9957
<b>24b</b>	PG 38:2	1 – 10 µL	$y = 8,2 \cdot 10^6 - 4,6 \cdot 10^5$	0,9970
<b>25a</b>	PC (16:0/18:3)	1 – 10 µL	$y = 6,6 \cdot 10^6 - 4,7 \cdot 10^5$	0,9999
<b>26a</b>	PG 38:3	1 – 10 µL	$y = 6,7 \cdot 10^7 - 1,3 \cdot 10^6$	0,9991
<b>26b</b>	PC P-36:5			

<b>31a</b>	PG 37:1	1 – 10 µL	$y = 1,4 \cdot 10^6 + 4,0 \cdot 10^7$	0,9819
<b>31b</b>	PE P-40:6	1 – 10 µL	$y = 1,7 \cdot 10^4 + 1,0 \cdot 10^5$	0,9998
<b>31b</b>	PE P-34:3	1 – 10 µL	$y = 1,1 \cdot 10^4 + 2,7 \cdot 10^5$	0,9955
<b>33b</b>	PC (18:1/18:0)	1 – 10 µL	$y = 2,8E06 - 2,0E06$	0,9953
<b>36b</b>	PC P-34:1	1 – 10 µL	$y = 9,6E06 - 4,0E06$	0,9971

#### 4.5 Vergleich der gesamten FA zwischen den Fütterungsgruppen

Nach Durchführung der Fettsäureanalytik (siehe Tabelle 18) des gesamten Fettes konnten drei FA identifiziert werden, welche sich prozentual deutlich von den restlichen FA unterschieden. Zu diesen zählten neben C16:0, C18:0 und C16:1 cis n-7 auch die FA C18:1 cis n-9, welche einen Anteil von mehr als 86 % der gesamten FA einnahmen.

Tabelle 18: Fettsäuremuster (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen.

FA [%]	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
<b>12:0</b>	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02
<b>14:0</b>	2,66 ± 0,49	2,99 ± 0,43	2,91 ± 0,41
<b>15:0</b>	0,66 ± 0,11	0,62 ± 0,10	0,51 ± 0,07
<b>16:0</b>	27,40 ± 20,8	28,34 ± 1,49	28,50 ± 1,05
<b>16:1 trans n-7</b>	0,33 ± 0,05	0,28 ± 0,05	0,25 ± 0,06
<b>16:1 cis n-7</b>	3,04 ± 0,49	3,19 ± 0,58	3,14 ± 0,59
<b>17:0</b>	1,26 ± 0,08	1,20 ± 0,13	1,09 ± 0,13
<b>18:0</b>	16,82 ± 1,34	17,10 ± 1,58	17,13 ± 1,70
<b>18:1 trans n-9</b>	0,29 ± 0,09	0,20 ± 0,10	0,16 ± 0,09
<b>18:1 cis n-9</b>	37,97 ± 1,87	37,96 ± 1,35	38,64 ± 1,97
<b>18:1 cis n-7</b>	1,42 ± 0,16	1,33 ± 0,14	1,31 ± 0,14
<b>18:2 trans n-6</b>	0,30 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02
<b>18:2 cis n-6</b>	2,34 ± 0,99	2,08 ± 0,67	2,16 ± 0,77
<b>19:0</b>	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
<b>18:3 cis n-3</b>	1,92 ± 0,57	1,5 ± 0,36	1,28 ± 0,40
<b>18:2 cis 9 trans 11</b>	0,76 ± 0,11	0,69 ± 0,11	0,61 ± 0,12

<b>20:0</b>	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01
<b>20:1 cis n-9</b>	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,03
<b>21:0</b>	0,73 ± 0,28	0,58 ± 0,21	0,52 ± 0,20
<b>20:3 cis n-6</b>	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,02
<b>20:3 cis n-3</b>	0,13 ± 0,09	0,09 ± 0,05	0,08 ± 0,05
<b>20:4 cis n-3</b>	0,61 ± 0,19	0,42 ± 0,14	0,36 ± 0,16
<b>20:5 cis n-3</b>	0,05 ± 0,06	0,05 ± 0,06	0,02 ± 0,03
<b>22:1 cis n-11</b>	0,10 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,08 ± 0,06
<b>22:4 cis n-6</b>	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02
<b>24:0</b>	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02
<b>22:5 cis n-3</b>	0,74 ± 0,21	0,54 ± 0,16	0,49 ± 0,16
<b>Gesamt</b>	100,05 ± 17,43	100,01 ± 7,91	100,01 ± 8,30

Nach Einteilung der FA in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte FA (siehe Tabelle 19) wird deutlich, dass mit Zunahme der Getreidemenge im Futtermittel der Anteil an PUFA sinkt. Der prozentuale Gehalt an MUFA blieb annähernd konstant, während der Anteil an SFA innerhalb der Gruppen 2 und 3 leicht schwankte, jedoch eine Zunahme im Gegensatz zur Kontrollgruppe ersichtlich war (siehe Abbildung 24).

Tabelle 19: Einteilung des Fettsäuremusters (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen.

<b>FA [%]</b>	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>gesättigte FA</b>	49,86 ± 4,47	51,17 ± 4,03	50,96 ± 3,63
<b>einfach ungesättigte FA</b>	43,26 ± 2,75	43,15 ± 2,28	43,71 ± 2,93
<b>mehrfach ungesättigte FA</b>	6,93 ± 2,30	5,69 ± 1,60	5,34 ± 1,74

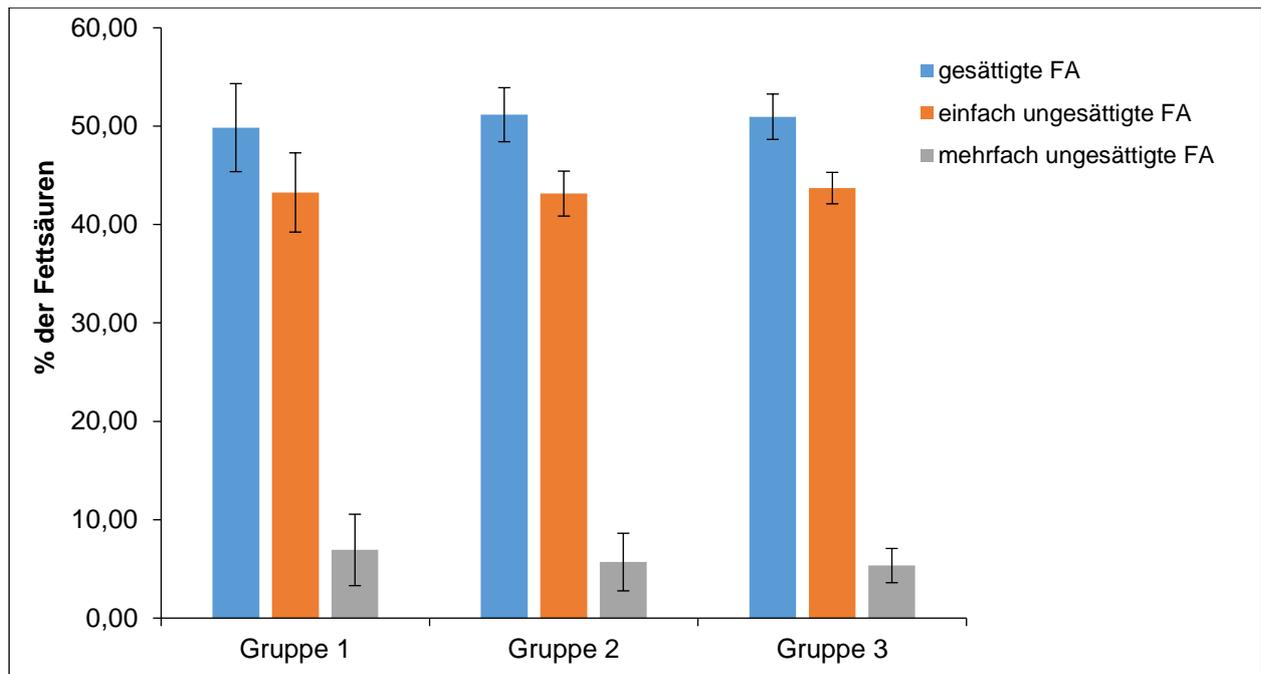


Abbildung 24: Fettsäuremuster der verschiedenen Fütterungsgruppen.

Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) hinsichtlich der FA C16:1 trans n-7, C18:1 trans n-9, C18:3 cis n-3, C20:4 cis n-3, C24:0 und C22:5 cis n-3. Dabei war der Prozentsatz aller dieser FA in der Kontrollgruppe (Gruppe 1), welche ausschließlich mit Grassilage gefüttert wurden, signifikant höher im Gegensatz zur Gruppe 2.

Zudem ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3, neben den bereits oben aufgeführten FA, hinsichtlich der FA C15:0, C17:0, C18:2 trans n-6, C19:0 und C18:2 CLA cis 9 trans 11. Auch diese FA besaßen einen höheren Prozentsatz in Gruppe 1.

#### 4.6 Vergleich der FA der PL-Fraktion zwischen den Fütterungsgruppen

Aus dem FA-Profil der PL-Fraktion (siehe Tabelle 20) ergaben sich sechs FA, welche sich prozentual deutlich von den restlichen FA abhoben. Zu diesen zählten C16:0, C16:1 trans n-7, C18:0, C18:1 cis n-9, C18:2 cis n-6 und C18:3 cis n-3. Diese machten fast 90 % der gesamten FA aus.

Tabelle 20: Fettsäuremuster der PL-Fraktion (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen.

FA [%]	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
<b>14:0</b>	0,12 ± 0,41	0,18 ± 0,32	0,24 ± 0,35
<b>15:0</b>	0,47 ± 0,36	0,23 ± 0,28	0,24 ± 0,37
<b>16:0</b>	29,07 ± 3,06	27,97 ± 2,20	28,98 ± 3,39
<b>16:1 trans n-7</b>	2,02 ± 0,50	1,81 ± 0,35	1,66 ± 0,38
<b>16:1 cis n-7</b>	5,91 ± 2,19	6,50 ± 2,23	6,38 ± 2,27
<b>17:0</b>	0,88 ± 0,31	0,74 ± 0,24	0,81 ± 0,10
<b>18:0</b>	6,51 ± 0,96	6,04 ± 1,62	6,06 ± 1,40
<b>18:1 cis n-9</b>	31,8 ± 3,40	30,96 ± 3,49	33,85 ± 4,17
<b>18:1 cis n-7</b>	0,87 ± 0,51	0,79 ± 0,47	1,05 ± 0,11
<b>18:2 cis n-6</b>	8,81 ± 2,85	10,18 ± 2,31	9,94 ± 2,07
<b>18:3 cis n-3</b>	6,42 ± 1,88	6,52 ± 1,63	5,03 ± 1,85
<b>18:2 cis 9 trans 11</b>	0,28 ± 0,33	0,30 ± 0,31	0,11 ± 0,24
<b>21:0</b>	2,51 ± 0,77	2,82 ± 0,69	2,56 ± 0,43
<b>20:3 cis n-6</b>	0,35 ± 0,35	0,48 ± 0,34	0,61 ± 0,23
<b>20:4 cis n-3</b>	0,50 ± 0,43	0,49 ± 0,36	0,26 ± 0,31
<b>20:5 cis n-3</b>	2,30 ± 0,66	0,49 ± 0,64	1,97 ± 0,42
<b>22:5 cis n-3</b>	2,00 ± 0,63	2,06 ± 0,54	1,90 ± 0,33
<b>Gesamt</b>	100,85 ± 19,58	100,43 ± 18,00	101,65 ± 18,41

Nach Einteilung dieser FA in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte FA (siehe Tabelle 21) ist in allen diesen Klassen kein Trend zu erkennen, welcher mit

dem zunehmenden Getreideanteil im Futtermittel im Zusammenhang steht (siehe Abbildung 25). Zudem war, verglichen mit dem FA-Profil des gesamten Fettes, eine deutlich höhere Standardabweichung zu erkennen.

Tabelle 21: Einteilung des Fettsäuremusters der PL-Fraktion (% der Fettsäuren) der verschiedenen Fütterungsgruppen.

FA [%]	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
<b>gesättigte FA</b>	39,57 ± 5,87	37,98 ± 5,35	38,91 ± 6,04
<b>einfach ungesättigte FA</b>	40,62 ± 6,60	40,06 ± 6,53	42,93 ± 6,94
<b>mehrfach ungesättigte FA</b>	20,66 ± 7,12	22,39 ± 6,12	19,81 ± 5,44

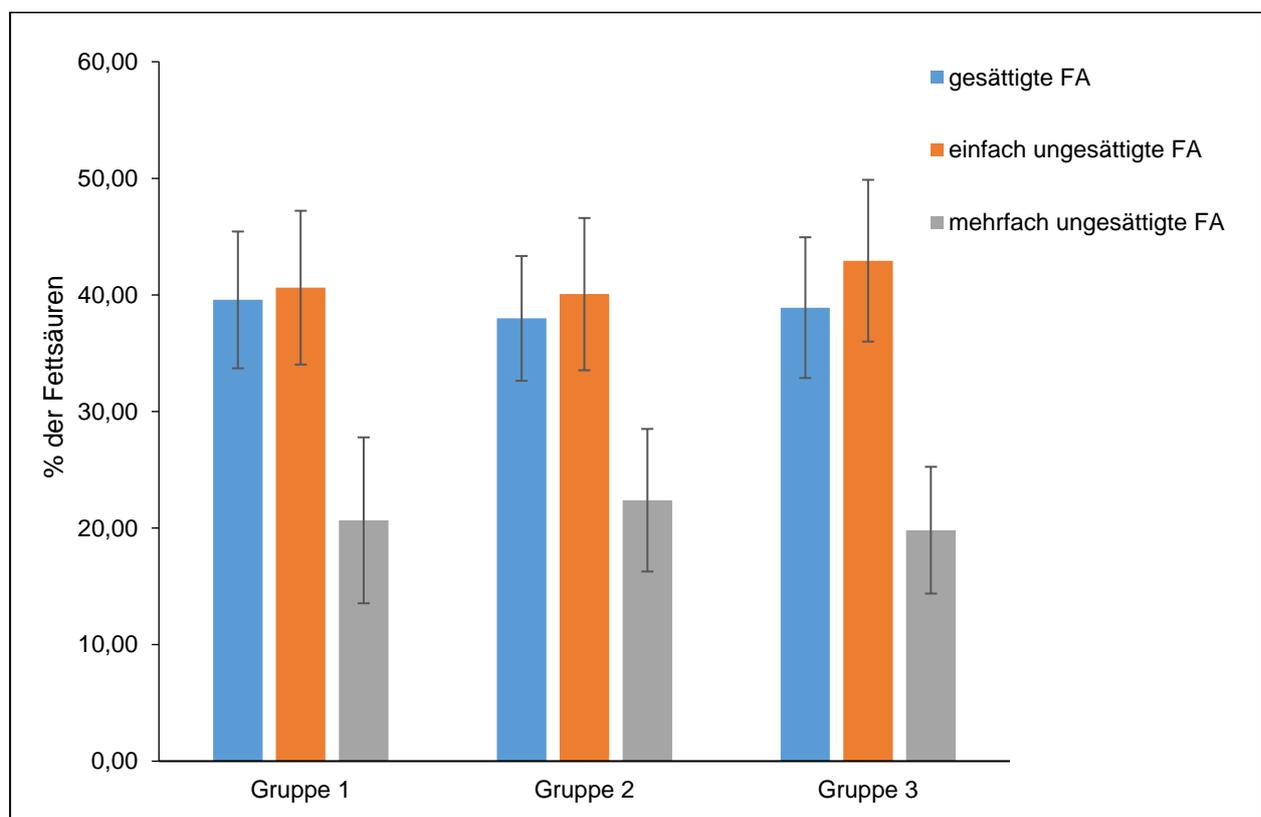


Abbildung 25: Fettsäuremuster der PL-Fraktion der verschiedenen Fütterungsgruppen.

Hinsichtlich des Vergleichs der Gruppe 1 und Gruppe 2 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der FA.

Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 trat eine FA (C20:3 cis n-6) auf, welche einen signifikant höheren Prozentsatz in Gruppe 3 gegenüber Gruppe 1 aufwies.

#### 4.7 Vergleich der gesamten FA mit den FA der PL-Fraktion

Aus dem Vergleich des FA-Profiles des gesamten Fettes mit dem der PL-Fraktion (siehe Abbildung 26) wird deutlich, dass der prozentuale Anteil der PUFA der PL-Fraktion mehr als dreimal so hoch ausfiel, im Gegensatz zu dem des gesamten Fettes. Der prozentuale Anteil der MUFA ergab keinen deutlichen Unterschied zwischen den FA-Profilen, während der Anteil an SFA in der PL-Fraktion ca. 20 % verringerte.

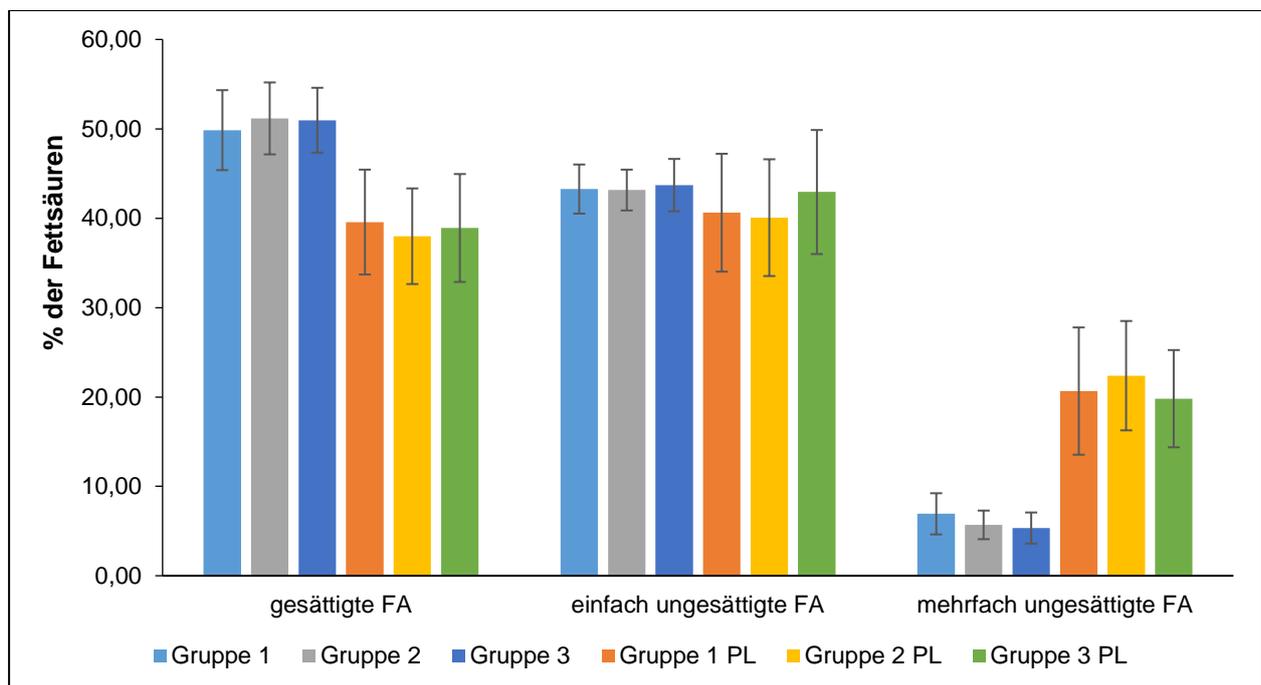


Abbildung 26: Vergleich der gesamten FA mit den FA der PL-Fraktion.

## 5 Diskussion

### 5.1 Grundcharakterisierung

Nach Durchführung von Vollanalysen konnte eine Zunahme des Fettanteils mit einer Steigerung des Getreideanteils im Futtermittel beobachtet werden. Da Getreide im Gegensatz zu Gras höhere Energiekonzentrationen enthält, führte dies zu Schlachtkörpern, welche ein schwereres Körpergewicht aufwiesen (siehe Tabelle 22). Dies hatte zudem die Folge eines höheren Gehalts an intramuskulären Fett (Nürnberg, et al., 2005) (Przybylski & Hopkins, 2015).

Tabelle 22: Anfangsgewicht, Stallendgewicht und Energieaufnahme im Mittel der Fütterungsgruppen (persönliche Mitteilung Dr. D. A. Brüggemann).

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>Anfangsgewicht [kg]</b>	358 ± 47	358 ± 53	356 ± 48
<b>Stallendgewicht [kg]</b>	677 ± 53	706 ± 63	738 ± 62
<b>Energieaufnahme [MJ ME/Tag]</b>	87,1 ± 9,2	93,8 ± 8,6	100,6 ± 9,6
<b>Fett [%]</b>	2,55 ± 1,22	2,88 ± 1,05	3,36 ± 0,93

### 5.2 Methodenübertragung

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Übertragung einer bereits für Putenfleisch erarbeiteten analytischen Methode (Feulner, 2014) zur Bestimmung von Phospholipiden. Dabei erfolgte die Aufreinigung der extrahierten Phospholipide mit Hilfe einer Hybrid-Festphasenextraktion. Die Übertragbarkeit wurde anschließend massenspektrometrisch bestätigt. Anhand von EIC und CNL von typischen Fragmenten aus der Literatur erfolgte die Zuordnung der PL-Klassen ausgehend von einer Rindfleisch-Probe. Dabei konnten die PL-Klassen PE, PC, SM und LPC erfolgreich identifiziert werden. Der Nachweis von PI anhand des EIC 241 m/z (Inositolphosphat – H<sub>2</sub>O) war nicht möglich. Im negativen Ionisationsmodus sowie unter geringer Energiezufuhr ergeben sich, ausgehend von der Häufigkeit, für PI folgende Hauptfragmentierungswege: der Verlust von freien Fettsäuresubstituenten ( $[M - H - R_xCOOH]^-$ ), der neutrale Verlust der entsprechenden Ketene

([M – H – R'<sub>x</sub>CH=C=O] - ), gefolgt von dem Verlust der Inositol-Kopfgruppe (Hsu & Turk, 2000). Somit tritt das Signal für die m/z 241 seltener auf, wodurch das EIC schwächer wird und sich eine Identifizierung über dieses Fragment als schwierig erweist. Die Zuordnung der PL-Klassen führte zu plausiblen Ergebnissen, welche sich mit denen aus vorherigen Arbeiten (Feulner, 2014) vergleichen lassen. Die Hybrid-SPE / HPLC/HILIC-Methode für Putenfleisch eignete sich somit auch für Rindfleisch-Proben, um PL-Extrakte aufzureinigen sowie die PL-Fraktion zuverlässig in die einzelnen PL-Klassen aufzutrennen.

### 5.3 PL-Profil

Zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen ergaben sich Unterschiede hinsichtlich des PL-Profiles. Diese konnten innerhalb der PL-Klassen PG, PE, PC und LPC verzeichnet werden. Nach Larick et al., (1989) stellt die PC+LPE-Fraktion die vorherrschende PL-Klasse mit ca. 60 % der gesamten PL dar, gefolgt von der LPC-Fraktion mit etwa 21 % und der PE-Fraktion mit ca. 7 %. Dabei ergaben sich jedoch keine Unterschiede in den Peakflächen der einzelnen PL-Klassen, noch der gesamten PL, durch die unterschiedlichen Fütterungsbedingungen. Es veränderten sich jedoch einzelne PL durch die verschiedenen Fütterungen. Dabei konnten drei PL, auch hinsichtlich ihrer FA-Kettenverteilung, identifiziert werden: PC (16:0/18:3), PC (20:5/16:0) und PC (18:1/18:0). Die Intensitäten waren in allen Fällen in der Kontrollgruppe höher. Larick et al., (1989) beobachteten, dass Rinder, welche mit Getreide und Gras gefüttert wurden, höhere Konzentrationen an Palmitinsäure (C16:0) und  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3) in der PC+LPE-Fraktion, im Gegensatz zu Rindern, welche ausschließlich mittels Getreide gefüttert wurden, aufwiesen. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass mit gesteigertem Anteil an Gras im Futtermittel sich der Gehalt dieser FA in der PL-Klasse PC+LPE erhöht. Somit führte die verwendete Zweigruppenanalyse mittels *XCMS Online* zu plausiblen Ergebnissen hinsichtlich der Unterschiede im PL-Profil der verschiedenen Fütterungsgruppen. Das PL PC (16:0/18:3) wies in beiden Gruppenvergleichen eine höhere Intensität in Gruppe 1 auf. Anhand dieser Ergebnisse, welche sich zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 als signifikant ( $p < 0,05$ ) und zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 als hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) herausstellten, könnte dieses PL als Indikator für eine zusätzliche Getreidefütterung angesehen werden.

Die FA-Kettenverteilung der restlichen PL, welche sich signifikant zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen unterschieden, konnten, durch das Fehlen entscheidender Fragmente, nicht bestimmt werden. Zu diesen zählen im negativen Ionisationsmodus Carboxylationen (R1-COO und R2-COO) oder Fragmentationen, welche die sn-1- und sn-2-Gruppen als neutrale Bruchstücke verloren haben (Brouwers, 2011).

## 5.4 Relative Quantifizierung

Nach der Feststellung, welche PL im Vergleich der Gruppen signifikante Unterschiede aufweisen sollte festgestellt werden, ob diese mittels MRM quantifizierbar wären.

Bis auf eine Ausnahme konnte für alle PL, anhand ihrer Vorläufer- und Produktionen, ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des Analyten (variiert über das Injektionsvolumen) und der Peakfläche nachgewiesen werden. Für das PL PC P-36:5 gelang dies jedoch bis zu einem Injektionsvolumen von 50  $\mu\text{L}$  nicht. Das könnte durch die geringen Intensitäten der dazugehörigen Peaks zu erklären sein. Nach mehrmaligen Messen nahm die Intensität weiter ab. Dies und die hohe Anzahl an Doppelbindungen weisen auf eine eventuelle Oxidation der Probe hin. Ungesättigte FA, welche an PL verestert sind, stellen die Hauptziele für Modifikationen durch oxidativen Stress dar (Reis & Spickett, 2012). In ungesättigten Acylketten weisen die Wasserstoffatome an Methylengruppen, welche unmittelbar an Doppelbindungen gebunden sind, niedrige Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungsenergien auf und diejenigen, welche sich an Methylengruppen zwischen zwei Doppelbindungen befinden besitzen sogar noch niedrigere. Dies macht sie besonders leicht angreifbar durch reaktive Radikalspezies (Reis & Spickett, 2012).

## 5.5 FA-Profil

### 5.5.1 Gesättigte FA

Zu den Haupt-FA der SFA zählten neben der Palmitinsäure (C16:0) auch Stearinsäure (C18:0). Diese zählen in Fleisch generell zu den vorherrschenden SFA (Kerry, Kerry, & Ledward, 2002). SFA können einen Gehalt von 35 – 50% annehmen (Preedy, Srirajakanthan, & Patel, 2013). Innerhalb der gesamten FA konnte eine leichte Zunahme

der SFA der Gruppe 2 und 3 (ca. 51 %) im Gegensatz zur Kontrollgruppe (ca. 50 %) verzeichnet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen nach Ponnampalam, et al., (2006), danach führt Getreidefütterung bei Rindern sowohl zu einer Erhöhung des gesamten Fettanteils als auch zu einer Zunahme der Menge an SFA. Um dabei deutlichere Resultate zu verzeichnen, müsste der Anteil an Getreide im Futtermittel weiter erhöht werden.

Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in den SFA der gesamten FA zwischen der Vergleichsgruppe (Gruppe 1) und Gruppe 2 konnte hinsichtlich der FA 24:0 beobachtet werden. Im Vergleich zur Gruppe 3 konnte zusätzlich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) für die FA C15:0, C17:0, C19:0 und C24:0 gefunden. Bei all diesen FA besaß die Kontrollgruppe einen höheren prozentualen Anteil. Die Ergebnisse der kurzkettigen FA stimmen mit denen nach Garcia et al., (2008) und Larick et al., (1989) überein. Demnach führt Grasfütterung zu einem signifikant höheren Anteil an C15:0 und C17:0, während durch den Getreidezusatz im Futtermittel der Anteil an C16:0 und C18:0 ansteigt.

### 5.5.2 Einfach ungesättigte FA

Fleisch enthält in der Regel einen Gehalt von 30 – 50 % an MUFA (Preedy, Srirajakanthan, & Patel, 2013). Sowohl innerhalb der PL-Fraktion als auch der gesamten FA wurde ein Wert von ca. 40 % erreicht. Dieser nahm, mit steigendem Getreideanteil im Futtermittel zu, was mit den Ergebnissen nach Decalzo et al., (2005) übereinstimmt. Demnach enthält Getreide-gefüttertes Rindfleisch den höchsten Prozentsatz an MUFA. Ölsäure (C18:1 cis n-9) stellt nicht nur innerhalb der Gruppe der MUFA, sondern auch hinsichtlich der gesamten FA, die FA dar, welchen den höchsten prozentualen Anteil in Rindfleisch aufweist (Daley, Abbott, Doyle, Nader, & Larson, 2010) (Preedy, Srirajakanthan, & Patel, 2013). Diese nahm sowohl in der PL-Fraktion als auch innerhalb der gesamten FA einen Anteil von > 30 % an.

Zwischen den Fütterungsgruppen ergaben sich, innerhalb der gesamten FA, signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) hinsichtlich der FA C16:1 trans n-7 und C18:1 trans n-9. Diese wiesen einen höheren Prozentsatz in Gruppe 1 auf. Das Ergebnis stimmt mit dem nach Nürnberg et al., (2005) überein. Demnach führt Grasfütterung zu einem höheren Anteil

an C18:1 trans-Isomeren. Außerdem verringert sich damit der Gehalt an Ölsäure (C18:1 cis n-9), was sich jedoch als nicht signifikant herausstellte (Daley, Abbott, Doyle, Nader, & Larson, 2010).

### 5.5.3 Mehrfach ungesättigte FA

Die wichtigsten PUFA in konventionellen Rindfleisch sind Linolsäure (C18:2),  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3), welche auch als essentielle FA bezeichnet werden und langkettige FA einschließlich Arachidonsäure (C20:4), Eicosapentaensäure (C20:5), Docosapentaensäure (C22:5) und Docosahexaensäure (C22:6) (Daley, Abbott, Doyle, Nader, & Larson, 2010). Der Gesamtanteil an PUFA verringerte sich innerhalb der gesamten FA mit zunehmenden Getreideanteil im Futtermittel von 7 % auf 5 %. Diese Abnahme wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Decalzo, et al., 2005) (Garcia, et al., 2008).

Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) innerhalb der gesamten FA konnte zwischen Gruppe 1 und Gruppen 2 hinsichtlich der FA C18:3 cis n-3, C20:4 cis n-3 und C22:5 cis n-3 beobachtet werden. Zusätzlich zu diesen konnten zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 ein signifikanter Unterschied zwischen den FA C18:2 trans n-6 und C18:2 CLA cis9 trans11 erreicht werden. Alle aufgeführten FA erreichten einen höheren prozentualen Anteil innerhalb der Kontrollgruppe. Sowohl Garcia et al., (2008) als auch Nürnberg, et al., (2005) erhielten durch Grasfütterung einen höheren Anteil an C18:3 n-3 im Vergleich zu Getreidefütterung. Ponnampalam et al., (2006) konnte einen signifikant höheren Anteil an langkettigen n-3 FA wie C22:5 und C20:4 mittels Grasfütterung erreichen.

Der Gehalt an PUFA innerhalb der PL-Fraktion (ca. 20 %) unterscheidet sich deutlich von dem der gesamten FA (ca. 6 %), was mit den Ergebnissen nach Larick et al., (1989) übereinstimmt. Da sich die FA der PL-Fraktion nur hinsichtlich einer FA (C20:3 cis n-6) signifikant unterschieden (höherer Gehalt in Gruppe 3), kann davon ausgegangen werden, dass die Fütterung keinen bzw. nur einen sehr geringen Einfluss auf die FA-Verteilung der PL-Fraktion nimmt. Dies ist vergleichbar mit den Resultaten nach Scollan et al., (2001).

Zu den essentiellen Fettsäuren in der menschlichen Ernährung gehören  $\alpha$ -Linolensäure, eine n-3-FA und Linolsäure, eine n-6-FA. Da der menschliche Körper diese FA nicht

selbst synthetisieren kann, diese aber entscheidend für die menschliche Gesundheit sind, müssen essentielle FA mit der Nahrung aufgenommen werden. Sowohl  $\alpha$ -Linolensäure also auch Linolsäure gehören zu der Gruppe der PUFA und dienen als Vorläufer anderer wichtiger Verbindungen. Der Überschuss einer dieser FA-Familie kann den Metabolismus der anderen beeinträchtigen, die Einlagerung in Gewebelipide verringern und deren allgemeine biologische Wirkung verändern (Daley, Abbott, Doyle, Nader, & Larson, 2010). Tabelle 23 zeigt die Einteilung der gesamten FA in n-3- und n-6-FA. Dabei wird deutlich, dass sowohl der Anteil an n-3- als auch an n-6-FA mit zunehmendem Gehalt an Getreide im Futtermittel sinkt. Grasfütterung führt damit zu einem bevorzugteren n-6 / n-3-Verhältnis (Daley, Abbott, Doyle, Nader, & Larson, 2010)

Tabelle 23: Fettsäuremuster (% der Fettsäuren) nach Einteilung in n-3- und n-6-FA.

<b>FA [%]</b>	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>n-3</b>	3,45	2,59	2,23
<b>n-6</b>	2,72	2,42	2,49
<b>n-6 / n-3-Verhältnis</b>	0,79	0,93	1,12

## 6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der Grundcharakterisierung der Proben, welche anhand von Vollanalysen durchgeführt wurde, der steigende Anteil an Getreide im Futtermittel den prozentualen Fettanteil im Fleisch erhöhte. Dies konnte mit der höheren Energiekonzentration des Getreides erklärt werden, welche zu einem höheren Körpergewicht der Tiere und zu einem höheren Gehalt an intramuskulärem Fett führte (Nürnberg, et al., 2005) (Przybylski & Hopkins, 2015).

Die HPLC/HILIC-Methode für Putenfleisch konnte erfolgreich auf Rindfleisch übertragen werden. Es gelang eine zuverlässige Auftrennung der PL-Fraktion in die einzelnen PL-Klassen, welche durch EIC und CNL typischer Fragmente der Klassen aus Literaturquellen identifiziert werden konnte. Dabei wurden vorwiegend PE, LPE, PC, SM und LPC nachgewiesen. Die untersuchten Fütterungsgruppen unterschieden sich hinsichtlich einzelner PL.

Anhand einer Zweigruppen-Analyse, welche mittels *XCMS Online* durchgeführt wurde, konnten signifikante Unterschiede innerhalb der PL-Klassen PG, PE, PC und LPC bestimmt werden. Dabei konnten drei PL vollständig identifiziert werden. Deren FA-Kettenverteilung im negativen Ionisationsmodus konnte anhand der Intensitäten der Carboxylationen (R1-COO und R2-COO) bestimmt werden. Das sn-2-Carboxylation besitzt dabei in der Regel eine höhere Intensität als das sn-1-Carboxylation (Brouwers, 2011). Dies konnte aufgrund fehlender Fragmente nicht für alle PL durchgeführt werden. In allen Fällen konnte eine höhere Intensität innerhalb der Gruppe 1 aufgefunden werden. Anhand der drei identifizierten PL und Literaturvergleich, konnte bestätigt werden, dass die durchgeführte Analyse mittel *XCMS Online* zu plausiblen Ergebnissen führte. Ein identifiziertes PL konnte in beiden Gruppenvergleichen aufgefunden werden. Dabei wurde zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) und zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 ein hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Somit könnte dieses PL (PC (16:0/18:3)) möglicherweise einen zuverlässigen Indikator für eine zusätzliche Getreidefütterung darstellen. Dies müsste jedoch anhand weiterer Untersuchungen bestätigt werden.

Für alle PL, welche sich signifikant innerhalb der Fütterungsgruppen unterschieden, wurden Kalibrierungen durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen der Menge des Analyten und der Peakfläche nachzuweisen. Aufgrund von eventuellen Oxidationen an

den Doppelbindungen der FA konnte dies jedoch nicht für alle Proben erfolgreich durchgeführt werden.

Nach Untersuchung des FA-Profiles der Fütterungsgruppen stellten sich innerhalb der gesamten FA mehrere FA heraus, welche sich signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen unterschieden. Somit besitzt die Fütterung einen Einfluss auf das FA-Profil der gesamten FA. Im Gegensatz dazu führen verschiedene Futtermittel zu keiner signifikanten Änderung des FA-Zusammensetzung innerhalb der PL-Fraktion. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen nach Scollan et al., (2001).

Getreidefütterung führt bei Rindern zu einer Erhöhung der gesättigten FA, vor allem hinsichtlich der FA Palmitin- und Stearinsäure (C16:0 und C18:0), welche in Fleisch generell zu den vorherrschenden FA zählen (Kerry, Kerry, & Ledward, 2002) (Ponnampalam, Mann, & Sinclair, 2006). Innerhalb der MUFA führt Grasfütterung sowohl zu einem höheren Anteil an C18:1 trans-Isomeren als auch zu einem niedrigeren Gehalt an Ölsäure (C18:1 cis n-9) (Daley, Abbott, Doyle, Nader, & Larson, 2010) (Nürnberg, et al., 2005). Charakteristisch für die Klasse der PUFA ist deren höherer Gehalt innerhalb der PL-Fraktion im Gegensatz zu den gesamten FA (Larick & Turner, 1989).

## 7 Literaturangaben

- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, S. 198 - 207.
- Ahmad, S., Kalra, H., Gupta, A., Raut, B., Hussain, A., & Rahman, M. (2012). HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 4(4), S. 267 - 275.
- Akoh, C. (2008). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology* (3. Ausg.). Florida: CRC Press.
- Aksu, M., Dogan, M., & Sirkecioglu, A. (2017). Changes in the Total Lipid, Neutral Lipid, Phospholipid and Fatty Acid Composition of Phospholipid Fraction during Pastirma Processing, a Dry-Cured Meat Product. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(1), S. 18 - 28.
- Ardrey, B. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Aurand, C., Trinh, A., Ye, M., & Mi, C. (2008). Introducing Hybrid SPE-Precipitation Technology for Pharmaceutical Bioanalytical Sample Preparation. *Supelco Analytical*, 26.3, S. 3 - 6.
- Boselli, E., Pacetti, D., Curzi, F., & Frega, N. (2008). Determination of phospholipid molecular species in pork meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and evaporative light scattering detection. *Meat Science*, 78, S. 305 - 313.
- Brosius, F. (2013). *SPSS 21*. Heidelberg: mitp.
- Brouwers, J. (2011). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phospholipids. Chromatography, ionization and quantification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), S. 763 - 775.
- Cajka, T., & Fiehn, O. (2014). Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 61, S. 192 - 206.
- Chow, C. (2008). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications* (3. Ausg.). Florida: CRC Press.
- Daley, C., Abbott, A., Doyle, P., Nader, G., & Larson, S. (2010). A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition Journal*, 9(10).
- Decalzo, A., Insani, E., Biolatto, A., Sancho, A., Garcia, P., Pensel, N., & Josifovich, J. (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science*, 70(1), S. 35 - 44.

- deHoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry - Principles and Applications* (3. Ausg.). West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Enser, M., Scollan, N., Gulati, S., Richardson, I., Nute, G., & Wood, J. (2001). The effects of ruminally-protected dietary lipid on the lipid composition and quality of beef muscle. *Proceeding of the 47th International Congress of Meat Science and Technology*, 1, S. 12 - 13.
- Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., & Subramaniam, S. (2007). LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Research*, 35, S. W606 - W612.
- Fang, J., & Barcelona, M. (1998). Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 33, S. 23 - 25.
- Fay, L., & Kussmann, M. (2010). *Mass Spectrometry and Nutrition Research*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Feulner, A. (2014). *Lipid Profiling: Phospholipide in Muskelfleisch von Puten*. Bachelorarbeit: Hochschule Coburg - Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften.
- Frega, N., Pacetti, D., & Boselli, E. (2012). Characterization of phospholipid molecular species in the edible parts of bony fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), S. 3234 - 3245.
- Garcia, P., Pensel, N., Sancho, A., Latimori, N., Kloster, A., Amigone, M., & Casal, J. (2008). Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in Argentina. *Meat Science*, 79(3), S. 500 - 508.
- Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C., Kurczy, M., Benton, H., Rinehart, D., . . . Siuzdak, G. (2014). Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. *Analytical Chemistry*, 86(14), S. 6931 - 6939.
- Gross, J. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook* (2. Ausg.). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Habeanu, M., Thomas, A., Bispo, E., Gobert, M., Gruffat, D., Durand, D., & Bauchart, D. (2014). Extruded linseed and rapeseed both influenced fatty acid composition of total lipids and their polar and neutral fraction in longissimus thoracis and semitendinosus muscles of finishing Normand cows. *Meat Science*, 96(1), S. 99 - 107.
- Hanahan, D. (1997). *A Guide to Phospholipid Chemistry*. New York: Oxford University Press Inc.
- Herbert, C., & Johnstone, R. (2003). *Mass Spectrometry Basics*. Boca Raton: CRC Press.
- Hesse, M., Meier, H., & Zeeh, B. (2012). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (8. Ausg.). Stuttgart: Thieme Verlag.

- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., . . . Tai, H. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), S. 3 - 12.
- Hsu, F.-F., & Turk, J. (2000). Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: a mechanistic study. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11), S. 986 - 999.
- Hübschmann, H.-J. (2009). *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH.
- Jemal, M., Ouyang, Z., & Xia, Y.-Q. (2010). Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography. *Biomedical Chromatography*, 24, S. 2 - 19.
- Kerry, J., Kerry, J., & Ledward, D. (2002). *Meat Processing: Improving Quality*. Florida: CRC Press.
- Kitteringham, N., Jenkins, R., Lane, C., Elliott, V., & Park, B. (2009). Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 877, S. 1229 - 1239.
- Kromidas, S. (2011). *Validierung in der Analytik* (2. Ausg.). Weinheim: Wiley-VH.
- Küllenberg, D., Taylor, L., Schneider, M., & Massing, U. (2012). Health effects of dietary phospholipids. *Lipids in Health and Disease*, 11(3).
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., & Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular System Biology*, 4(222).
- Larick, D., & Turner, B. (1989). Influence of finishing diet on the phospholipid composition and fatty acid profile of individual phospholipids in lean muscle of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 67, S. 2282 - 2293.
- Lee, M., & Kerns, E. (1999). LC/MS Applications in Drug Development. *Mass Spectrometry Reviews*, 18(3-4), S. 187 - 279.
- Losito, I., Patrino, R., Conte, E., Cataldi, T., Megli, F., & Palmisano, F. (2013). Phospholipidomics of Human Blood Microparticles. *Analytical Chemistry*, 85(13), S. 6405 - 6413.
- Love, J., & Pearson, A. M. (1971). Lipid oxidation in meat and meat products - A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(10), S. 547 - 549.
- Mahieu, N., Genenbacher, J., & Patti, G. (2016). A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, S. 87 - 93.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O., & Sharma, P. (2010). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), S. 22 - 26.

- March, R. (2009). Quadrupole Ion Traps. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, S. 961 - 989.
- Muriel, M., Antequera, M., Petró, M., Andrés, A., & Ruis, J. (2005). Sterospecific analysis of fresh and dry-cured muscle phospholipids from Iberian pigs. *Food Chemistry*, 90(3), S. 437 - 443.
- Nollet, L. (2004). *Handbook of Food Analysis: Physical Characterization and Nutrient Analysis* (2. Ausg.). New York: Marcel Dekker Inc.
- Nollet, L. (2012). *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality* (2. Ausg.). New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Nollet, L., & Toldrá, F. (2009). *Handbook of Muscle Foods Analysis*. Boca Raton: CRC Press.
- Nürnberg, K., Dannenberger, D., Nürnberg, G., Ender, K., Voigt, J., Scollan, N., . . . Richardson, R. (2005). Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livestock Production Science*, 94(1-2), S. 137 - 147.
- O'Brien, J., Nursten, H., Crabbe, M., & Ames, J. (1998). *The Maillard Reaction in Food and Medicine*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Olsen, B., & Pack, B. (2013). *Hydrophilic Interaction Chromatography - A Guide for Practitioners*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Ötleş, S. (2016). *Handbook of Food Analysis Instruments*. Boca Raton: CRC Press.
- Peterson, B., & Cummings, B. (2006). A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography*, 20, S. 227 - 243.
- Ponnampalam, E., Mann, N., & Sinclair, A. (2006). Effect of feeding system on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts: potential impact on human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), S. 21 - 29.
- Postle, A., Wilton, D., Hunt, A., & Attard, G. (2007). Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry. *Progress in Lipid Research*, 46(3-4), S. 200 - 224.
- Preedy, V., Srirajaskanthan, R., & Patel, V. (2013). *Handbook of Food Fortification and Health- From Concepts to Public Health Applications* (2. Ausg.). New York: Springer-Verlag.
- Przybylski, W., & Hopkins, D. (2015). *Meat Quality - Genetic and Environmental Factors*. Boca Raton: CRC Press.
- Reis, A., & Spickett, C. (2012). Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(10), S. 2374 - 2387.
- Restuccia, D., Spizzirri, U., Puoci, F., Cirillo, G., Vinci, G., & Picci, N. (2011). Determination of Phospholipids in Food Samples. *Food Reviews International*, 28(1), S. 1 - 46.

- Rossi, D., & Sinz, M. (2001). *Mass Spectrometry in Drug Discovery*. New York: CRC Press.
- Schulte, E., & Weber, K. (1989). Rapid preparation of fatty acid methyl-esters from fats with trimethylsulfoniumhydroxide or sodium methylate. *Fat Science Technology*, *91*, S. 181 - 183.
- Scollan, N., Choi, N.-J., Kurt, E., Fisher, A., Enser, M., & Wood, J. (2001). Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition*, *85*, S. 115 - 124.
- Sherma, J. (2003). High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Botanical Medicines and Dietary Supplements: A Review. *Journal of AOAC International*, *86*(5), S. 873 - 881.
- Sikorski, Z., & Kolakowska, A. (2003). *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Florida: CRC Press.
- Siuzdak, G. (1996). *Mass Spectrometry for Biotechnology*. Californien: Academic Press.
- Smith, C., Want, E., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profilung Using Nonlinear Peak Alignment, Matching and Identification. *Analytical Chemistry*, *78*(3), S. 779 - 787.
- Spiller, G. (1995). *Handbook of Lipids in Human Nutrition*. Florida: CRC Press.
- Sriveena, T., Srividya, A., Ajitha, A., & Uma Maheswara Rao, V. (2015). Time of flight mass spectrometry: Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *7*, S. 614 - 625.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E., Glass, C., . . . Subramaniam, S. (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, *35*, S. D527 - D532.
- Tautenhahn, R., Patti, G., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Analytical Chemistry*, *84*, S. 5035 - 5039.
- Vinaixa, M., Schymanski, E., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R., & Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *Trends in Analytical Chemistry*, *78*, S. 23 - 35.
- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2002). *Lehrbuch der Biochemie* (2. Ausg.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Waksmundzka, M., & Sherma, J. (2011). *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. Boca Raton: CRC Press.
- Weston, A., & Brown, P. (1997). *HPLC and CE - Principles and Practise*. Californien: Academic Press.
- Wilm, M. (2011). Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics*, *10*(7).

- Wood, J., Nute, G., Richardson, R., Whittington, F., Soutwood, O., Plastow, G., . . . Chang, K. (2004). Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science*, 67, S. 651 - 667.
- Wood, J., Richardson, R., Nute, G., Fisher, A., Ampo, M., Kasapidou, R., . . . Einser, M. (2002). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66, S. 21 - 32.
- Wörmer, L., Lipp, J., Schröder, J., & Hinrichs, K.-U. (2013). Application of two new LC-ESI-MS methods for improved detection of intact polar lipids (IPLs) in environmental samples. *Organic Geochemistry*, 59, S. 10 - 21.
- Xia, Y.-Q., & Jemal, M. (2009). Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(14), S. 2125 - 2138.
- Xu, R., Ye, Y., & Zhao, W. (2012). *Introduction to Natural Products Chemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Yang, K., Zhao, Z., Gross, R., & Han, Y. (2009). Systematic analysis of choline-containing phospholipids using multiple-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics. *Journal of Chromatography B*, 877(26), S. 2924 - 2936.
- Zhao, Y.-Y., Xiong, Y., & Curtis, J. (2011). Measurement of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: The determination of choline containing compounds in foods. *Journal of Chromatography A*, 1218, S. 5470 - 5479.

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Andrée für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit und die, wie immer, hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch am Max Rubner-Institut, Kulmbach. Nicht nur für die geduldige Einführung, die intensive fachliche Betreuung, sondern auch für die motivierenden Anregungen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Frau Hon.-Prof. Dr. Sabine Rosahl möchte ich mich für die Übernahme des Themas bedanken.

Daneben gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Sicherheit und Qualität bei Fleisch, insbesondere Frau Georgine Krappmann und Herrn Alexander Iglar für die Aufarbeitung der Proben und die Durchführung der Fettsäureanalytik sowie die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

## 9 Anhang

Tabelle 24: Identifizierung des PL 838,6259 m/z (Lipid Maps).

Abbreviation	# of matches	m/z (delta)	Description
<a href="#">PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/16:0)</a>	11		
		838.56	Precursor ion [M+acetate]-
		764.52 (0.01)	Loss of CH3 and acetate from precursor ion
		693.45	Loss of choline and acetate from precursor ion
		526.29 (0.01)	Loss of sn2 acyl chain as (RCH=C=O), CH3 and acetate from precursor ion
		508.28	Neutral loss of sn2 RCOOH group, loss of CH3 and acetate from precursor ion
		480.31 (0.00)	Loss of sn1 acyl chain as (RCH=C=O), CH3 and acetate from precursor ion
		462.30 (0.00)	Neutral loss of sn1 RCOOH group, loss of CH3 and acetate from precursor ion
		301.22 (0.00)	sn1 RCOO- ion
		257.23 (0.01)	Loss of CO2 from sn1 RCOO- ion (PUFA)
		255.23 (0.00)	sn2 RCOO- ion
		224.07 (0.00)	Glycerophosphocholine with loss of CH3 and H2O
		168.04 (0.00)	Phosphocholine with loss of CH3
		153.00 (0.01)	Glycerol-3-phosphate ion with loss of H2O

		96.97	H2PO4- ion
		78.96 (0.00)	PO3- ion

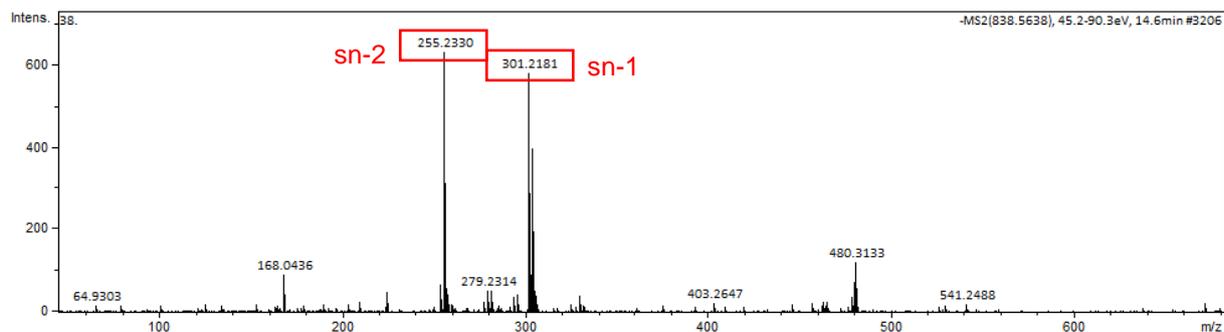


Abbildung 27: Bestimmung der FA-Kettenverteilung des PL PC (20:5/16:0).

Tabelle 25: Identifizierung des PL 846,6322 m/z (*Lipid Maps*).

Abbreviation	# of matches	m/z (delta)	Description
<a href="#">PC(18:1(11E)/18:0)</a>	3		
		846.62	Precursor ion [M+acetate]-
		772.59 (0.05)	Loss of CH3 and acetate from precursor ion
		701.51	Loss of choline and acetate from precursor ion
		508.34	Loss of sn1 acyl chain as (RCH=C=O), CH3 and acetate from precursor ion
		506.33	Loss of sn2 acyl chain as (RCH=C=O), CH3 and acetate from precursor ion
		490.33	Neutral loss of sn1 RCOOH group, loss of CH3 and acetate from precursor ion

		488.31	Neutral loss of sn2 RCOOH group, loss of CH3 and acetate from precursor ion
		283.26 (0.05)	sn2 RCOO- ion
		281.25 (0.08)	sn1 RCOO- ion
		224.07	Glycerophosphocholine with loss of CH3 and H2O
		168.04	Phosphocholine with loss of CH3
		153.00	Glycerol-3-phosphate ion with loss of H2O
		96.97	H2PO4- ion
		78.96	PO3- ion

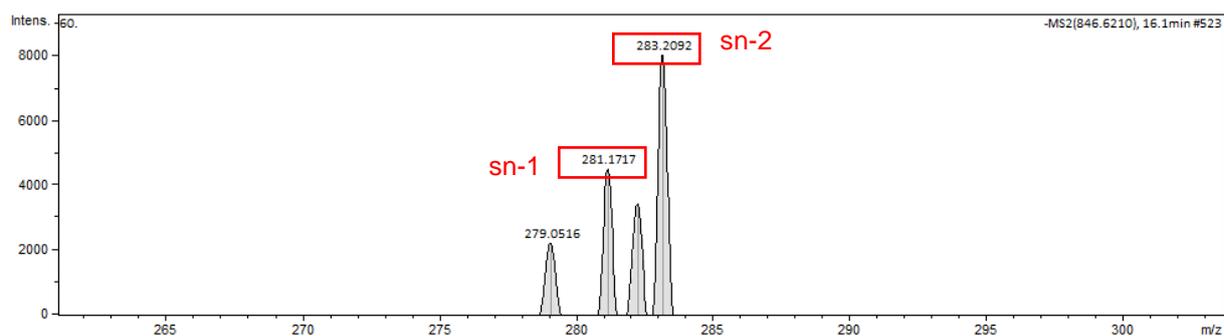


Abbildung 28: Bestimmung der FA-Kettenverteilung des PL PC (18:1/18:0).

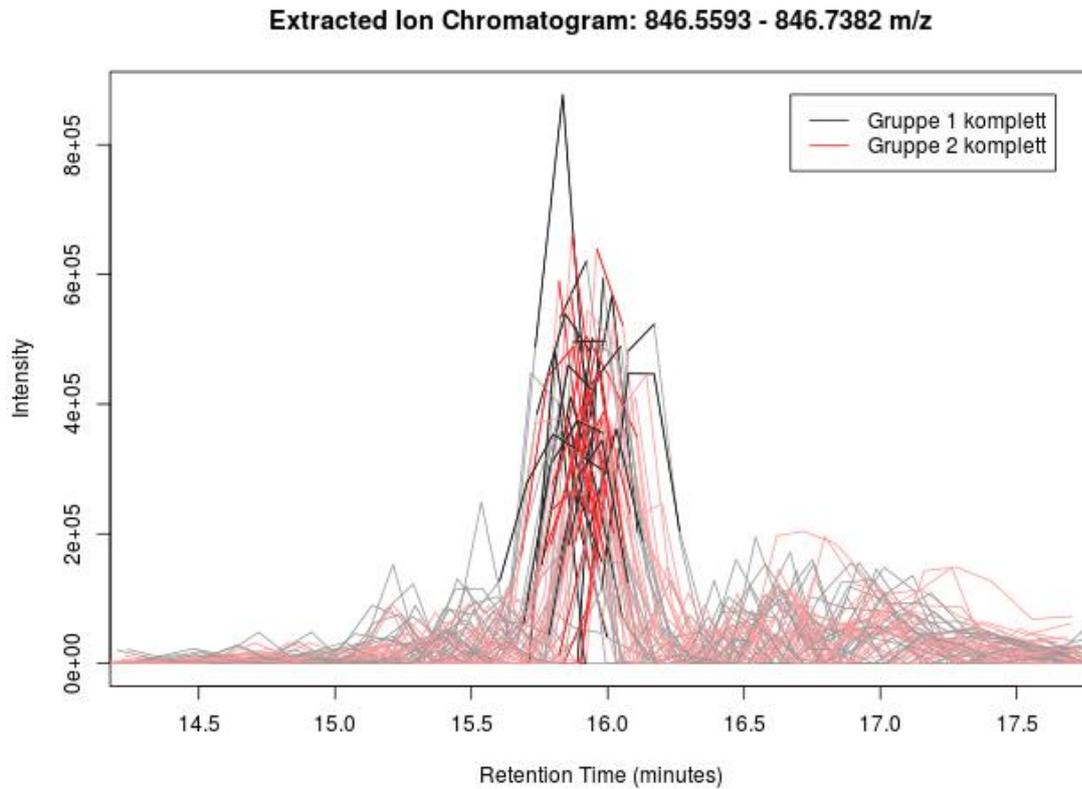


Abbildung 29: EIC 720,6488 m/z PE(P-16:0/20:5).

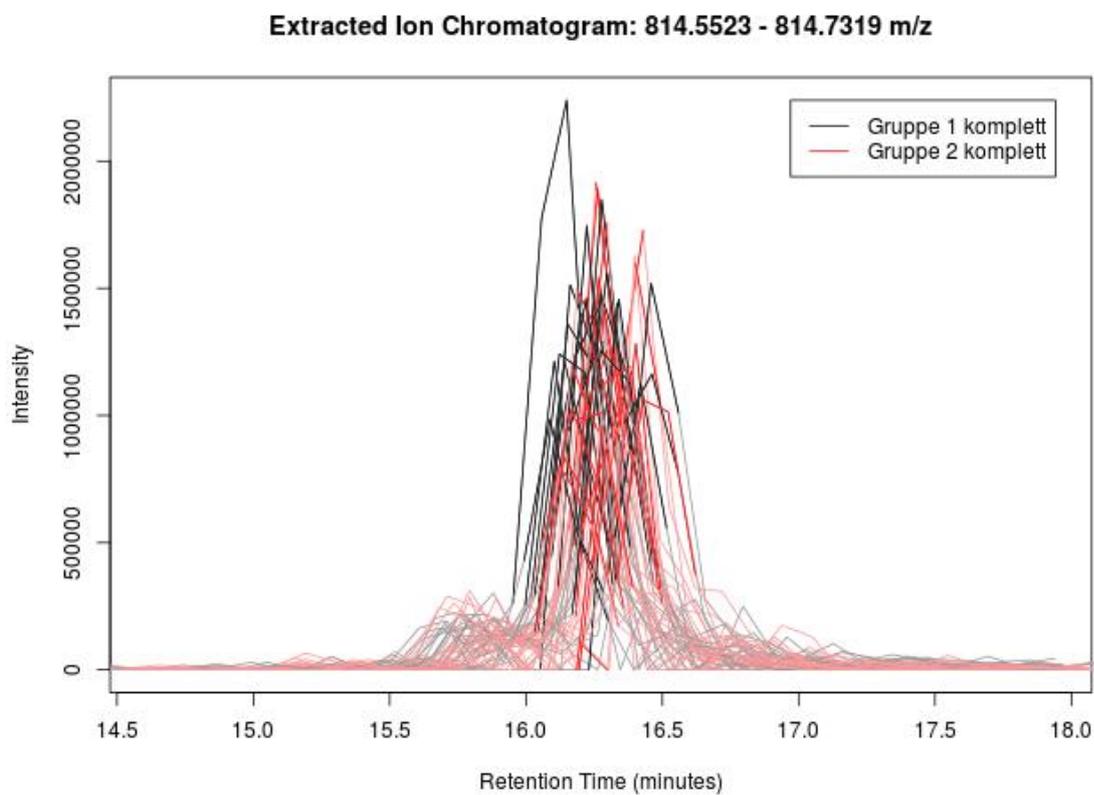


Abbildung 30: EIC 814,6513 m/z PC (16:0/18:3).

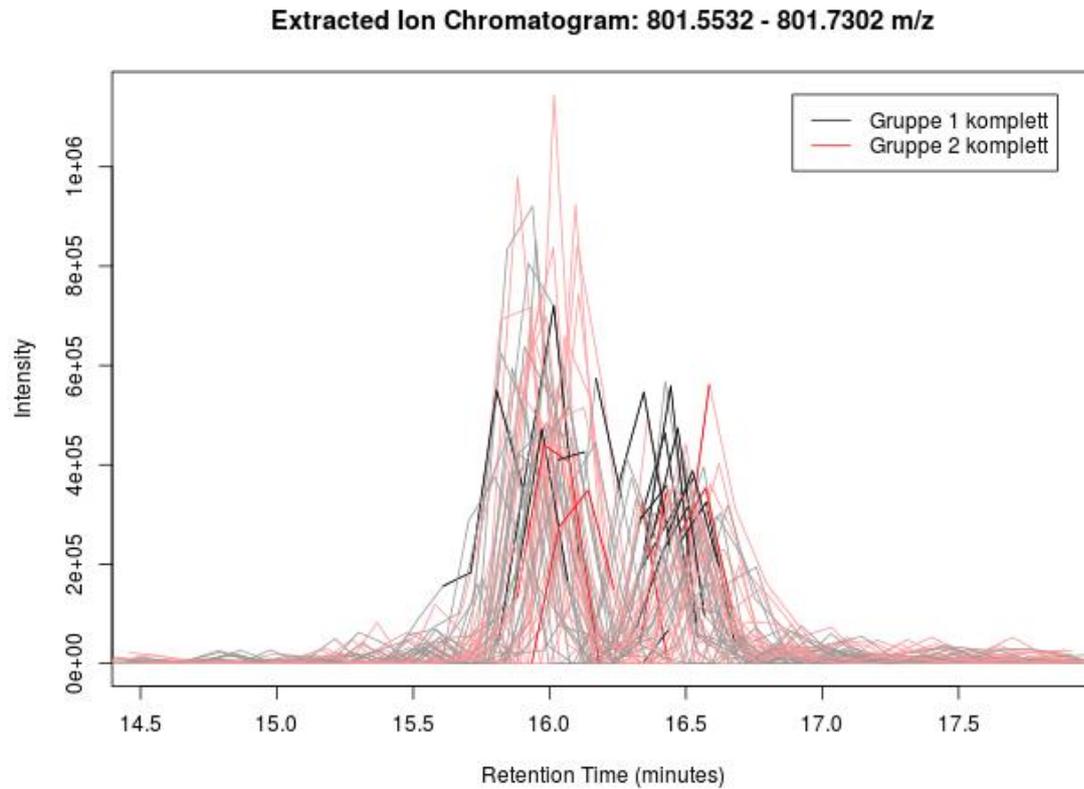


Abbildung 31: EIC 801,6333 m/z PG 38:2.

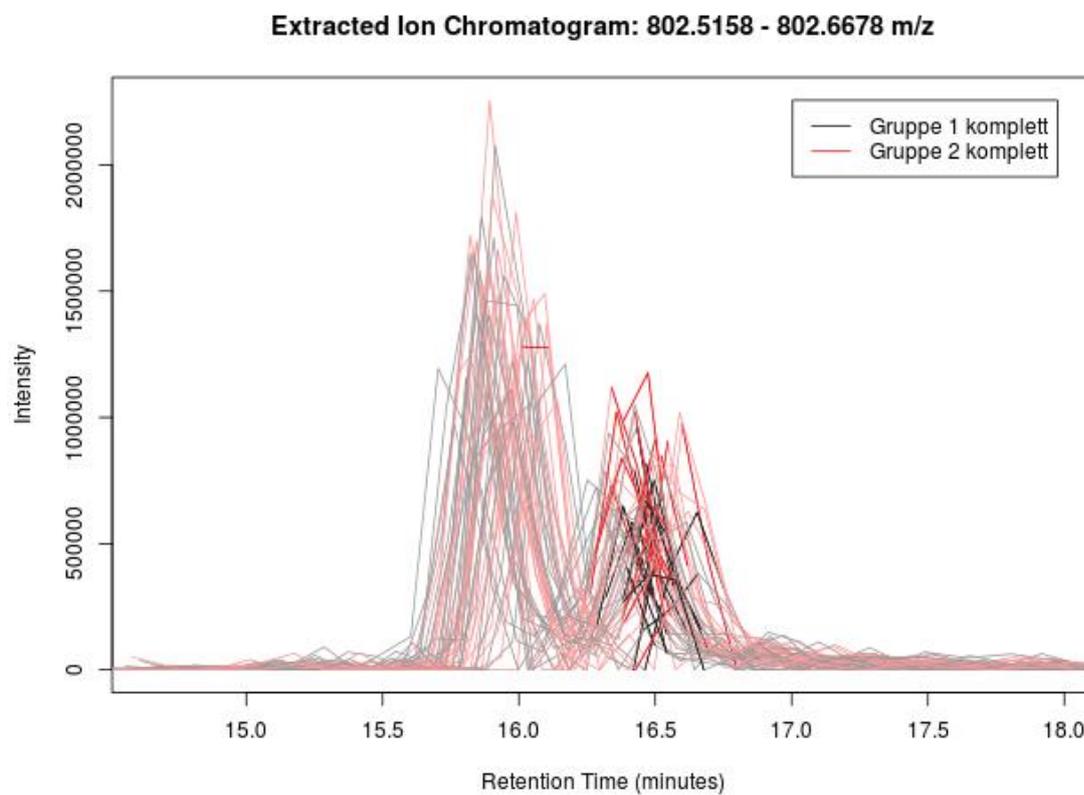


Abbildung 32: EIC 802,6346 m/z PC P-34:1.

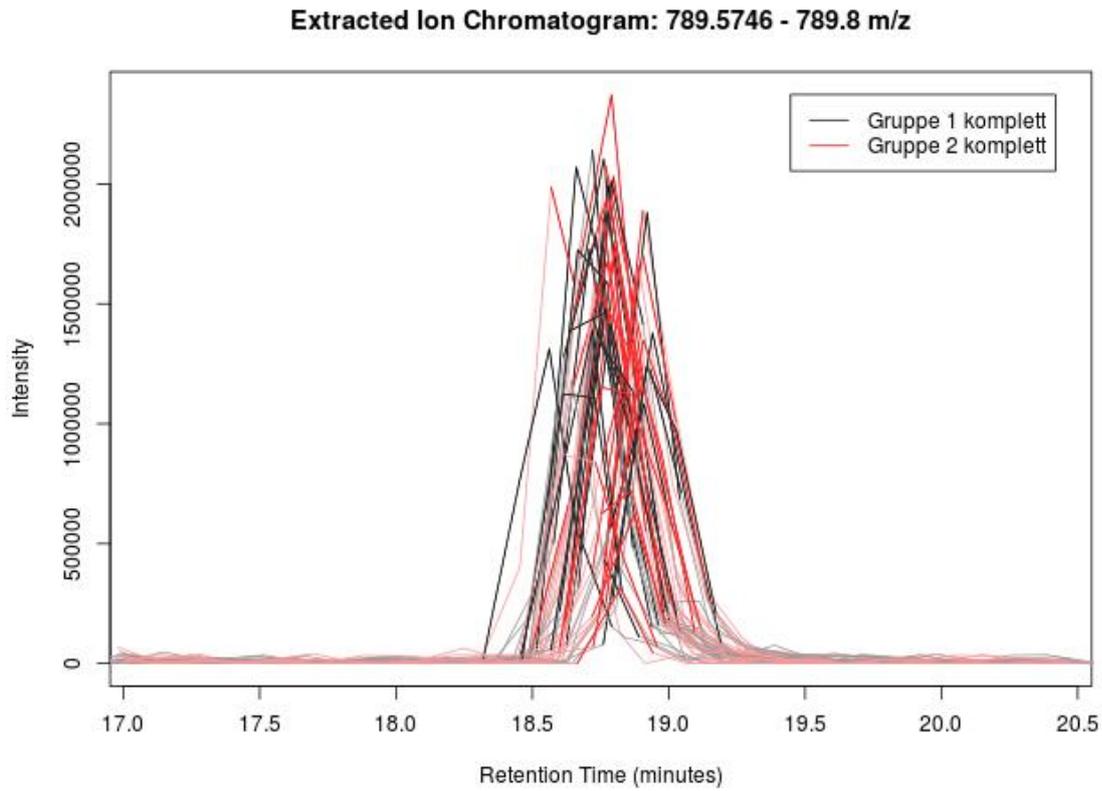


Abbildung 33: EIC 789,7126 m/z PG 37:1.

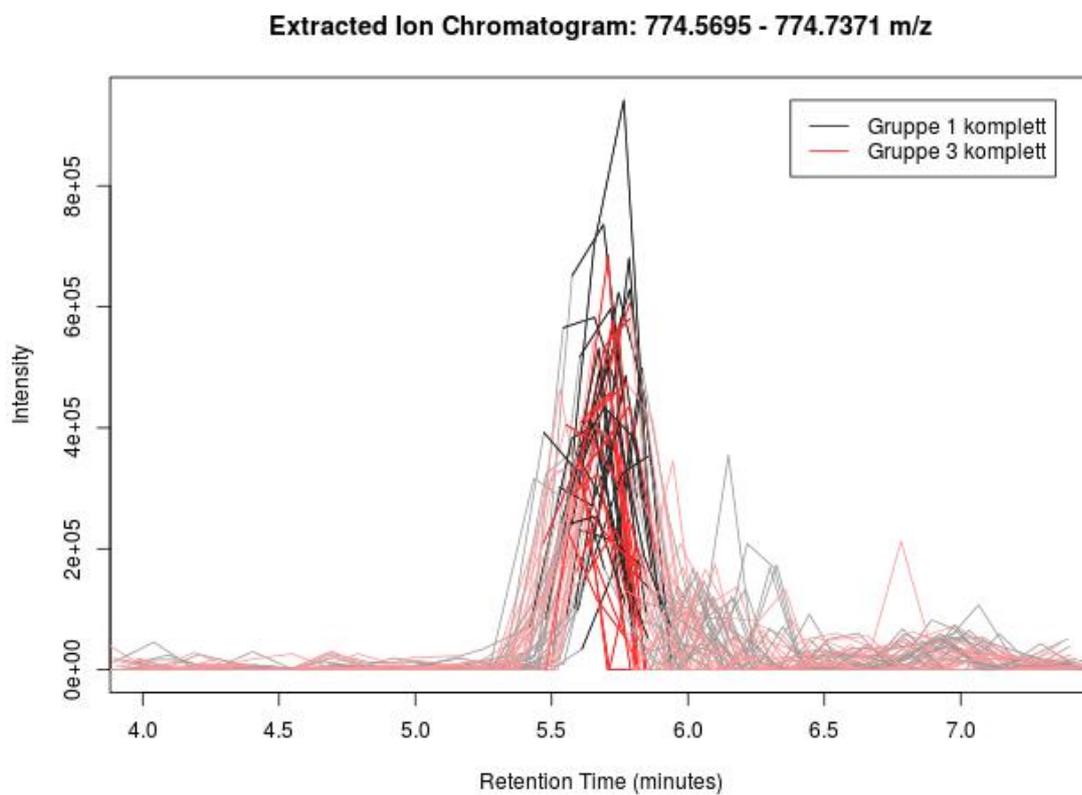


Abbildung 34: EIC 774,5695 – 774,7371 m/z.

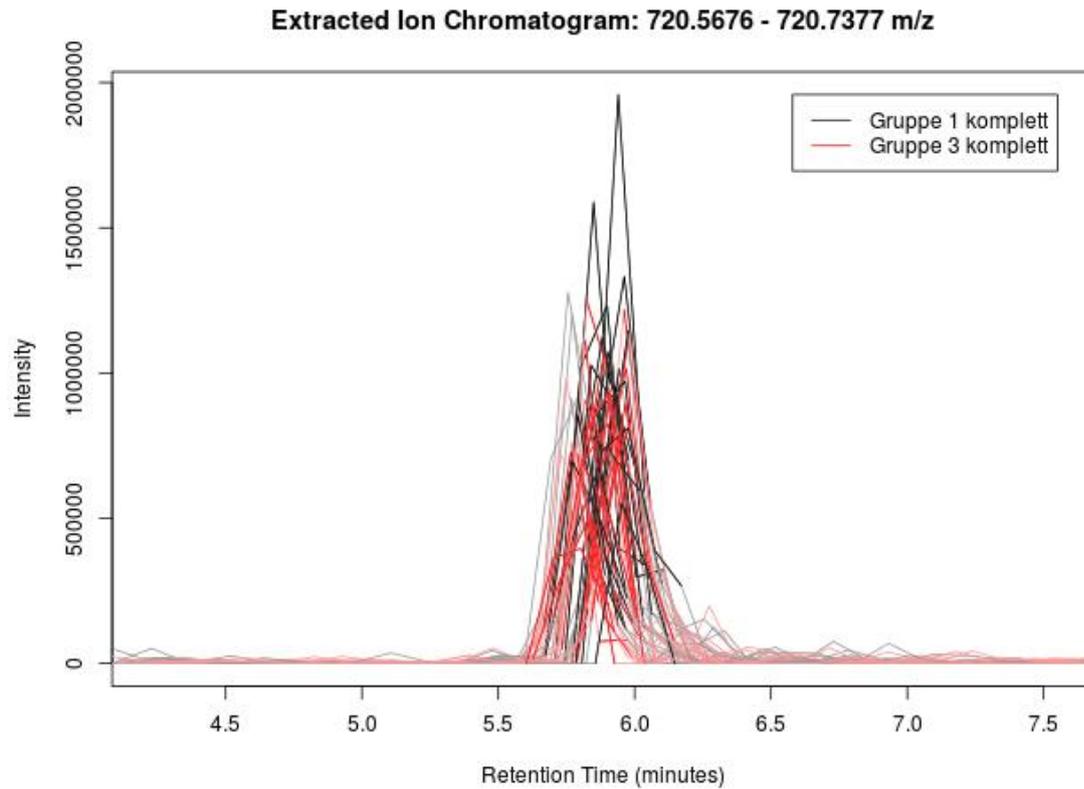


Abbildung 35: EIC 720,6470 m/z PE (P-16:0/20:5).

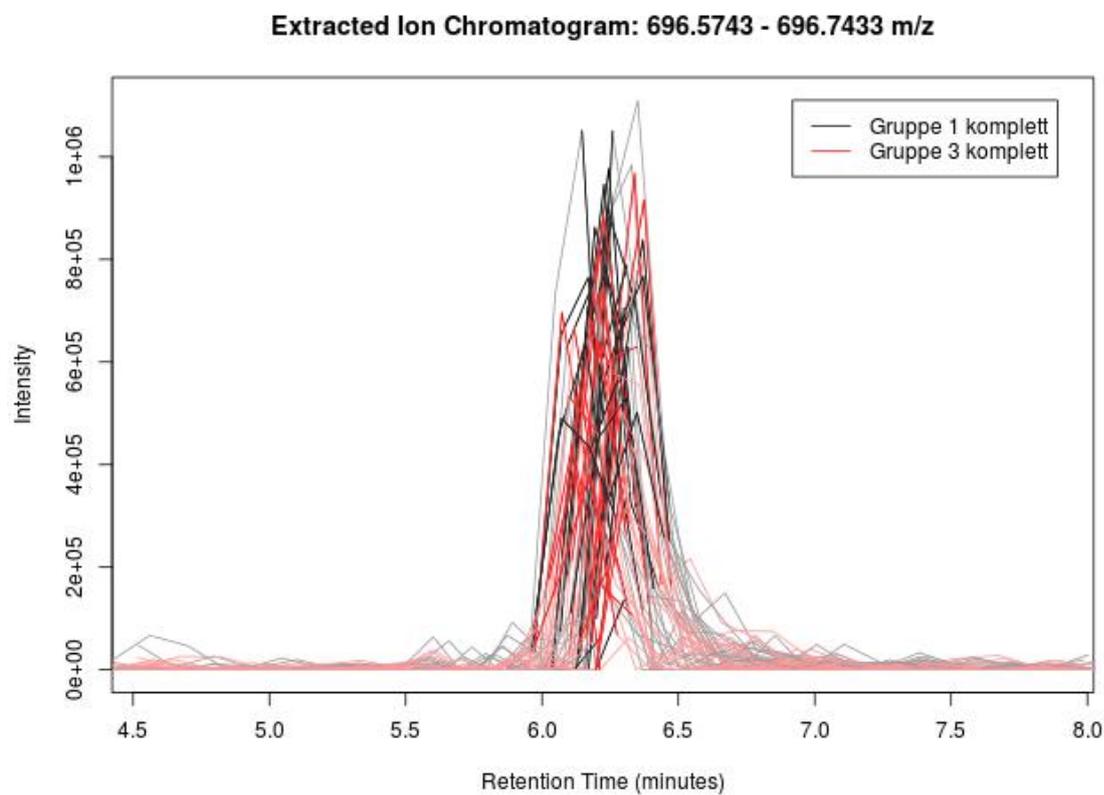


Abbildung 36: EIC 696,6760 m/z PE (P-16:0/18:3).

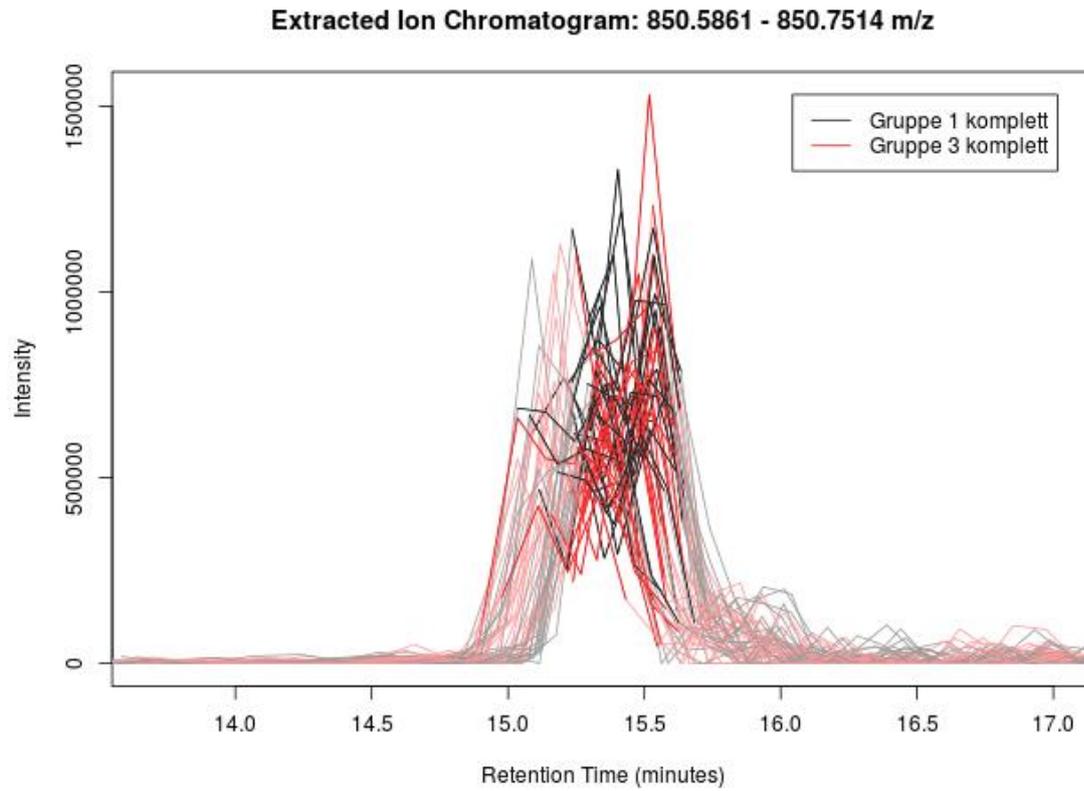


Abbildung 37: EIC 850,6816 m/z PC O-38:6.

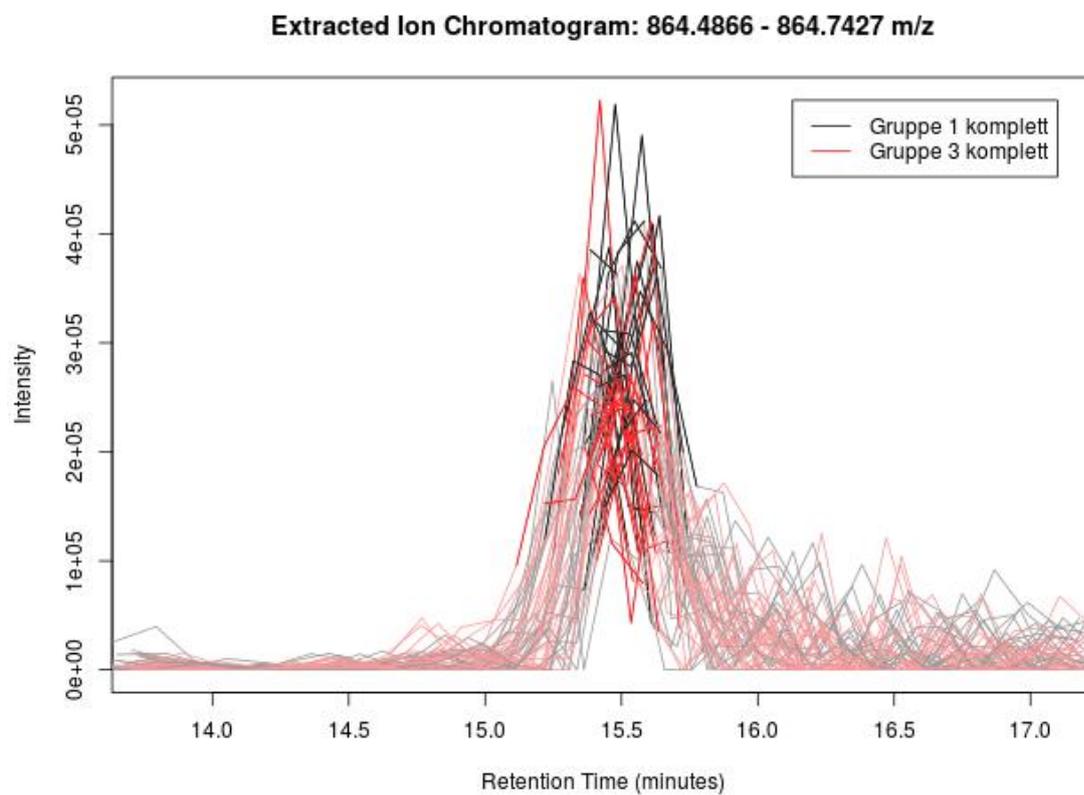


Abbildung 38: EIC 864,6214 PC 38:6.

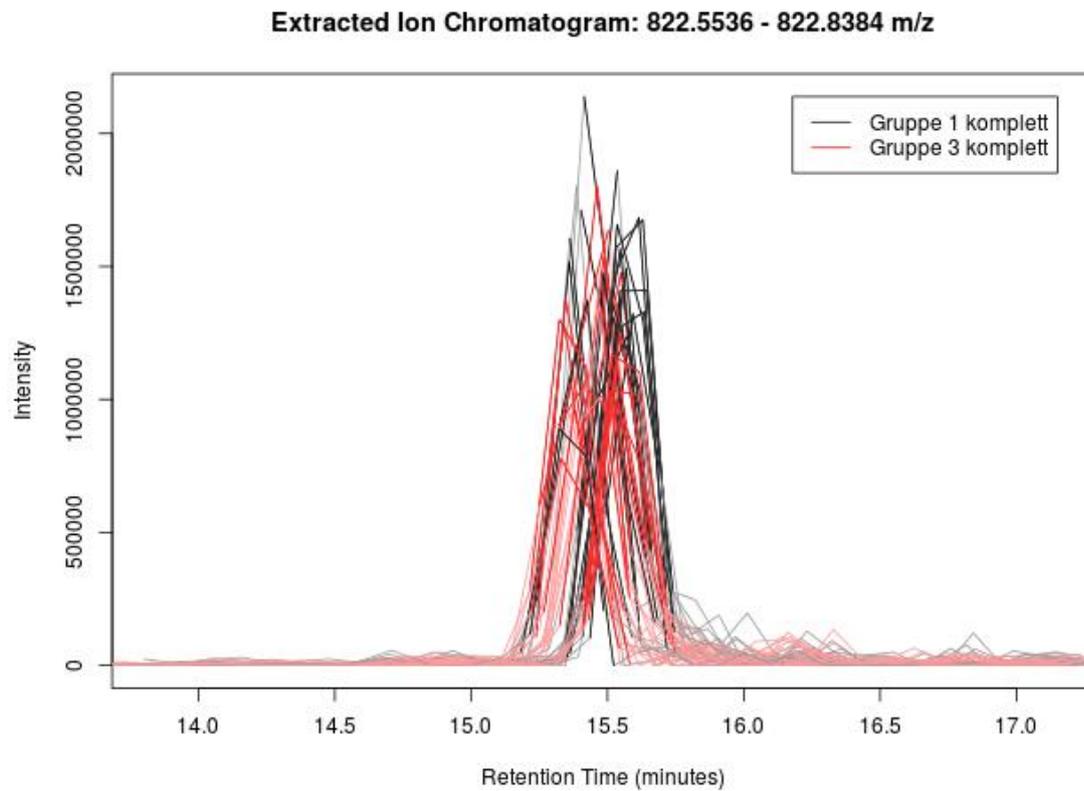


Abbildung 39: EIC 822,7013 m/z PC P-36:5.

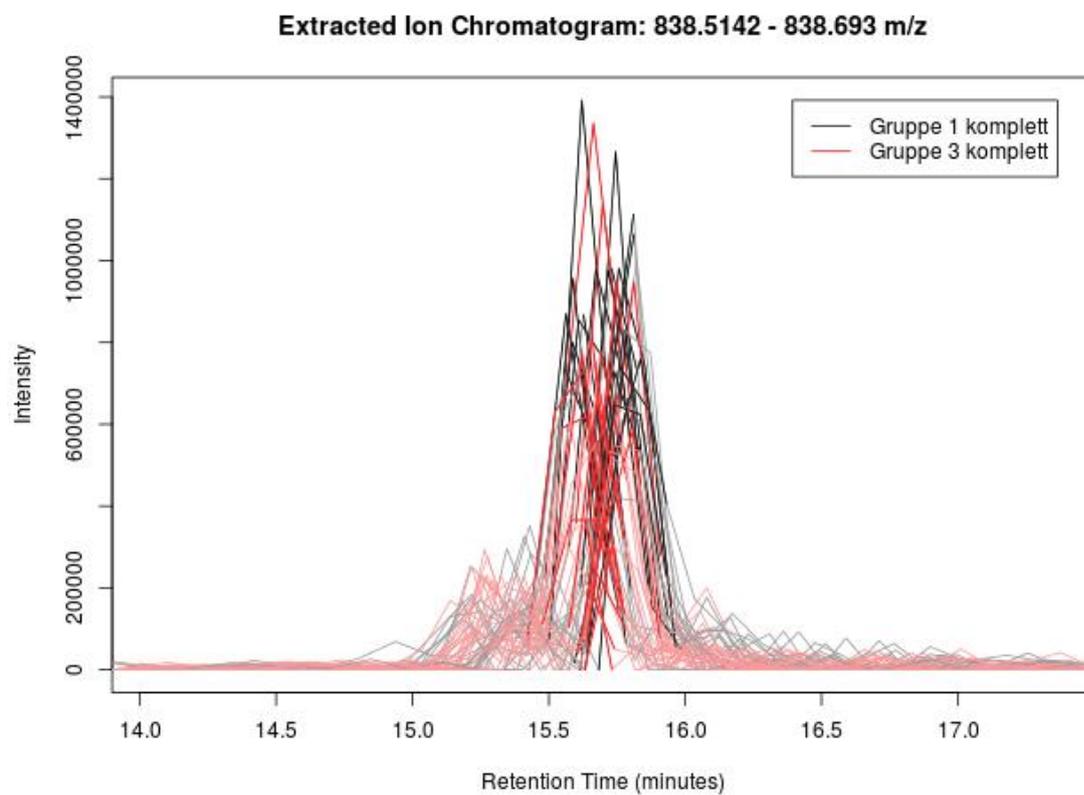


Abbildung 40: EIC 838,6259 m/z PC (20:5/16:0).

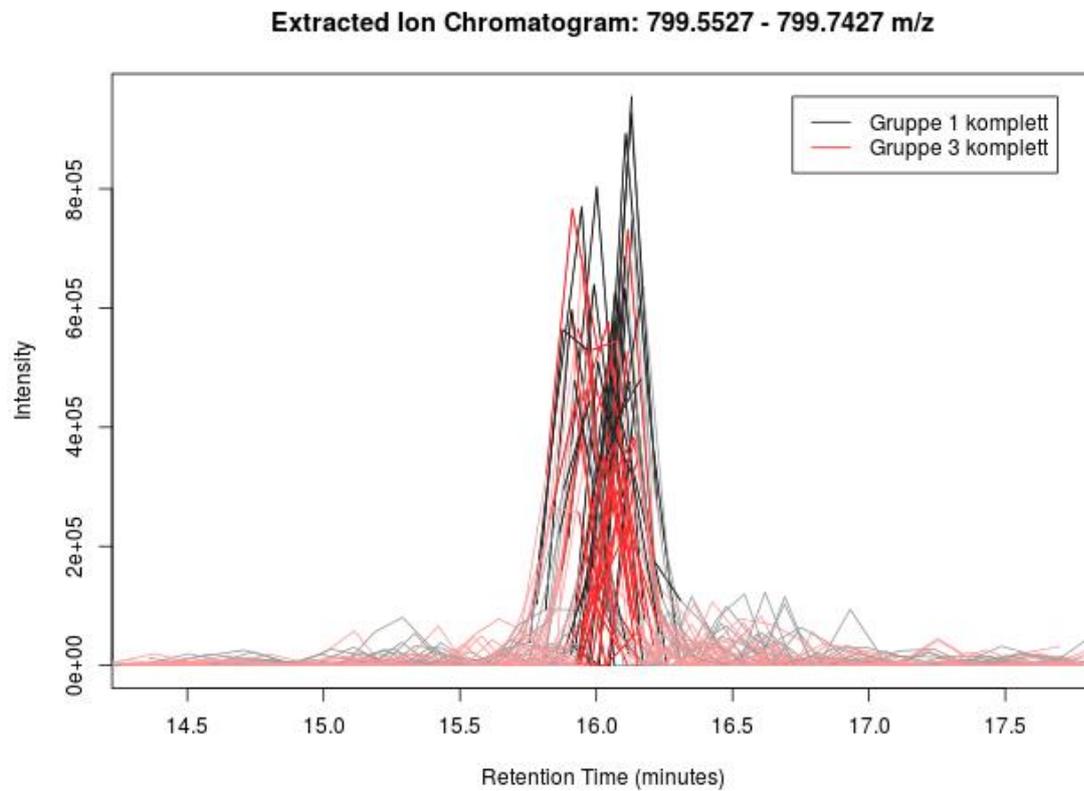


Abbildung 41: EIC 799,6765 m/z PG 38:5.

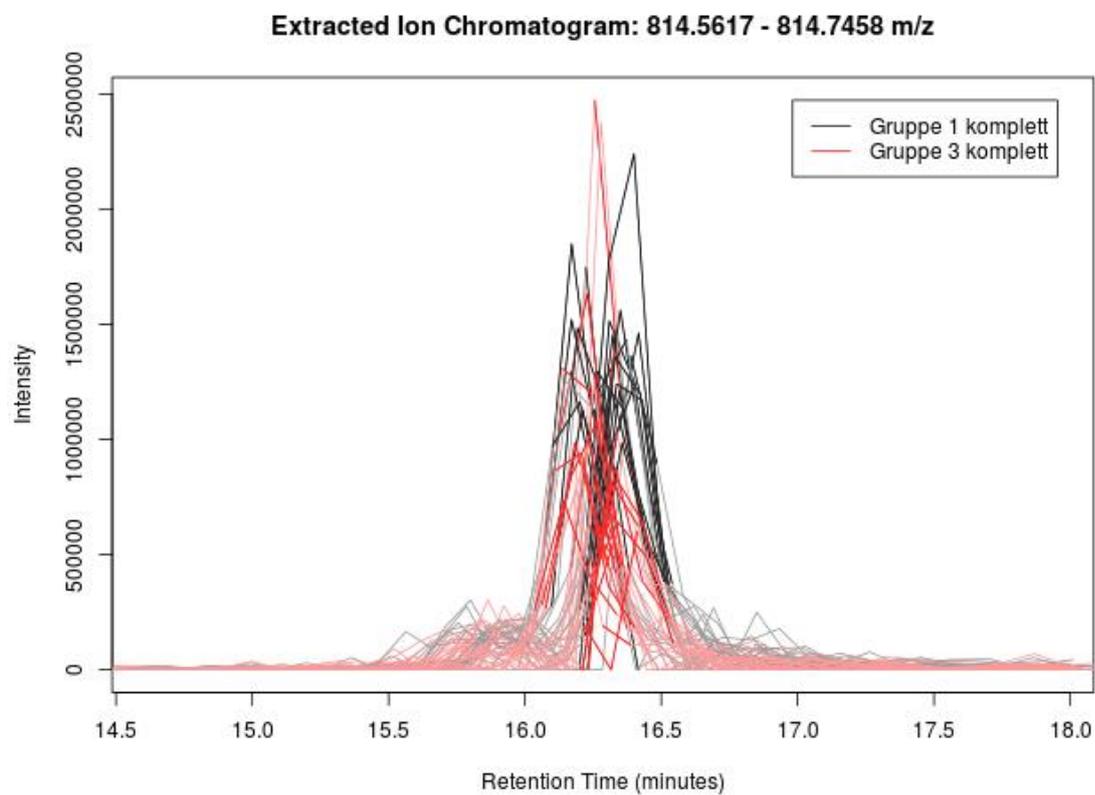


Abbildung 42: EIC 814,6502 m/z PC (16:0/18:3).

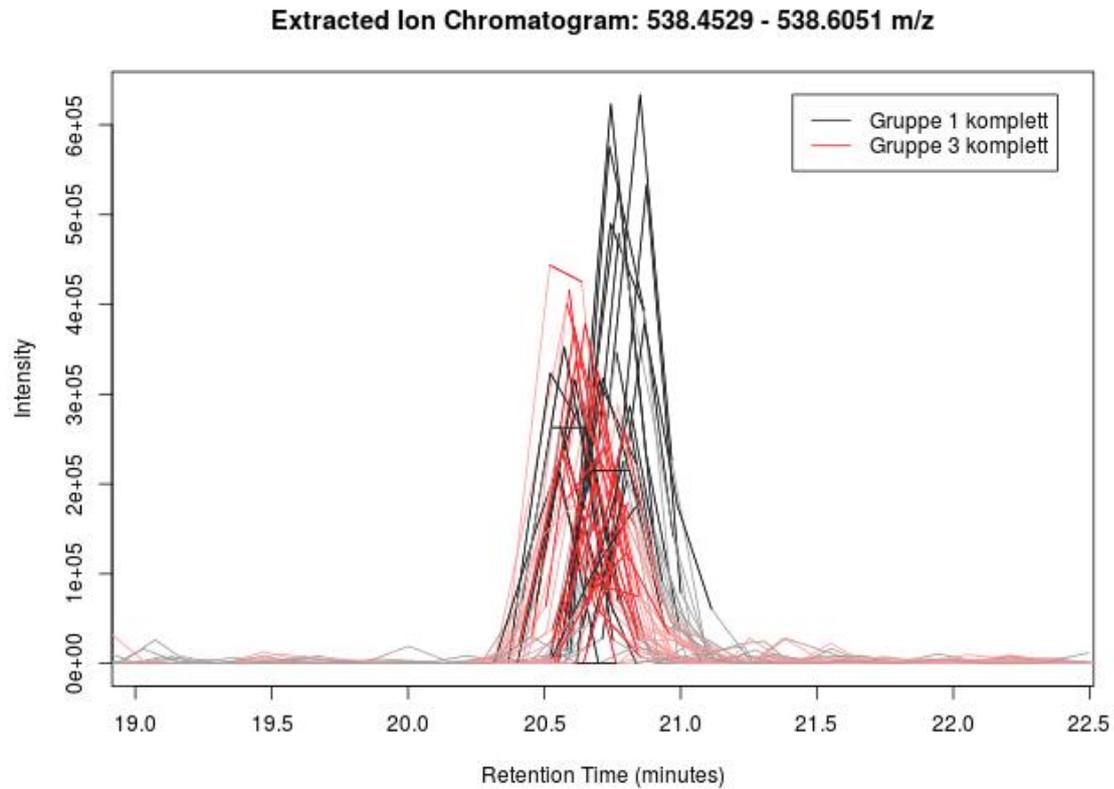


Abbildung 43: EIC 538,5292 m/z LPC P-16:0.

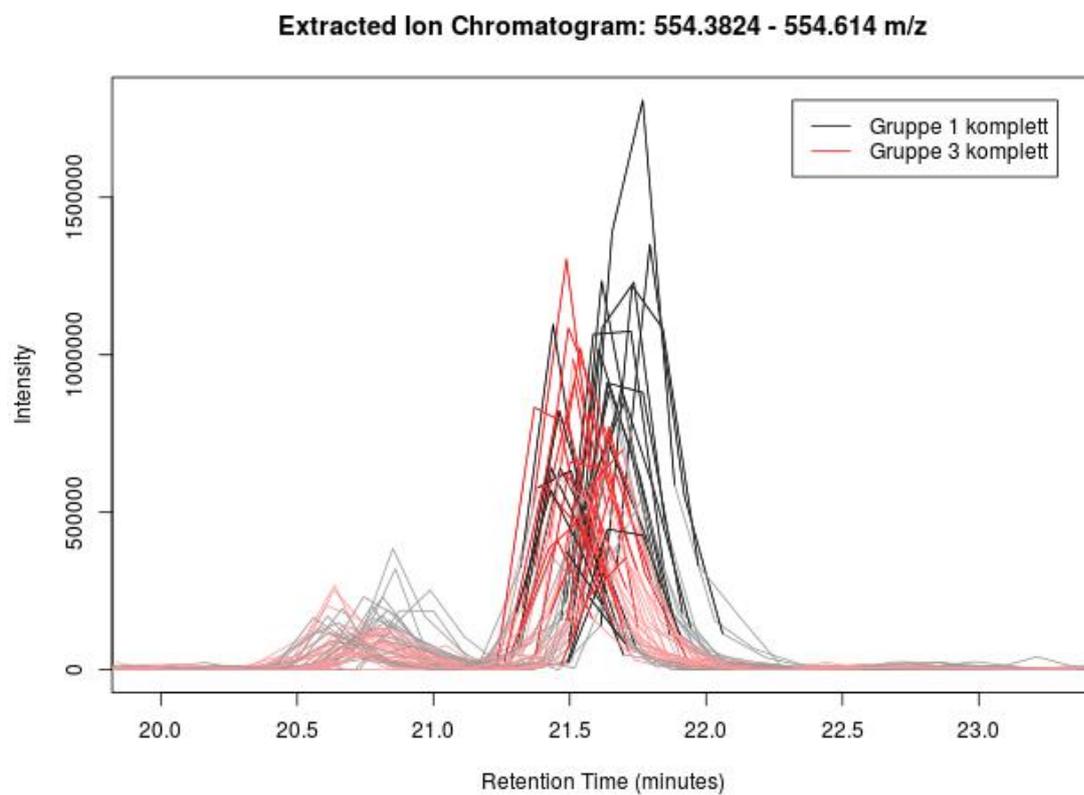


Abbildung 44: EIC 554,5232 m/z LPC 16:0.

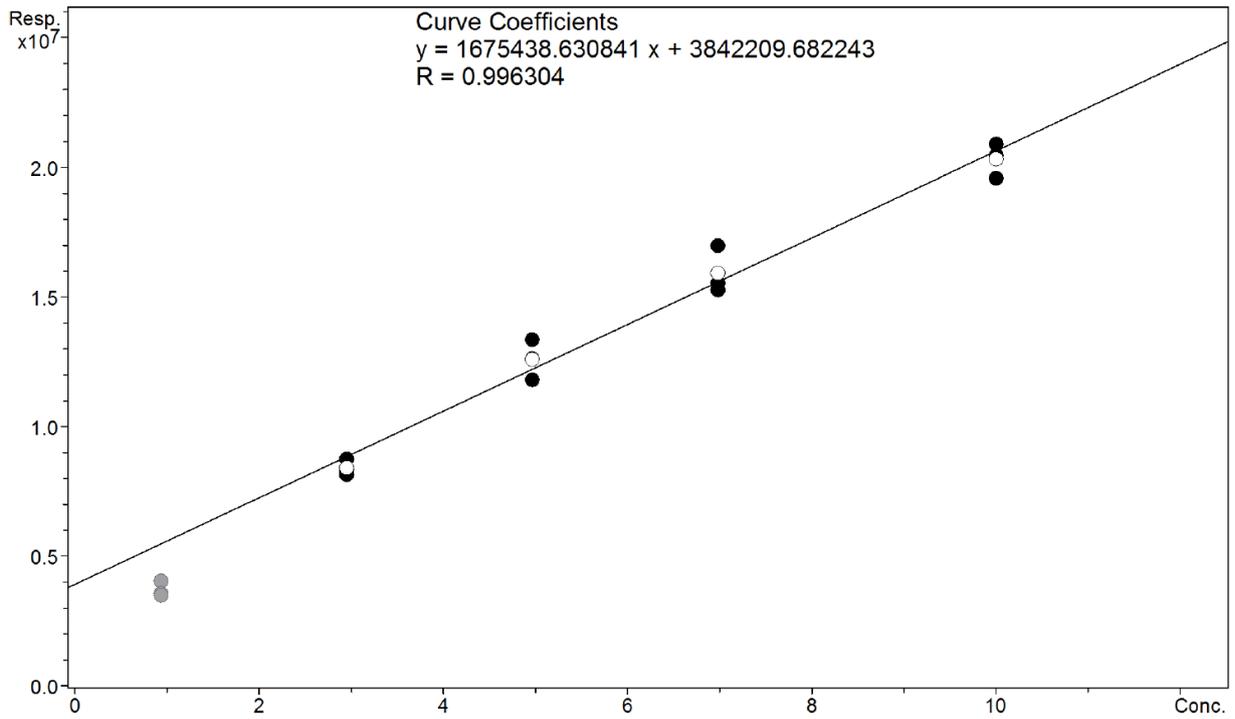


Abbildung 45: Kalibrierung der Probe 2a (LPC P-16:0).

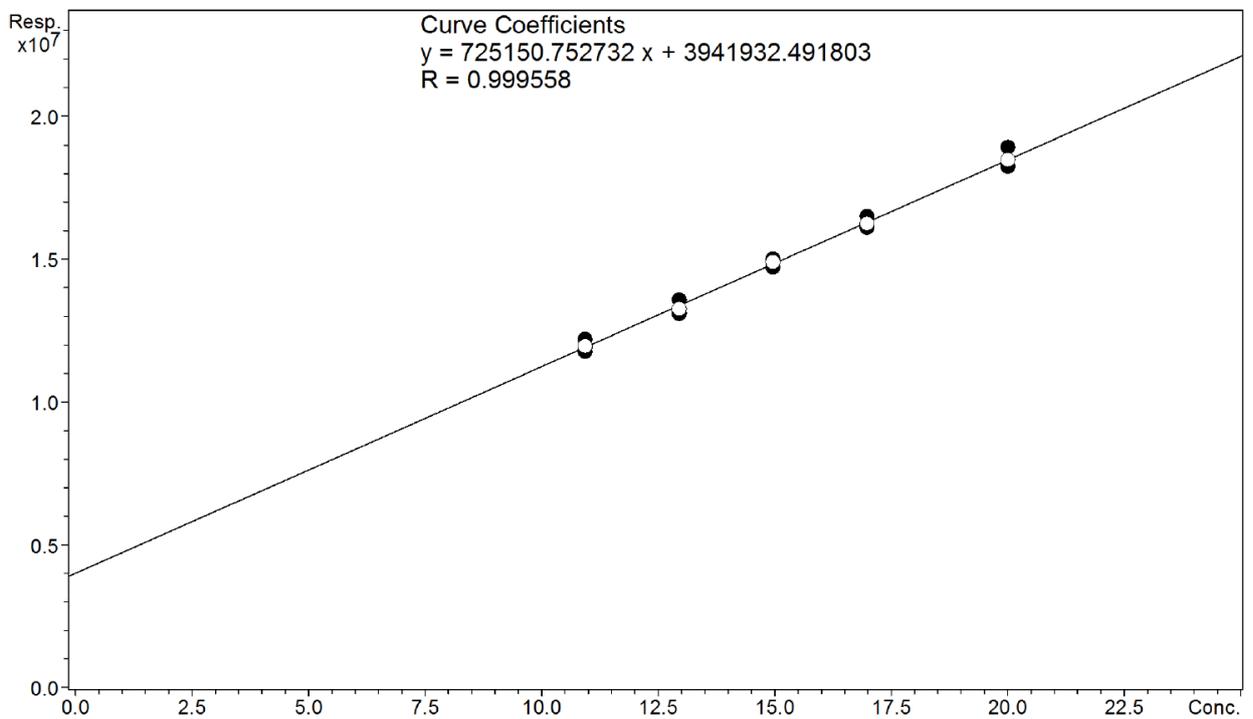


Abbildung 46: Kalibrierung der Probe 2b.

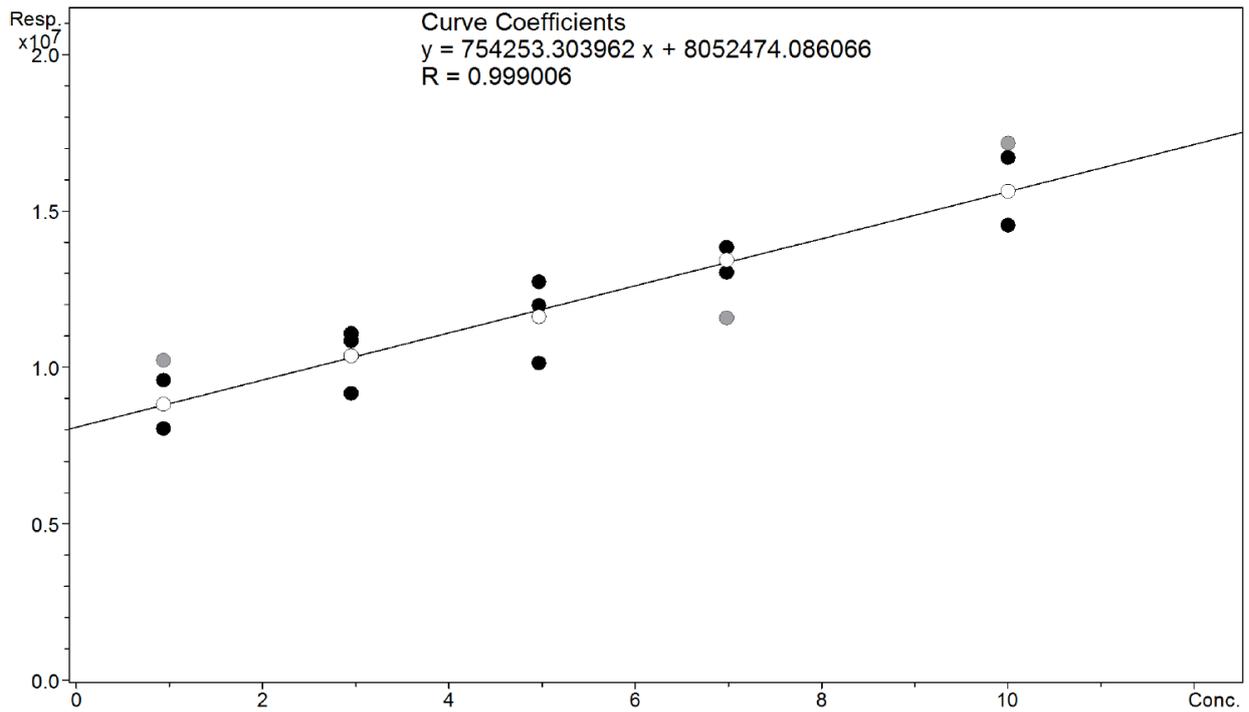


Abbildung 47: Kalibrierung der Probe 22a.

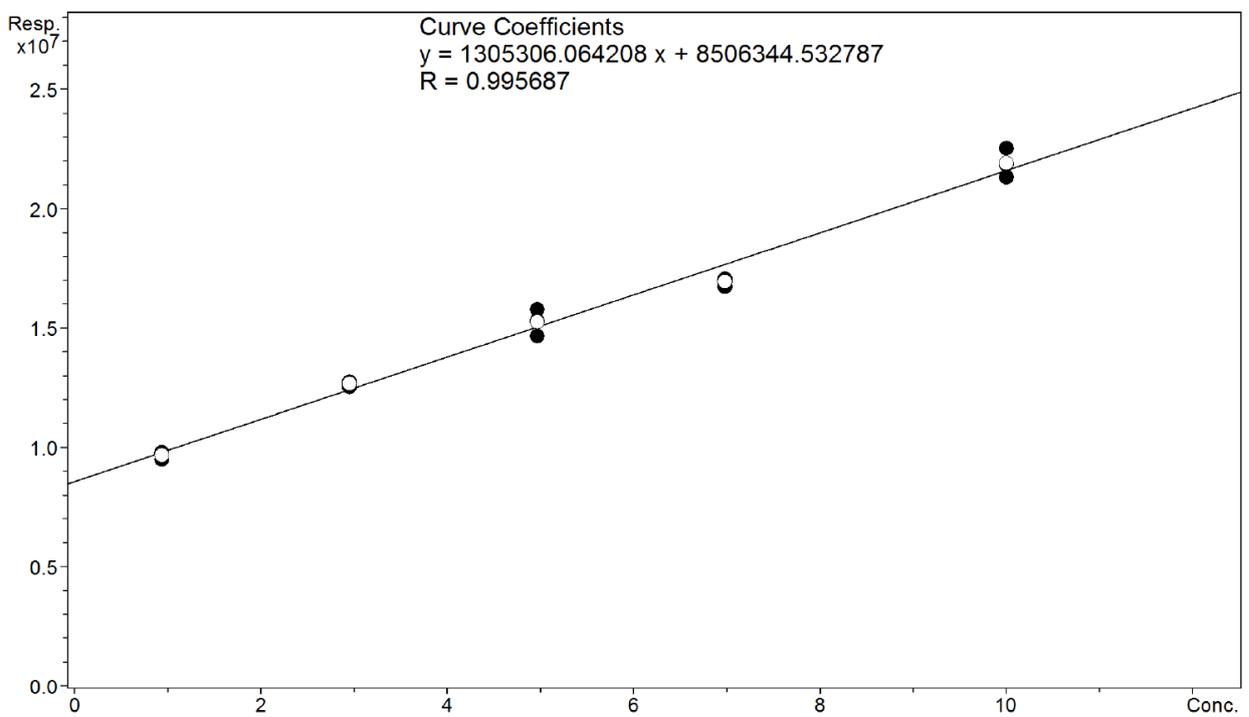


Abbildung 48: Kalibrierung der Probe 22b (PC(20:5/16:0)).

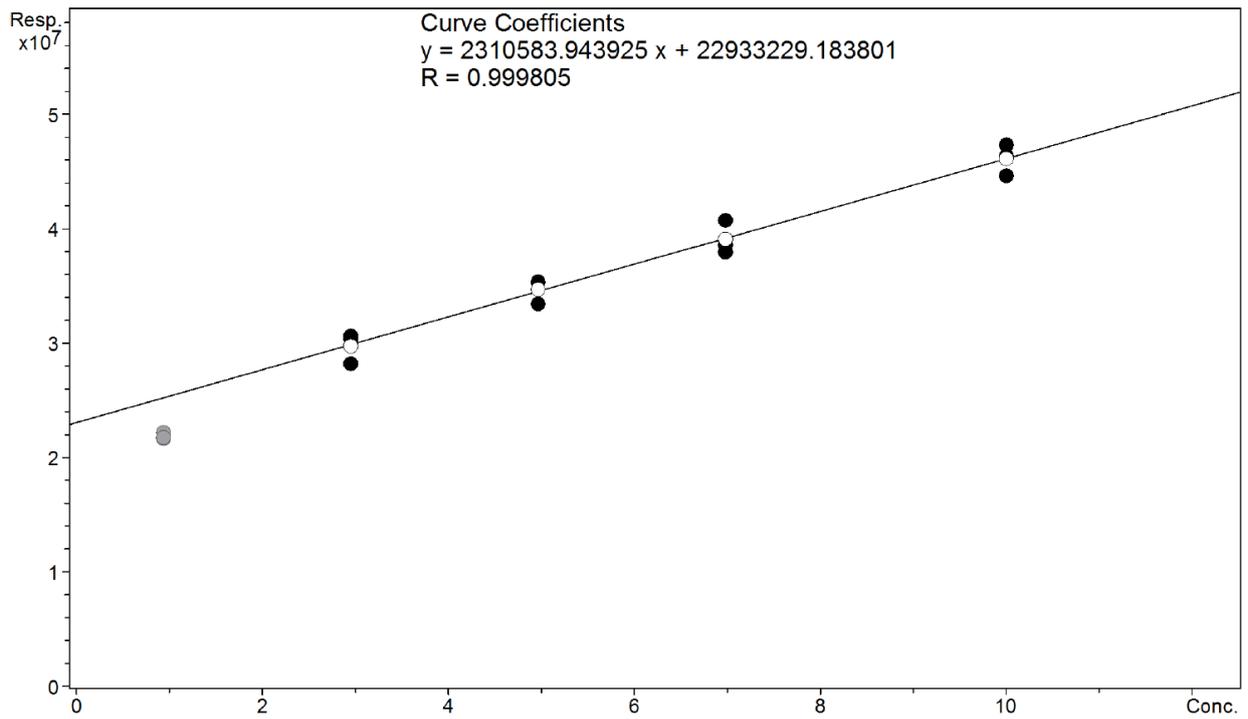


Abbildung 49: Kalibrierung der Probe 22b (P-36:5).

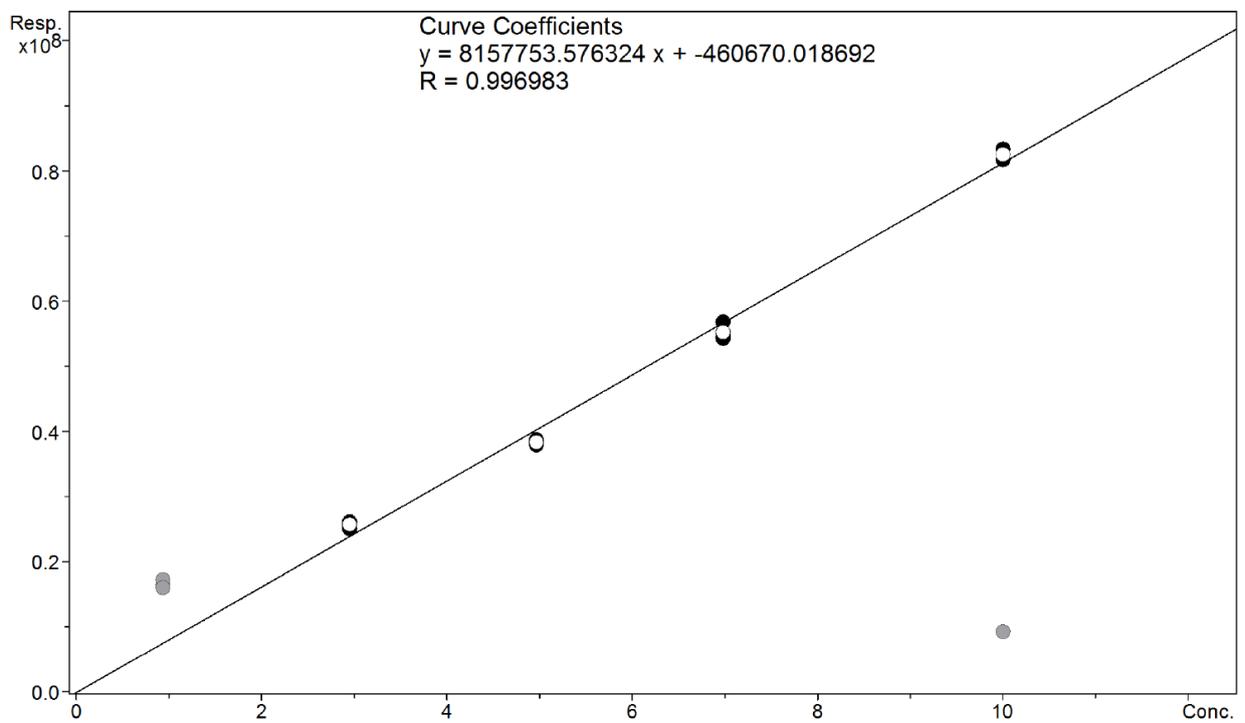


Abbildung 50: Kalibrierung der Probe 24b.

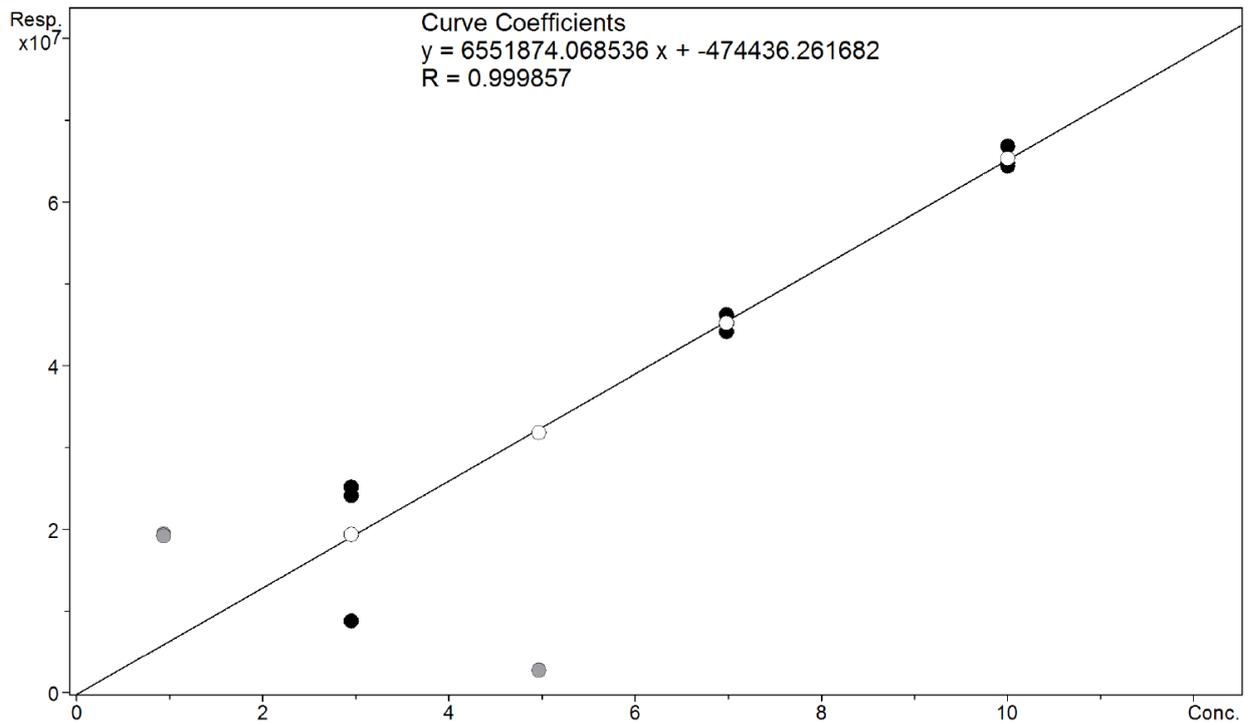


Abbildung 51: Kalibrierung der Probe 25a.

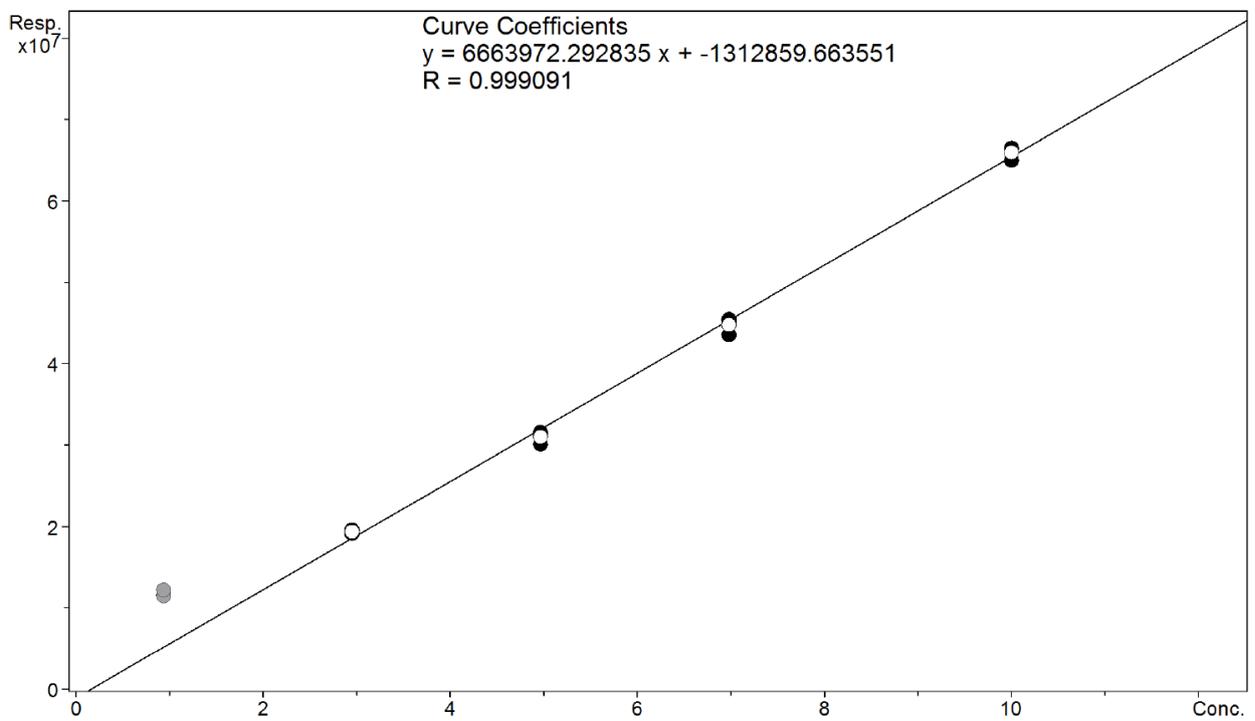


Abbildung 52: Kalibrierung der Probe 26a.

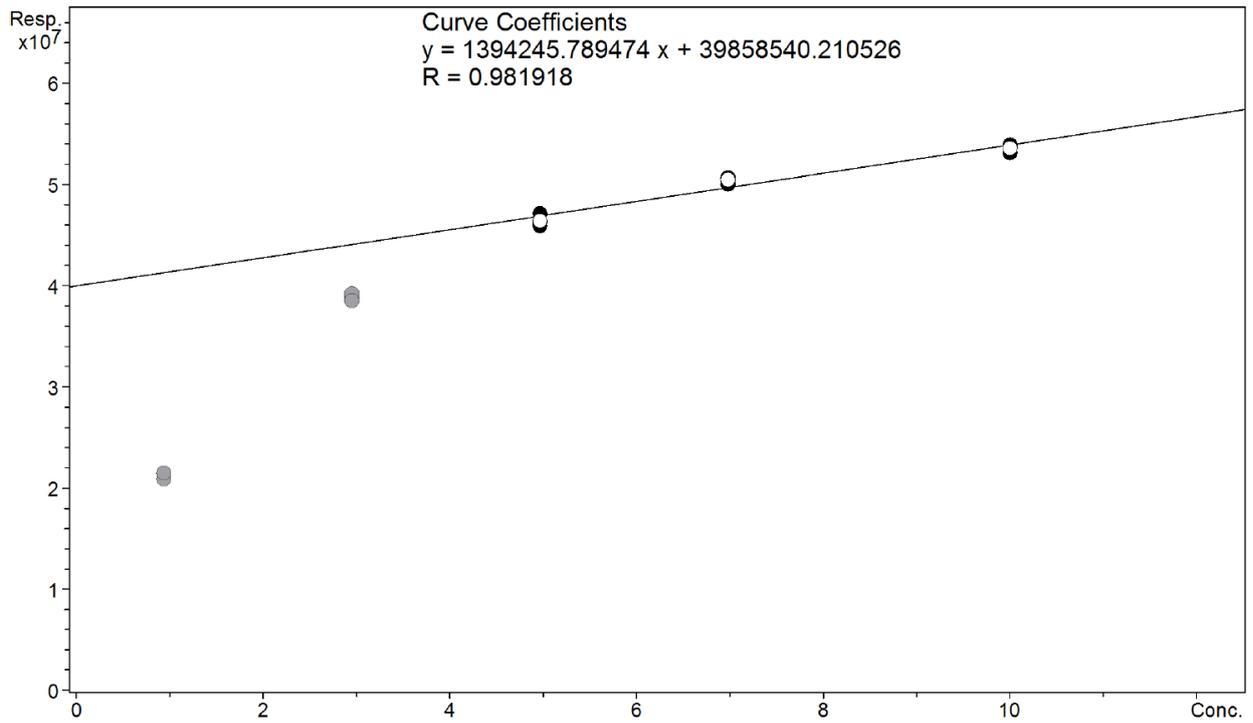


Abbildung 53: Kalibrierung der Probe 31a.

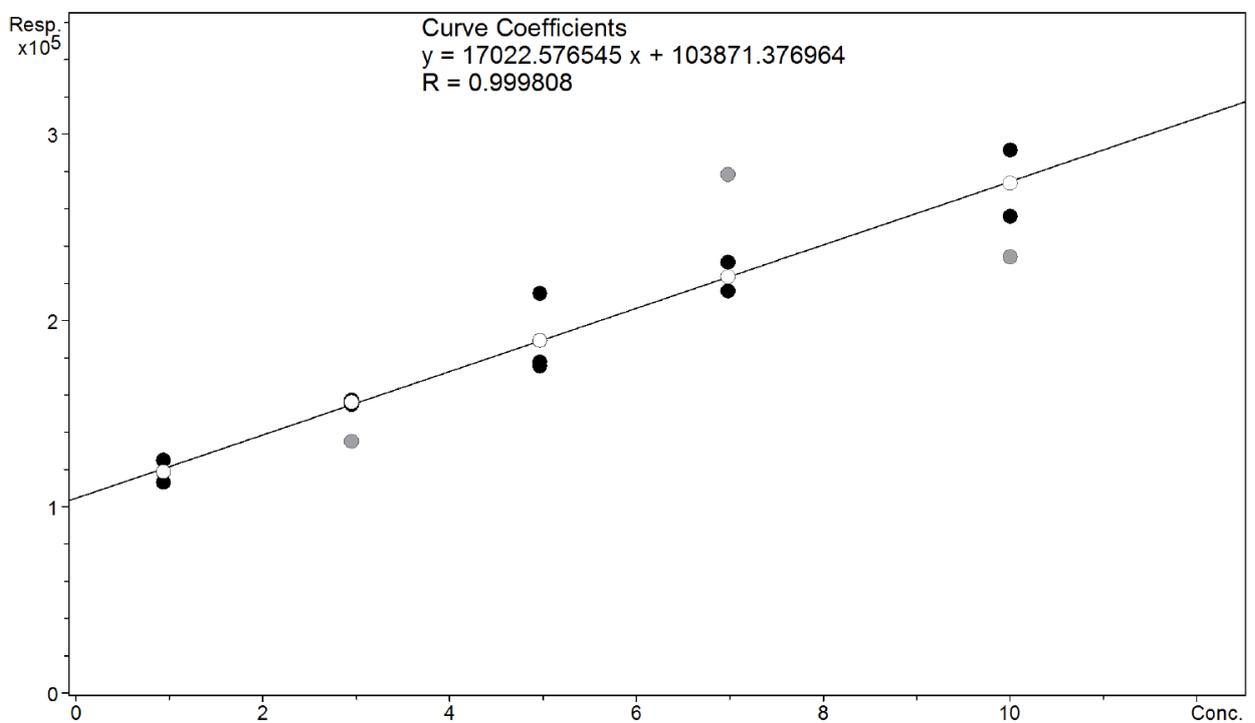


Abbildung 54: Kalibrierung der Probe 31b (PE (22:6/P-18:0)).

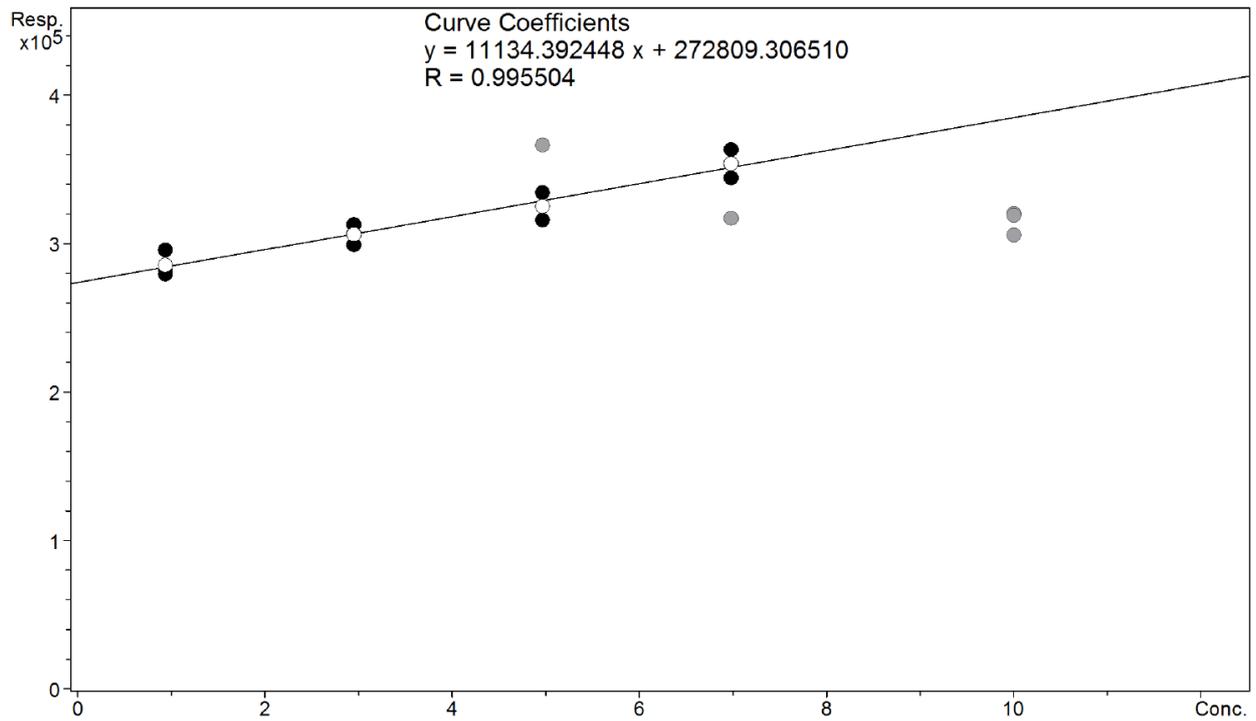


Abbildung 55: Kalibrierung der Probe 31b (PE (P-16:0/18:3)).

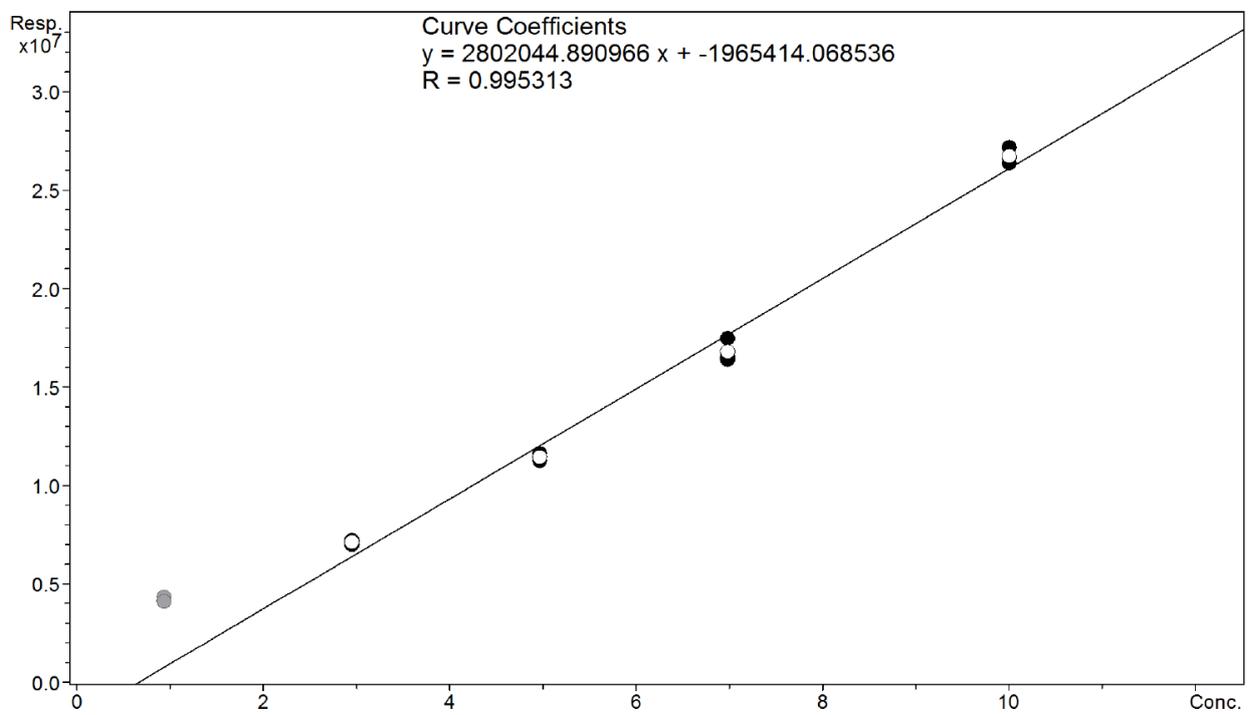


Abbildung 56: Kalibrierung der Probe 33b.

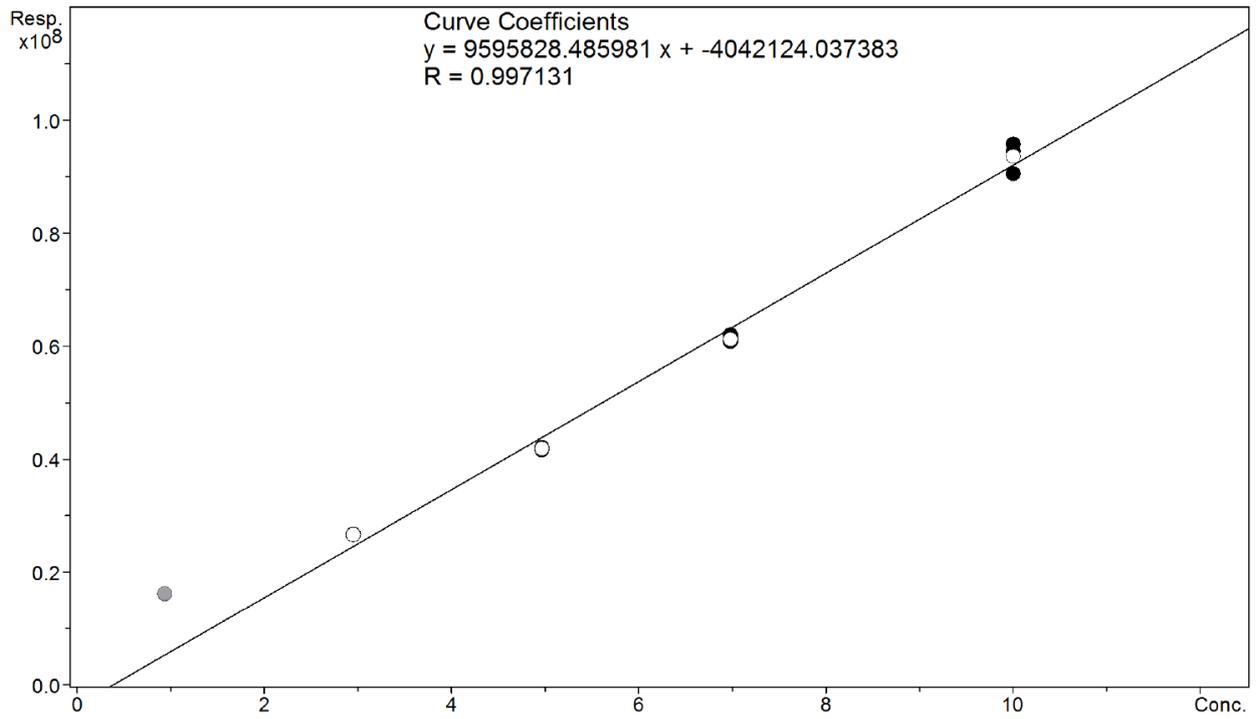


Abbildung 57: Kalibrierung der Probe 36b.

## 10 Eidesstattliche Erklärung



**Hochschule Anhalt**

Anhalt University of Applied Sciences

Name: .....

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst habe und keine weiteren außer den angeführten Quellen und Hilfsmitteln benutzt habe. Alle wörtlichen und sinn- gemäßen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass meine Masterarbeit bis jetzt bei keiner anderen Stelle veröffentlicht oder anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt wurde.

.....

Unterschrift

.....

Ort, Datum